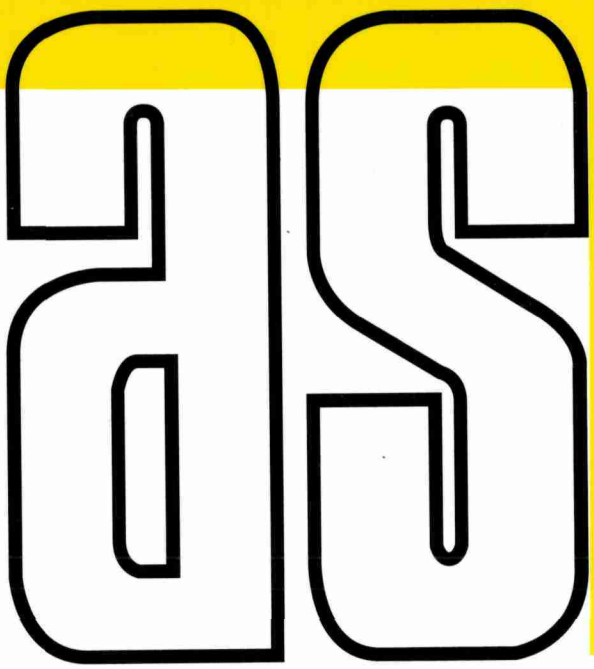
UNIVERSITÉS FRANCOPHONES

Joseph Dubois
Yves Demarly

QUEL AVENIR POUR L'AMÉLIORATION DES PLANTES ?



actualité scientifique

AUPELF•UREF

JL John Libbey EUROTEXT

QUEL AVENIR POUR L'AMÉLIORATION DES PLANTES ?

British Library Cataloguing in Publication Data
A catalogue record for this book is available from the British Library.

ISBN 2.7420.0075.5

Editions John Libbey Eurotext
127, avenue de la République, 92120 Montrouge, France. Tél. : (1) 46.73.06.60.

John Libbey & Company Ltd
13, Smiths Yard, Summerley Street, London SW18 4HR, England.
Tel. : (01) 947.27.77.

John Libbey CIC
Via L. Spallanzani, 11, 00161 Rome, Italy. Tel. : (06) 862.289.

© John Libbey Eurotext, 1995, Paris

Il est interdit de reproduire intégralement ou partiellement le présent ouvrage – loi du 11 mars 1957 – sans autorisation de l'éditeur ou du Centre français du Copyright, 6 *bis,* rue Gabriel-Laumain, 75010 Paris

QUEL AVENIR POUR L'AMÉLIORATION DES PLANTES ?

Quatrièmes Journées Scientifiques du Réseau
Biotechnologies Végétales de l'UREF
(Université des Réseaux d'Expression Française)
Namur, 18-21 octobre 1993

COORDONNATEUR

Joseph DUBOIS

John Libbey
EUROTEXT

Avant-propos

La diffusion de l'information scientifique et technique est un facteur essentiel du développement. Aussi dès 1988, l'Agence francophone pour l'enseignement supérieur et la recherche (AUPELF-UREF), mandatée par les Sommets francophones pour produire et diffuser revues et livres scientifiques, a créé la collection Universités francophones.

Lieu d'expression de la communauté scientifique de langue française, Universités francophones vise à instaurer une collaboration entre enseignants et chercheurs francophones en publiant des ouvrages, coédités avec des éditeurs francophones, et largement diffusés dans les pays du Sud, grâce à une politique tarifaire préférentielle.

Quatre séries composent la collection :

– Les manuels : cette série didactique est le cœur de la collection. Elle s'adresse à un public de deuxième et troisième cycle universitaire et vise à constituer une bibliothèque de référence couvrant les principales disciplines enseignées à l'université.

– Sciences en marche : cette série se compose de monographies qui font la synthèse des travaux de recherche en cours.

– Actualité scientifique : dans cette série sont publiés les actes de colloques organisés par les réseaux thématiques de recherche de l'UREF.

– Prospectives francophones : s'inscrivent dans cette série des ouvrages de réflexion donnant l'éclairage de la Francophonie sur les grandes questions contemporaines.

Notre collection, en proposant une approche plurielle et singulière de la science, adaptée aux réalités multiples de la Francophonie, contribue efficacement à promouvoir la recherche dans l'espace francophone et le plurilinguisme dans la recherche internationale.

Professeur Michel Guillou
Directeur général de l'AUPELF
Recteur de l'UREF

Sommaire

Liste des auteurs IX

Membres du Comité scientifique XV

Introduction XVII

Remerciements XVIII

PARTIE I. **Amélioration des plantes par des voies conventionnelles**

1. **Cent ans de sélection du blé en France et en Belgique.** *G. Doussinault* 3
2. **La coopération scientifique et technique entre la Communauté Européenne et les pays en développement : application à l'amélioration des plantes.** *A. Darthenucq* 9
3. **L'amélioration du riz en Afrique.** *J. Bouharmont* 15
4. **Ecophysiologie et amélioration des plantes, une relation utile ?** *J.F. Ledent, P. Girardin* 23
5. **Amélioration de quatre espèces de légumineuses alimentaires tropicales : *Phaseolus vulgaris, P. coccineus, P. polyanthus* et *P. lunatus*. Sélection intra- et interspécifique.** *J.P. Baudoin, F. Camarena, M. Lobo* 31
6. **Sélection récurrente des plantes autogames, exemple du blé tendre.** *M. Trottet, L. Saur* 51
7. **Évaluation de six accessions de lentille *(Lens culinaris* L.).** *A. El-Houjjaji, F. Chibani, H. Kallel, A. Aaies* 65
8. **Le caroubier en Tunisie : situation et perspectives d'amélioration.** *M. Nejib Rejeb* 79
9. **L'artichaut *(Cynara scolymus* L.) : plante récalcitrante.** *M.E. Kchouk, M.V. Gonzalez, A. Mliki, A. Chatibi, R. Tavazza, G. Ancora, A. Ghorbel* 87
10. **Faisabilité du semis direct d'arbres à usages multiples.** *M.N. Di Michele, L. Bray, M. Mounir Saïd, A.A. Djama, N.M. Nasser* 97
11. **Un modèle de structure prairiale de cultivar et de plante dans l'amélioration de la luzerne.** *P. Rotili, G. Gnocchi, C. Scotti* 109

12. **Ressources génétiques et résistance aux maladies des arbres fruitiers : résultats et perspectives.** *M. Lateur, C. Populer* 111

13. **Ressources génétiques et amélioration des plantes.** *M. El Gazzah, N. Chalbi* 123

14. **Amélioration de la tomate pour la résistance au flétrissement bactérien provoqué par *Pseudomonas solanacearum*.** *E. Nsika-Mikoko* 131

PARTIE II. La plante et la sélection

15. **Implication de l'acide abscissique dans la résistance du blé à la sécheresse.** *S. El Jaafari, P. Lepoivre, J. Semal* 141

16. **Intégration des approches physiologiques, génétiques et moléculaires pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse chez les céréales.** *P. Monneveux, D. Depigny-This* 149

17. **Cancer végétal *in vitro* : aspects morphogénétiques et biochimiques.** *T. Gaspar, C. Kevers, B. Bisbis, M. Crèvecœur, C. Penel, H. Greppin, F. Le Dily, J.-P. Billard, C. Huault, J.-M. Foidart* 165

18. **Les biopesticides.** *V. Heuzé, J. Destain, Ph. Thonart* 173

PARTIE III. Culture *in vitro* et amélioration des plantes

19. **Néoformation de plantes d'épinard à partir de suspensions cellulaires.** *X.G. Xiao, G. Charles, M. Branchard* 177

20. **Clonage de plantes hyperflorales par bourgeonnement stipulaire adventif chez le fraisier micropropagé par méristème.** *A. Jemmali, Ph. Boxus, D. Dekegel, G. van Heule* 185

21. **Multiplication végétative *in vitro* d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana*.** *M.N. Di Michele, L. Bray* 195

22. **Évaluation et potentialité des minitubercules de pomme de terre produits par *in vitro*.** *G. Fouarge* 205

23. **Maîtrise de la culture et de la régénération de protoplastes de bananiers en vue de la création de nouvelles structures génétiques.** *R. Haïcour, L. Rossignol, V. Bui Trang, R. Megia, S. Tizroutine* 211

24. **Régénération *in vitro* et acclimatation du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.).** *M. Belaizi, M. R. Bolen, P. Boxus* 227

25. **Étude de l'expression transitoire des gènes marqueurs CAT et GUS dans les protoplastes de tournesol.** *H. Laparra, G. Hahne* 233

26. Polymorphisme de l'ADN total chez les plantes régénérées à partir de protoplastes de pomme de terre. *O. Ellouz, L. Lakhoua, A. Gargouri* 241

27. Embryogenèse somatique chez la patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) : caractérisation et régénération des plantes. *D. Sihachakr, J.M. Cavalcante-Alves, S. Tizroutine, M. Allot, I. Mussio, A. Servaes, D. Nzoghé, G. Ducreux* 251

28. Propagation *in vitro* du pêcher-amandier GF-557. *A. Ghorbel, A. Chatibi, A. Mliki, M. E. Kchouk, H. Zemni* 263

29. Les effets de la phytohémagglutinine (PHA) dans la culture *in vitro* végétale. *M. Khosrowchahli, S. A. Gaèm-Magamie* 275

30. Étude précoce des effets morphologiques et physiologiques du rapport sodium/calcium *in vitro* sur une population d'*Atriplex halimus*. *Y. Pourrat, P. Dutuit* 283

PARTIE IV. **Les haploïdes et l'amélioration des plantes**

31. Contrôle nucléaire et cytoplasmique de la régénération haploïde chez les blés tétraploïdes. *A. Sarrafi, M. Ghaemi, N. Amrani, G. Alibert* 299

32. Effet du milieu de culture d'anthères sur l'androgenèse du blé tétraploïde *Triticum turgidum* var. *M. Ghaemi, A. Sarrafi* 305

33. Sélection *in vitro* de plantes androgénétiques de blé tendre résistantes à la salinité. *K. Piri, C. Anceau, S. El Jaafari, P. Lepoivre, J. Semal* 311

34. Isolement de protoplastes à partir de mésophylle, de cals de feuilles et de cals de racines de *Prunus cerasus* L., var. « Montmorency ». *R. Kamoun-Mehri, P. Lepoivre, P. Boxus* 321

35. Rôle du génome « D » dans la régénération haploïde du croisement « blé × maïs ». *A. Moieni, A. Sarrafi* 331

36. Gynogenèse chez des génotypes marocains d'orge *(Hordeum vulgare)*. *M.L. Sibi, M. Fakiri* 337

37. Vitrovariation chez des orges *(Hordeum vulgare)* issues d'haplodiploïdisation. Analyse des ß amylases chez les croisements diallèles. *M.L. Sibi, M. Fakiri* 345

38. L'haplodiploïdisation : un outil multi-usage pour la génétique et l'amélioration des céréales. *E. Picard, E. Crambes, A. Mihamou-Ziyyat* 355

PARTIE V. **Les étiquetages et repérages moléculaires**

39. Utilisation des RAPD en cartographie génétique et pour l'analyse phénétique. Application à l'étude du genre *Petunia*. *D. Peltier, A. Bervillé, H. Dulieu* 373

40. La sélection assistée par marqueurs. *A. Gallais* 387

41. Identification variétale et ressources génétiques chez le figuier *(Ficus carica* L.) : utilisation des marqueurs RAPD. *B. Khadari, P. Lashermes, F. Kjellberg* 399

42. Amélioration génétique du palmier dattier assistée par les marqueurs biochimiques et moléculaires. *M. Baaziz, F. Bendiah* 413

43. Comparaison de la tolérance à la sécheresse chez deux génotypes de maïs marocains. Étude au niveau macroscopique, microscopique et moléculaire. *M. Chokairi, H. Chlyah* 423

44. Utilisation des marqueurs RFLP pour l'évaluation des niveaux d'hétérozygotie chez *Medicago sativa*. *C. Scotti, F. Pupilli, S. Businelli, F. Damiani, S. Arcioni, P. Rotili* 433

PARTIE VI. Approche moléculaire et amélioration des plantes

45. L'application du génie génétique en Bulgarie. *A. I. Atanassov* 437

46. Physiologie de la tubérisation chez la pomme de terre cultivée *(Solanum tuberosum* L.) : quelques conclusions de données moléculaires. *P. du Jardin* 437

47. Recherche de l'origine d'un cytoplasme CMS de *Nicotiana,* attribué à *N. glutinosa*. *H. Roussel, O. Chatagnier, H. Dulieu* 447

48. Étude de la sensibilité d'*Acacia flava* et d'*Acacia nilotica* à *Agrobacterium tumefaciens*. *L. Bray, V. Lecouturier, M. N. Di Michele* 459

49. Expression chez *Brassica napus* d'une stérilité mâle génique obtenue par génie génétique. Comparaison avec trois autres stérilités mâles géniques. *M. Denis, J.P. Gourret, R. Delourme, C. Mariani, M. Renard* 473

50. La stérilité mâle cytoplasmique chez la chicorée industrielle : obtention par fusion de protoplastes et caractérisation moléculaire. *C. Rambaud, A Bellamy, J. Vasseur* 483

51. Application de la technique biolistique pour la transformation génétique du froment. *F. Delporte, J. M. Jacquemin* 491

52. Des plants de vignes transgéniques obtenus par embryogenèse somatique. *M.C. Mauro, S. Toutain, A. Deloire* 501

53. Expériences de manipulations génétiques de l'orge par l'utilisation du bombardement biolistique. *J. de Lafonteyne, M. Sormann, B. Van de Cotte* 507

Liste des auteurs

A

Aaies A., Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences de Tunis, Campus Universitaire, 1060 Le Belvédère, Tunis, Tunisie ; Unité de Biologie INRST, BP 95, 2050 Hammam-Lif, Tunisie

Alibert G., Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), INP/ENSAT, EA DRED 832, 145, avenue de Muret, 31076 Toulouse, France

Allot M., Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât. 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France

Anceau C., Laboratoire de Pathologie végétale, Faculté des Sciences agronomiques, 5030 Gembloux, Belgique

Ancora G., ENEA, Dipartimento Ricerca e Sviluppo Agroindustriale, Divisione Ingegneria Genetica, CP 2400 Roma AD, Italie

Amrani N., Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), INP/ENSAT, EA DRED 832, 145, avenue de Muret, 31076 Toulouse, France

Arcioni S., ISCF, Lodi, Italie

Atanassov A. I., Institute of Genetic Engineering, 2232 Kostinbrod 2, Bulgarie

B

Baaziz M., Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire des Plantes, Département de Biologie, Université Cadi-Ayyad, Faculté des Sciences, BP 515, Marrakech, Maroc.

Baudoin J. P., FSAGx, Belgique

Belaizi M., Centre de Recherches Agronomiques, Station des Cultures fruitières et maraîchères, 234, chaussée de Charleroi, 5030 Gembloux, Belgique

Bellamy A., Laboratoire de Physiologie cellulaire et Morphogenèse végétale, Université des sciences et technologies de Lille, 59655 Villeneuve-d'Ascq, France

Bendiab K., Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire des Plantes, Département de Biologie, Université Cadi-Ayyad, Faculté des Sciences, BP 515, Marrakech, Maroc.

Bervillé A., INRA-ENSAM, 2, place P. Viala, 34060 Montpellier, France

Billard J.-P., Université de Caen, Physiologie végétale, 14032 Caen, France

Bisbis B., Université de Liège, Institut de Botanique B22, Sart Tilman, B-4000 Liège, Belgique

Bolen M. R., Centre de Recherches Agronomiques, Station des Cultures fruitières et maraîchères, 234, chaussée de Charleroi, 5030 Gembloux, Belgique

Bouharmont J., Laboratoire de Cytogénétique, Université Catholique de Louvain, 4, place Croix-du-Sud, 1348 Louvain-La-Neuve, Belgique

Boxus P., Centre de Recherches Agronomiques, Station des Cultures fruitières et maraîchères, 234, chaussée de Charleroi, 5030 Gembloux, Belgique

Branchard M., Laboratoire d'Amélioration des Végétaux-Biotechnologie, ISAMOR, Université de Bretagne occidentale, Technopole Brest-Iroise, 29280 Plouzané-Brest, France

Bray L., ISERST, Laboratoire de Lutte contre la Désertification, BP 486, Djibouti, République de Djibouti

Bui Trang V., Laboratoire de Physiologie végétale, Université Mô-Chi-Minh-Ville, 227 Nguyen Van Cu Q5, TP Mô-Chi-Minh, Vietnam

Businelli S., ISCF, Lodi, Italie

C

Camarena F., UNALM, Pérou

Cavalcante Alves J. M., Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât. 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France

Chalbi N., Laboratoire de Génétique et Biométrie, Faculté des Sciences, Tunis, Tunisie

Charles G., Laboratoire d'Amélioration des Végétaux-Biotechnologie, ISAMOR, Université de Bretagne occidentale, Technopole Brest-Iroise, 29280 Plouzané, Brest, France

Chatagnier O., Université de Bourgogne et INRA, Dijon, France

Chatibi A., INRST, Laboratoire de culture *in vitro,* BP 95, 2050 Hammam-Lif, Tunisie

Chibani F., Unité de Biologie, INRST, BP 95, 2050 Hammam-lif, Tunisie

Chlyah H., Laboratoire de Physiologie végétale, Département de Biologie, Université Mohammed V, B2 1014, Rabat, Maroc

Chokairi M., Laboratoire de Physiologie végétale, Département de Biologie, Université Mohammed V, B2 1014, Rabat, Maroc

Crambes E., Université Paris-Sud, Centre Universitaire, Bât 332, Service de Biologie végétale, 91405 Orsay Cedex, France

Crèvecœur M., Université de Genève, Physiologie végétale, 3, place de l'Université, CH-1211 Genève, Suisse

D

Damiani F., ISCF, Lodi, Italie

Darthenucq A., Commission des Communautés Européennes, Bruxelles, Belgique

Dekegel D., Microscopie électronique, Institut Pasteur, 642, rue Engeland, 1180 Bruxelles, Belgique

De Lafonteyne J., Laboratoire de Génétique moléculaire, Faculté Agronomie et Biologie Appliquée, Université de Gand, Coupure L, 653 Gand, B-9000, Belgique

Deloire A., Moët et Chandon, 20, avenue de Champagne, BP 140, 51333 Épernay, France

Delourme R., INRA, Centre de Recherche de Rennes, Station d'Amélioration des Plantes, BP 29, 35650 Le Rheu, France

Delporte F., Centre de Recherches Agronomiques, Station d'Amélioration des Plantes, 4, rue du Bordia, B-5030 Gembloux, Belgique

Denis M., INRA, Centre de Recherche de Rennes, Station d'Amélioration des Plantes, BP 29, 35650 Le Rheu, France

Depigny-This D., UFR Génétique et Amélioration des Plantes, ENSA-INRA Montpellier, France

Destain J., Centre wallon de Biologie industrielle, Belgique

Di Michele M. N., ISERST, Laboratoire de Lutte contre la Désertification, BP 486, Djibouti, République de Djibouti

Djama A. A., Laboratoire de Lutte contre la Désertification, Institut Supérieur d'Études et de Recherches Scientifiques et Techniques, BP 486, Djibouti, République de Djibouti

Doussinault G., INRA, Station d'Amélioration des Plantes, domaine de la Motte-au-Vicomte, 35650 Le Rheu, France

Dubois J., Station d'Amélioration des Plantes, 4, rue du Bordia, B-5030 Gembloux, Belgique

Ducreux G., Morphogenèse végétale expérimentale, Bât. 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France

Dulieu H., Université de Bourgogne et INRA, BV 1540, 21034 Dijon, France

Dutuit P., Equipe d'Ecotechnologie, Université de Paris-Sud, Tour E1, 92296 Châtenay-Malabry, France

E

El Gazzah M., Laboratoire de Génétique et Biométrie, Faculté des Sciences, Tunis, Tunisie

El-Houjjaji A., Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences de Tunis, Campus Universitaire, 1060 Le Belvédère, Tunis, Tunisie ; et Unité de Biologie, INRST, BP 95, 2050 Hammam-Lif, Tunisie

El Jaafari S., Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université My Ismail, Meknès, Maroc

Ellouz O., École Nationale d'Ingénieurs de Sfax, BP W 3038 Sfax, Tunisie

F

Fakiri M., Amélioration génétique et Biotechnologies, ENSAIA, 2, avenue de la Forêt-de-Haye, 54505 Vandœuvre, France

Foidart J.-M., Université de Liège, Biologie générale, CHU, B 23, B-4000 Liège, Belgique

Fouarge G., Station de Haute Belgique, CRA, Gembloux, Belgique

G

Gaèm-Magamie S. A., Laboratoire de Génétique, Faculté des Sciences, Université de Tabriz, Iran

Gallais A., Station de Génétique végétale, Ferme du Moulon, 91190 Gif-sur-Yvette, France ; INA-PG, 16, rue Claude-Bernard, 75242 Paris Cedex, France

Gargouri A., Centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie

Gaspar T., Université de Liège, Institut de Botanique B22, Sart Tilman, B-4000 Liège, Belgique

Girardin P., Station de recherches « Grandes Cultures » INRA, 28, rue de Herrlisheim, BP 507, 68021 Colmar, France

Ghaemi M., Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), INP/ENSAT, EA DRED 832, 145, avenue de Muret, 31076 Toulouse, France

Ghorbel A., INRST, Laboratoire de culture *in vitro,* BP 95, 2050 Hammam-Lif, Tunisie

Glouz D., École Nationale d'Ingénieurs de Sfax, B.P. W, 3038 Sfax, Tunisie

Gnocchi G., Istituto Sperimentale per le Colture Foraggere, Lodi, Italie

Gonzalez M., ENEA, Dipartimento Ricerca e Sviluppo Agroindustriale, Divisione Ingegneria Genetica, CP 2400 Rome AD, Italie

Gourret J. P., Laboratoire de Biologie cellulaire, Université de Rennes-I, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes, France

Greppin H., Université de Genève, Physiologie végétale, 3, place de l'Université, CH-1211 Genève, Suisse

Günther H., Institut de Biologie moléculaire des Plantes, Centre National de la Recherche scientifique, Université Louis-Pasteur, 12, rue du Général-Zimmer, 67084 Strasbourg, France

H

Hahne G., Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Louis Pasteur, 12, rue du Général-Zimmer, 67084 Strasbourg, France

Haïcour R., Laboratoire de Morphogenèse végétale expérimentale, Bât. 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France

Heuze V., Centre wallon de Biologie industrielle, Belgique

Huault C., Université de Caen, Physiologie végétale, 14032 Caen, France

J

Jacquemin J. M., Centre de Recherches Agronomiques, Station d'Amélioration des Plantes, rue du Bordia, 4, B-5030 Gembloux, Belgique

Jardin du P., Unité de Biologie végétale, Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, avenue Maréchal Juin, Bât. 48, B-5030 Gembloux, Belgique

Jemmali A., Station fruitière et maraîchère, 234, chaussée de Charleroi, 5030 Gembloux, Belgique

K

Kallel H., Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences de Tunis, Campus Universitaire, 1060 Le Belvédère, Tunis, Tunisie

Kamoun-Mehri R., Laboratoire de Phytopathologie, Faculté des Sciences Agronomiques, Station de Recherches de Cultures fruitières et maraîchères, 5030 Gembloux, Belgique

Kchouk M. E., INRST, Laboratoire de culture *in vitro,* BP 95, 2050 Hammam-Lif, Tunisie

Kevers C., Université de Liège, Institut de Botanique B 22, Sart Tilman, B-4000 Liège, Belgique

Khadari B., CEFE-CNRS, BP 5051, 34033 Montpellier Cedex, France

Khosrowchachli M., Laboratoire de Génétique, Faculté des Sciences, Université de Tabriz, Iran

Kjellberg F., CEFE-CNRS, BP 5051, 34033 Montpellier Cedex

L

Lakhoua L., École Nationale d'Ingénieurs de Sfax, BP W, 3038 Sfax, Tunisie

Laparra H., Institut de Biologie moléculaire des Plantes, Centre National de la Recherche scientifique, Université Louis-Pasteur, 12, rue du Général-Zimmer, 67084 Strasbourg, France

Lashermes P., ORSTOM, BP 5055, 34032 Montpellier Cedex, France

Lateur M., Station de Phytopathologie de l'État, CRA Gembloux, Belgique

Lecouturier V., INSA, CNRS/URA 1486, Bât 406, 20, avenue Albert-Einstein, 69621 Villeurbanne Cedex, France

Ledent J. F., ECOP, Grandes Cultures, Université Catholique de Louvain, 2, place Croix-du-Sud, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgique

Le Dily F., Université de Caen, Physiologie végétale, 14032 Caen, France

Lepoivre P., Laboratoire de Pathologie végétale, Faculté des Sciences Agronomiques, 5030 Gembloux, Belgique

Lobo M., ICA, Colombie

M

Mariani C., Plant Genetic Systems NV, J. Plateaustraat 22, 9000 Gent, Belgique

Mauro M. C., (CM Deloire)

Megia R., Institut Pertanian Bogor Jurusan Biologi JL Raya Pajajaran, Bogor 16143, Indonésie

Mihamou-Ziyyat A., Université Paris-Sud, Centre Universitaire, Bât 332, Service de Biologie végétale, 91405 Orsay Cedex, France

Mliki A., INRST, Laboratoire de culture *in vitro,* BP 95, 2050 Hammam-Lif, Tunisie

Moieni A., Institut National Polytechnique, École Nationale Supérieure Agronomique (INP-ENSAT), Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), EA DRED 832, 145, avenue de Muret, 31076 Toulouse, France

Monneveux P., UFR Génétique et Amélioration des Plantes, ENSA-INRA, Montpellier, France

Mounir Saïd M., Laboratoire de Lutte contre la Désertification, Institut Supérieur d'Études et de Recherches Scientifiques et Techniques, BP 486, Djibouti, République de Djibouti

Mussio I., Morphogenèse végétale expérimentale, Bât. 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France

N

Nasser M. N., Laboratoire de Lutte contre la Désertification, Institut Supérieur d'Études et de Recherches Scientifiques et Techniques, BP 486, Djibouti, République de Djibouti

Nejib Rejeb M., Centre de Recherches du Génie Rural, BP 10, Ariana, Tunisie

Nsika-Mikoko E., Département de Biologie et Physiologie végétales, Faculté des Sciences, Brazzaville, Congo.

Nzoghé D., Laboratoire de culture *in vitro*, CIAM, BP 2183, Libreville, Gabon

P

Peltier D., Université de Bourgogne et INRA, BV 1540, 21034 Dijon, France

Penel C., Université de Genève, Physiologie végétale, 3, place de l'Université, CH-1211 Genève, Suisse

Picard E., Université Paris-Sud, Centre Universitaire, Bât 332, Service de Biologie végétale, 91405 Orsay Cedex, France

Piri K., Laboratoire de Pathologie végétale, Faculté des Sciences Agronomiques, 5030 Gembloux, Belgique

Populer C., Station de Phytopathologie de l'État, CRA Gembloux, Belgique

Pourrat Y., Equipe d'Ecotechnologie, Université de Paris-Sud, Tour E1, 92296 Châtenay-Malabry, France

Pupili F., Instituto Sperimentale per le Colture Foraggere, Lodi, Italie

R

Rambaud C., Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Morphogenèse végétale, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve-d'Ascq, France

Renard M., INRA, Centre de Recherche de Rennes, Station d'Amélioration des Plantes, BP 29, 35650 Le Rheu, France

Rossignol L., Laboratoire de Morphogenèse végétale expérimentale, Bât. 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France

Rotili P., Instituto Sperimentale per le Colture Foraggere, Lodi, Italie

Roussel H., Université de Bourgogne et INRA, Dijon, France

S

Sarrafi A., Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), INP/ENSAT EA DRED 832, 145, avenue de Muret, 31076 Toulouse, France

Saur L., INRA, Station d'Amélioration des Plantes, BP 29, 35650 Le Rheu, France

Scotti C., Instituto Sperimentale per le Colture Foraggere, Lodi, Italie

Semal J., Laboratoire de Pathologie végétale, FSAGx, 5030, Gembloux, Belgique

Servaes A., Morphogenèse végétale expérimentale, Bât. 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France

Sibi M. L., Amélioration génétique et Biotechnologies, ENSAIA, 2, avenue de la Forêt-de-Haye, 54505 Vandœuvre, France

Sihachakr D., Morphogenèse végétale expérimentale, Bât. 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France

Sormann M., Laboratoire de Génétique moléculaire, Faculté Agronomie et Biologie Appliquée, Université de Gand, Coupure L, 653 Gand, B-900, Belgique

T

Tavazza R., ENEA, Dipartimento Ricerca e Sviluppo Agroindustriale, Divisione Ingegneria Genetica, CP 2400 Roma AD, Italie

Tizroutine S., Laboratoire de Morphogenèse végétale expérimentale, Bât. 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex France

Thonart Ph., Centre wallon de Biologie industrielle, Belgique

Toutain S., (CM Deloire)

Trottet M., INRA, Station d'Amélioration des Plantes, BP 29, 35650 Le Rheu, France

V

Vandam D., Région Wallonne, 5000 Namur, Belgique

Vandam J., Gembloux, Belgique

Van de Cotte B., Laboratoire de Génétique moléculaire, Faculté Agronomie et Biologie Appliquée, Université de Gand, Coupure L, 653 Gand, B-9000, Belgique

Van Heule G., Microscopie électronique, Institut Pasteur, 642, rue Engeland, 1180 Bruxelles, Belgique

Vasseur J., Laboratoire de Physiologie cellulaire et Morphogenèse végétale, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

X

Xiao X.-G., Laboratoire d'Amélioration des Végétaux-Biotechnologie, ISAMOR, Université de Bretagne occidentale, Technopole Brest-Iroise, 29280 Plouzané-Brest, France

Z

Zemni H., INRST, Laboratoire de Culture *in vitro,* BP 95, 2050 Hammam-Lif, Tunisie

Membres du Comité scientifique

Pr. J.-P. BAUDOIN,	phytotechnie des régions chaudes
Dr Ph. BOXUS,	plantes fruitières et maraîchères
Pr. J. BOUHARMONT,	amélioration des plantes
Pr. H. CHLYAH,	physiologie végétale
Dr G. CLAMOT,	amélioration des plantes
Pr. Y. DEMARLY,	génétique et amélioration des plantes
Dr P. du JARDIN,	génétique et amélioration des plantes
Pr. M. JACOBS,	génétique moléculaire
Dr J. JACQUEMIN,	biologie moléculaire
Dr B. KOUAME,	amélioration des plantes
Pr. C.A. SAINT-PIERRE,	phytogénétique
Pr. J. SEMAL,	phytopathologie

ORGANISATEUR

Dr J. DUBOIS

CENTRE DE RECHERCHES AGRONOMIQUES, Gembloux

Créé en 1872, le Centre de Recherches agronomiques (CRA) de Gembloux est une institution de recherches pluridisciplinaires, relevant de l'Administration de la Recherche agronomique du ministère de l'Agriculture.

Établissement scientifique de premier niveau, le Centre se compose de douze unités (stations ou services) de recherches, dont la Station d'Amélioration des Plantes. Celle-ci a pour mission de créer des variétés de céréales (blé, orge, avoine, épeautre) et de les diffuser tant dans le pays qu'à l'étranger.

FACULTÉ DES SCIENCES AGRONOMIQUES, Gembloux

Créée en 1860, la Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux (FSA) est un établissement d'enseignement et de recherche dépendant du ministère de l'Éducation et de la Recherche scientifique de la Communauté française de Belgique.

La Faculté des Sciences agronomiques délivre les diplômes d'ingénieur agronome, avec diverses spécialisations, et d'ingénieur chimiste et des industries agricoles. Elle délivre en outre divers titres d'enseignement post-universitaire, dont un diplôme de docteur en sciences agronomiques.

AUPELF-UREF

L'Université des Réseaux d'Expression française **(UREF)** est un programme majeur du Sommet des chefs d'État et de gouvernement des pays ayant en commun l'usage du français pour l'enseignement supérieur et la recherche. Créée en 1987 et fonctionnant au sein de l'Association des Universités partiellement ou entièrement de Langue française **(AUPELF),** l'**UREF** a pour mission de favoriser la concertation, la recherche partagée, le maillage et la diffusion d'information scientifique et technique auprès des institutions d'enseignement supérieur et de recherche et est l'opérateur des sommets pour l'enseignement supérieur et la recherche.

Le réseau « Biotechnologies – Génie génétique des Plantes » a été mis sur pied en 1988 par l'**UREF,** afin de favoriser, sur ce thème prioritaire du Sommet, des échanges entre équipes de recherche, de réaliser des outils d'information scientifique et technique et d'organiser des journées scientifiques. Ses thèmes prioritaires de recherche sont :

- permettre la production de plantes indemnes de toute maladie, par la maîtrise des techniques de multiplication *in vitro ;*
- appliquer le génie génétique à la préservation des espèces et à leur multiplication ;
- produire des variétés résistantes à la sécheresse et à la salinité.

Introduction

Jusqu'à ces derniers temps, l'amélioration des espèces cultivées était basée sur la génétique mendélienne et les divers apports de la cytologie, des mutations et de la polyploïdie. Tout en restant les fondements de l'amélioration, ces méthodes pionnières ont été complétées ces dernières années par l'apport de disciplines relevant des biotechnologies végétales.

Le temps paraît venu, sinon de dresser un bilan, du moins de tenter une estimation scientifique de ces nouvelles biotechnologies appliquées à l'amélioration des plantes.

Le thème des Quatrièmes Journées Scientifiques de l'UREF « Quel avenir pour l'amélioration des plantes » a donc été proposé et retenu.

Ces Journées Scientifiques 1993 traiteront des grandes méthodes appliquées à l'amélioration ; la présentation a été opérée de façon à inclure à la fois l'approche classique (croisements) mais aussi des technologies diverses applicables dès maintenant à la création variétale. Enfin, lors de la dernière demi-journée, des sélectionneurs interviendront et tireront le bilan pratique de ces Journées.

J. DUBOIS

Remerciements

Le Comité des Réseaux « Biotechnologies végétales » a choisi pour thème des Quatrièmes Journées Scientifiques (Namur, 18-21 octobre 1993) une réflexion sur l'avenir de l'amélioration des plantes.

Ces journées scientifiques se sont déroulées sous le patronage du Centre de Recherches Agronomiques (CRA) et de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux (FSA).

Le Gouvernement wallon, par le biais de deux ministères (ministère du Développement Technologique et de l'Emploi, d'une part, ministère de l'Environnement des Ressources naturelles et de l'Agriculture, d'autre part) a honoré les Journées par sa participation financière.

Nos remerciements vont aussi à la Communauté française de Belgique.

Enfin, nous remercions l'Université des Réseaux d'Expression Française, UREF, qui a permis à de nombreux chercheurs du Sud d'assister aux Journées.

Le Comité scientifique

PARTIE I

Amélioration des plantes par des voies conventionnelles

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1995, pp. 3-8.

1

Cent ans de sélection du blé en France et en Belgique

G. DOUSSINAULT

INRA, Station d'amélioration des plantes, domaine de La Motte-au-Vicomte, 35650 Le Rheu, France.

Résumé

Le blé tendre est certainement l'une des espèces dont la sélection est la plus ancienne. La méthodologie de la sélection a bénéficié du concept de la lignée pure, elle a ensuite pris en compte les avancées de la génétique quantitative. Progressivement, les techniques d'hybridations interspécifiques de biologie cellulaire et moléculaire ont été utilisées.
Les objectifs de la sélection au départ essentiellement limités à la productivité associée à la résistance à la verse se sont diversifiés pour aboutir à des variétés de plus en plus résistantes aux parasites et de mieux en mieux adaptées à l'utilisation industrielle.
Aujourd'hui, rien n'indique un ralentissement du progrès génétique qui pourrait même s'accélérer avec la mise au point des blés hybrides.

Il y a un peu plus d'un siècle, en 1883, Dattel premier blé issu d'hybridation réalisé en France était commercialisé par les Etablissements Vilmorin.

Jusque-là les blés cultivés étaient des « Blés de Pays », variétés populations constituées de génotypes ayant en commun un certain nombre de caractères d'adaptation aux facteurs du milieu. Ces populations étaient hétérogènes, constituées d'un mélange de lignées pures et de génotypes plus ou moins hétérozygotes issus principalement d'hybridation naturelle. Elles avaient évolué lentement depuis des siècles sous l'effet de la

sélection naturelle et d'une sélection massale effectuée par l'homme le plus souvent en triant les grains les mieux nourris. Cette sélection a conduit à des écotypes relativement adaptés à des conditions écologiques, par exemple la population « Rouge d'Alsace » avec une bonne résistance au froid.

C'est dans ce type de population que Hallet en 1861, cité par Lupton [4], décrit une méthode qui consiste à choisir des épis, à en semer les grains sur des lignes individualisées et à poursuivre de la même manière sur la descendance des lignes choisies. Il appelle cette technique *the pedigree selection*, la sélection généalogique.

A cette période, le progrès vient de la sélection dans les variétés populations alors cultivées. Les limites des possibilités de cette amélioration, en même temps que le concept de lignée pure, sont formulés par Johannsen en 1903 cité par Bonjean et Picard [1]. A cette même époque, les lois de Mendel sont redécouvertes et la sélection généalogique après hybridation se généralise. Dès 1914, Nilson-Ehle cité par Jonard [3], caractérise l'hérédité des caractères quantitatifs et donne ainsi une base scientifique aux transgressions.

La découverte de ces concepts va induire la mise en œuvre de techniques qui vont considérablement accélérer le progrès génétique. Le concept de lignée pure va permettre la création pour les espèces autogames d'un matériel végétal adapté à l'analyse génétique, à la création variétale, à la connaissance de la variabilité génétique et à son maintien.

Elle va permettre également de faciliter le choix des géniteurs et de guider les hybridations pour recombiner la variabilité. La sélection généalogique permet de sélectionner de manière rigoureuse dans les populations ainsi créées grâce à l'étude des descendances et d'aboutir à un invariant génétique nouveau, le cultivar « lignée pure ».

Le matériel génétique

A côté des populations de pays locales, se sont répandus en France et en Belgique des blés introduits d'Angleterre et de Russie. Les blés anglais « Chiddam d'automne », « Squarehead » étaient tardifs mais très productifs et résistants à la verse. Les blés d'origine russe ont été au départ sélectionnés dans des importations destinées à la meunerie et développés par le marquis de Noé en Aquitaine puis en Beauce et en Brie. Ces blés sont caractérisés par une vaste aire d'adaptation, une bonne précocité, une résistance moyenne à la verse, ils sont sensibles à la rouille jaune. De cette population ont été tirées des lignées « Rouge de Bordeaux », « Japhet », « Gros Bleu ».

Les premiers blés Vilmorin sont issus de croisements entre ces deux types et occupent près de la moitié des surfaces en France et en Belgique en 1914 avec les variétés « Bon Fermier » et « Hatif inversable ».

Très vite le professeur Schribaux, 1908 cité par Mayer [5], montre les limites de la sélection pratiquée par les Vilmorin. Orientée essentiellement vers l'accroissement de la productivité, celle-ci utilise de manière réitérée les mêmes géniteurs au point que Flaksberger les classe dans une écoespèce particulière *Triticum gallicum*.

Il met en évidence l'intérêt d'améliorer la régularité des rendements et de recourir pour cela à des géniteurs de résistance aux contraintes du milieu (froid, maladies...). Avec Crépin, 1928 cité par Jonard [3], il introduit très largement dans ses croisements des géniteurs d'Europe centrale et méridionale ainsi que d'Amérique du Nord (« Oro », « Thatcher », « Martin »,...).

Dans le même esprit, Jacques de Vilmorin éprouve la nécessité d'améliorer la qualité boulangère des blés en collaboration avec Chopin, et développe un appareil permettant de mesurer l'élasticité des pâtes et de prédire la valeur des blés dans les jeunes générations. C'est ainsi que des géniteurs canadiens comme « Red Fife » sont introduits dans les croisements.

C'est sans nul doute grâce à l'introduction de matériels génétiques éloignés que les gains de productivité et d'adaptation au milieu ont été réalisés.

Jonard [3] rapporte que la création et la mise au commerce de nombreuses variétés en France à partir de 1920 ont causé un état de confusion dû aux faits que beaucoup de blés étaient vendus sans être complètement fixés, qu'il existait pour certaines variétés plusieurs dénominations et qu'enfin beaucoup de lots commercialisés étaient des mélanges de variétés. Devant cette situation, les pouvoirs publics français, à la demande de nombreux sélectionneurs ont été amenés à édicter une réglementation destinée à mettre de l'ordre dans le commerce des semences. Le but général étant d'obliger le vendeur à livrer aux utilisateurs, sous un nom donné, des semences parfaitement bien définies du point de vue de la pureté variétale et de la faculté germinative. En 1922 était créé un comité de contrôle des semences dont l'une des attributions était de recenser les variétés de blé cultivées en France et d'en dresser la liste. Ce travail a abouti, en 1925, à la publication d'un catalogue provisoire comprenant 600 variétés.

Aujourd'hui, le nombre de variétés de blé inscrites au catalogue officiel en France a beaucoup diminué, pour arriver à environ 150. La variabilité du blé au niveau des agriculteurs a sans doute aussi beaucoup diminué. Le maintien et l'enrichissement des ressources génétiques se réalisent aujourd'hui dans les centres de recherche et les stations de sélection publiques et privées. Notre responsabilité collective est très importante pour organiser ce réseau de conservation et d'amélioration de la connaissance des ressources génétiques afin de garantir l'accès de nos successeurs à la variabilité nécessaire pour produire des variétés dont les caractéristiques ne sont pas connues aujourd'hui.

Les espèces sauvages apparentées aux blés constituent un important réservoir de gènes utilisables dans l'amélioration des formes cultivées. L'introduction de gènes étrangers dans le blé nécessite la réalisation d'hybrides interspécifiques et l'étude de leurs descendances pour créer des blés à 2n = 42 chromosomes.

Les transferts les plus faciles sont ceux qui sont réalisés à partir d'espèces ayant au moins un génome homologue à celui du blé. C'est ainsi que l'amidonnier sauvage *Triticum dicoccoïdes* a été utilisé pour améliorer la résistance à la rouille jaune. Le transfert de gènes à partir d'espèces polyploïdes d'*Aegilops* portant un génone commun avec ceux du blé s'effectue de la même manière. L'exemple le plus connu concerne le transfert du gène de résistance au piétin verse *Pch1* venant d'*Aegilops ventricosa*.

Le transfert à partir d'espèces ayant des génomes homéologues peut se réaliser par substitution d'un chromosome entier ou d'un bras chromosomique. Plusieurs variétés européennes possèdent ainsi la substitution 1B/1R du seigle ou la translocation 1BL/1RS, le bras long du chromosome 1B étant remplacé par son homéologue 1RS du seigle [7]. L'induction d'appariements homéologues dans un hybride interspécifique peut être obtenue si le parent blé ne possède pas le gène *Ph*.

Les introgressions de gènes étrangers dans le blé sont nombreuses et concernent en majorité des gènes de résistance aux maladies.

Le progrès génétique

Il a fallu un demi-siècle (1900-1950) pour doubler les rendements moyens du blé (12 à 25 qx/ha). Il n'a fallu qu'un quart de siècle pour qu'ils doublent à nouveau. Depuis une vingtaine d'année, le rythme du gain de production d'un peu plus d'un quintal par hectare et par an n'a pas faibli.

Les gains de productivité ont, bien entendu, été réalisés grâce à l'interaction entre le progrès génétique et le progrès agronomique. Par exemple, l'emploi d'herbicides efficaces a permis des gains de rendement en l'absence de tout progrès génétique. Mais on s'est vite aperçu que l'adaptation du blé à la compétition avec les mauvaises herbes n'était plus nécessaire. Or les caractères de résistance à cette compétition, tallage fort, feuilles étalées et tiges hautes sont différents de ceux qui optimisent la compétition entre plantes de blé en peuplement pur : tallage modéré, feuilles dressées et tiges courtes.

L'élévation remarquable du niveau de rendement obtenu tient, pour une bonne part, à la capacité des nouvelles variétés à valoriser les techniques culturales intensives. Cette supériorité tient à l'acquisition d'un certain nombre de caractéristiques, en particulier de la résistance à la verse qui permet de valoriser les niveaux élevés de fertilisation azotée. Cette résistance a été acquise par une diminution progressive de la hauteur de paille par transgression. Depuis 1970, l'utilisation des gènes de nanisme issus de blés japonais et italiens a accentué le raccourcissement des pailles.

Moule [6] a montré que jusqu'en 1925 l'augmentation de rendement s'était réalisée par l'augmentation de la biomasse produite. Ensuite, le rendement en grains a augmenté essentiellement grâce à l'indice de récolte.

Le progrès génétique pour la productivité s'est accompagné par une remarquable amélioration du comportement vis-à-vis des parasites dont l'intensification des cultures favorise le développement et l'impact. A la suite des travaux de Schribaux et de Crépin, un matériel génétique remarquable pour ses caractéristiques de résistance a été créé chez le blé à l'égard du charbon, de la carie de la rouille jaune et noire plus récemment de la rouille brune, du piétin verse et de l'oïdium. Certes, la généralisation des traitements fongicides a contribué aussi largement à limiter la gravité des attaques. Mais aujourd'hui, certaines variétés permettent d'économiser un, voire deux traitements fongicides. Demain, des variétés résistantes aux virus et aux nématodes seront proposées.

Les filières d'utilisation du blé se sont diversifiées et transformées. Il y a 100 ans, le blé était presque exclusivement destiné à la fabrication de pain de manière artisanale.

Aujourd'hui le blé sert à l'alimentation animale, il est fractionné en ses composants amidon et gluten. Les techniques des industries de cuisson ont considérablement évolué, la fabrication industrielle du pain a pour conséquence la modification des caractéristiques d'adaptation des farines à cette filière ; la biscuiterie, biscotterie a des exigences très spécifiques.

Les caractéristiques des variétés se sont diversifiées, la quantité et la qualité du gluten se sont considérablement améliorées. « Vilmorin 27 » dont la force boulangère était considérée comme bonne avait un W de l'ordre de 120. Aujourd'hui, « Soissons » a un W de 240.

Le progrès génétique constaté montre que les méthodes de sélection employées ont été et sont efficaces.

De manière encore majoritaire aujourd'hui, la méthodologie de la sélection

employée consiste à créer, par hybridation artificielle entre lignées, des populations hétérozygotes puis à sélectionner par l'étude des descendances et enfin obtenir en une dizaine de générations d'autogamie des invariants génétiques nouveaux : les lignées pures.

C'est la sélection généalogique qui progressivement perfectionnée et adaptée, s'est généralisée. La sélection a lieu en même temps que l'homozygotie se réalise avec un suivi individuel de chaque descendance permettant de conserver la généalogie et de tenir compte des informations en provenance des apparentés pour réaliser la sélection.

D'autres méthodes utilisent la sélection généalogique différée. La *Single Seed Descent* (SSD) ou Filiation Unipare a pour objectif de diminuer le principal inconvénient de la sélection généalogique qui, étant très efficace sur les caractères à forte héritabilité, a pour conséquence de réduire la variabilité disponible pour sélectionner les caractères à faible héritabilité. Elle consiste à différer la sélection après quelques générations d'autofécondation en ne retenant qu'un descendant par plante F2.

La méthode Bulk consiste à différer la sélection après hybridation comme dans le cas de la Filiation Unipare, mais au cours des générations de fixation on effectue une sélection massale en appliquant des pressions de sélection pour des caractères d'importance économique.

Perspectives

Les sélectionneurs ont régulièrement utilisé les meilleures lignées et variétés issues d'un programme de sélection comme géniteurs, avec des lignées venant d'autres programmes ou de l'extérieur pour les croisements de cycle suivant. Peu à peu, le temps entre la réalisation d'un croisement et l'utilisation des lignées qui en sont issues, s'est raccourci et actuellement beaucoup de sélectionneurs utilisent des lignées jeunes, F6 ou F5 et parfois F4 dans leurs programmes de croisements. La sélection récurrente diffère de celle-ci par une intensité de sélection plus faible, par un raccourcissement des cycles, 3 ou 4 ans, et par la réalisation d'un large intercroisement ayant parfois recours à la stérilité mâle.

Jusqu'à aujourd'hui, les variétés de blé largement cultivées sont des lignées pures. Une nouvelle augmentation du potentiel génétique de productivité en grain pourrait se réaliser grâce à l'exploitation de l'hétérosis manifesté à l'état hybride.

La fabrication de semences hybrides chez le blé suppose une modification de la biologie florale. Cette modification soit par la voie génétique, soit par la voie chimique, par un gamétocide, par stérilisation des gamètes mâles, montre que cette espèce est capable d'une adaptation à l'allofécondation. Le meilleur hétérosis « agronomique » observé est de l'ordre de 10 % à un rendement en grain proche de 100 qx/ha. Une nouvelle génération d'hybrides est en cours d'expérimentation en France et prochainement, on pourra apprécier les possibilités de développement de ce type variétal. Le facteur économique décisif sera le coût de production des semences.

L'accélération du progrès génétique peut se réaliser en obtenant des lignées pures plus rapidement que par autofécondation. L'haplodiploïdisation consiste à produire des plantes haploïdes grâce à diverses techniques à partir des gamètes mâles ou femelles à n chromosomes, puis le nombre chromosomique de ces plantes est doublé.

Chacune d'entre elles est ainsi à l'origine, en une seule étape, d'une lignée pure homozygote. L'intérêt de l'haplodiploïdisation est de raccourcir le cycle de sélection et

de disposer directement des produits de la méiose dont le stock chromosomique a été doublé. Il est clair que cette situation facilite grandement les études génétiques et le jugement des lignées. Le développement de cette technique chez le blé dépend de la fréquence d'obtention de plantes haploïdes doublées. Actuellement, le prix de revient d'une lignée pure de blé par cette méthode est encore trop élevé.

L'accélération du progrès génétique peut aussi se réaliser en étant plus précis dans la sélection. Le marquage biochimique et moléculaire des caractères peut constituer un outil d'autant plus précieux pour le sélectionneur que le caractère est difficile à sélectionner. C'est ainsi que le gène majeur de résistance au Piétin verse *Pch1* est lié à la forme B de l'endopeptidase Ep D1. Bientôt d'autres caractères qualitatifs puis quantitatifs seront marqués de manière moléculaire.

Afin d'obtenir une carte moléculaire aussi saturée que possible du génome du blé, différents pays collaborent au sein de l'ITMI *(International Triticae Maping Initiative)* pour identifier des marqueurs moléculaires des caractères tout au long des chromosomes par la technique RFLP.

A plus long terme, la variabilité du blé pourra être élargie en utilisant de l'ADN étranger [2]. Actuellement, on ne connaît pas de système complètement opérationnel de transformation chez le blé mais sans nul doute, ce sera possible dans quelques années. Déjà de l'ADN a été introduit dans des protoplastes de blé par électroporation mais la regénération de plantes à partir de protoplastes transformés reste à mettre au point.

Références

1. Bonjean A, Picard E (1990). *Les céréales à paille.* Softword/ITM.
2. Doussinault G, Kaan F, Lecomte C, Monneveux P (1992). Les céréales à paille. In : Gallais A, Bannerot H eds. *Amélioration des espèces végétales cultivées.* INRA Editions : 13-71.
3. Jonard P (1951). Les blés tendres *(Triticum vulgare will)* cultivés en France. INRA-Paris.
4. Lupton FGH (1987). Wheat breeding, its scientific basis. Chapman and Hall Ltd-London.
5. Mayer R (1962). L'amélioration des plantes en France. Numéro hors série des *Ann Amel Plantes,* vol. 12.
6. Moule C (1994). Rendement en grain et biomasse produite chez le blé tendre d'hiver, effets de la sélection au cours de la première moitié du siècle. *CR Acad Agric France* (sous presse).
7. Zeller FJ (1973). 1B/1R Substitutions and translocations. In : Proc Fourth Int Wheat Genet Symp Univ of Misouri Co : 209-221.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1995, pp. 9-14.

2

La coopération scientifique et technique entre la Communauté Européenne et les pays en développement : application à l'amélioration des plantes

A. DARTHENUCQ

Commission des Communautés Européennes, Bruxelles, Belgique.

La recherche et le développement jouent un rôle prépondérant dans le développement économique et scientifique d'un pays, c'est aujourd'hui reconnu par tous, et un tel auditoire en est certainement totalement convaincu.

Les pays en voie de développement (PED) ont donc besoin, selon ce principe plus que quiconque, d'avoir accès à la Recherche et Développement. Il existe deux manières d'y parvenir : soit en « emprunteur » grâce à des transferts de technologies, en « adaptateur » de recettes, soit en « producteur » de savoir.

On en sait assez pour 20 ans de développement. Qui n'a pas déjà entendu cette phrase ? Il est vrai que les sciences et techniques ne sont pas seules en cause dans le processus, et beaucoup de facteurs limitants du développement ne sont pas d'ordre technique mais plus politique. Cependant, les nombreux échecs de programmes de développement démontrent l'erreur de tels jugements. Les PED doivent produire leur propre connaissance notamment dans les domaines tels que l'amélioration des plantes s'ils veulent faire face au formidable défi alimentaire des prochaines décennies.

Pour l'Afrique, des simulations montrent que, en 1990, le déficit de 10 millions de tonnes équivalent-maïs ne sera retrouvé en 2020 qu'à la condition que la fécondité cumulée diminue de moitié, pour tomber à 3,3 et que la production agricole augmente de 4 % par an. Si le taux de fécondité reste constant et si la production agricole continue à progresser à son rythme actuel, à savoir 2 % par an, le déficit alimentaire passera de 10 millions de tonnes équivalent-maïs en 1990 à 245 millions de tonnes en 2020.

Or, les pays en voie de développement connaissent une crise qui dure depuis maintenant près de 20 ans, et le poids que fait peser le remboursement de leur dette sur leurs finances publiques, auquel s'ajoutent maintenant les conséquences de la politique d'ajustement structurel, font que l'effort pour la recherche scientifique dans les pays en voie de développement, y compris dans des domaines de première priorité, est très largement insuffisant.

Par ailleurs, en tant que scientifiques ou responsables d'organismes de recherche, vous savez bien que, en temps de crise, le budget-recherche est souvent la première source d'économie.

C'est pour tenir compte de cette situation que le Conseil des ministres de la Recherche de la Communauté a décidé, en décembre 1982, sur présentation de la Commission des Communautés Européennes et avec l'avis favorable du PE d'adopter un programme spécifique de coopération scientifique et technique pour le développement, ouvert à tous les pays en voie de développement, maintenant connu sous son sigle STD dans lequel les crédits affectés seraient exclusivement destinés à la recherche.

Par ailleurs, en 1983, le Parlement décidait, en tant qu'autorité budgétaire, de créer une ligne budgétaire spéciale pour la coopération scientifique et technique avec les pays d'Asie et d'Amérique latine, connue aujourd'hui sous l'appellation Coopération Scientifique Internationale (CSI). Chacune de ces deux initiatives est de nature différente et complémentaire, même s'il s'agit dans les deux cas de favoriser la coopération scientifique et technique entre la Communauté Européenne et les pays en voie de développement.

Tous les pays en développement n'avaient pas les mêmes relations avec la Communauté Européenne en 1983. Certains : les pays ACP, certains pays de la Méditerranée (Maghreb, Égypte) bénéficiaient d'accords de coopération avec protocoles financiers, c'est-à-dire que, si ces pays en avaient manifesté le souhait, une partie du montant du protocole financier aurait pu être consacré à leur recherche scientifique.

En revanche, d'autres pays d'Asie et d'Amérique latine avaient des accords de coopération avec la Communauté Européenne mais sans protocole financier. C'est en quelque sorte pour rétablir une forme d'équilibre entre les différents pays en voie de développement qu'à été ouverte cette ligne Coopération Scientifique Internationale. Si je vous ai dit qu'elles étaient de nature différente, c'est parce que ces deux initiatives n'obéissent pas aux mêmes objectifs.

La Coopération Scientifique Internationale, mise en œuvre dans le cadre des accords que la Communauté Européenne entretient bilatéralement avec les pays qui y sont éligibles, est un élément de cette politique de coopération, au même titre que d'autres éléments, et le choix des sujets de recherche est discuté chaque année dans des commissions mixtes au niveau gouvernemental, à l'intérieur de la liste qui va des sciences exactes en passant par les sciences de la terre, les sciences des matériaux, la chimie, les sciences biomédicales, la biologie et les sciences de l'agriculture. Ces dernières représentent, en nombre de contrats et en montant affecté, moins de 15 % du total de ce programme, ce qui correspond actuellement à 77 contrats d'environ 2,5 M écus. Je ne m'étends pas plus sur la Coopération Scientifique Internationale car pratiquement tous les pays bénéficient maintenant de protocoles financiers et la mise en œuvre du Traité de l'Union va entraîner la disparition de cette ligne.

En revanche, le programme scientifique et technique pour le développement est un programme du Programme-cadre pluriannuel de recherche et développement communautaire. C'est-à-dire qu'alors que la Coopération Scientifique Internationale correspond à une approche politique de la coopération scientifique et technique avec les pays

en voie de développement, le programme scientifique et technique pour le développement correspond, quant à lui, à un véritable programme de recherche, c'est-à-dire qu'il privilégie l'approche thématique et qu'il vise à apporter des solutions aux problèmes posés.

Dans ce cas, le choix des thèmes ne relève pas d'une négociation politique avec un pays mais de la décision de la Communauté Européenne de faire porter son effort de coopération dans un secteur bien déterminé.

Comme le programme scientifique et technique pour le développement est un programme ouvert à tous les pays en voie de développement, on a cherché à définir des secteurs de recherche qui pourraient intéresser tous ces pays, quel que soit leur niveau de développement technologique. C'est pourquoi le programme scientifique et technique pour le développement a opté pour l'agriculture et la santé, car ces deux domaines apparaissent comme les secteurs dont le développement est prioritaire dans tous ces pays en voie de développement.

Ce programme est donc un programme de recherche et, en ce sens, il se veut un moyen de faire progresser les connaissances scientifiques indispensables au développement des pays en voie de développement pour augmenter l'efficacité des actions de développement dans les deux domaines que je viens de mentionner.

Mais c'est aussi un programme de coopération et, en ce sens, il veut se différencier de l'aide financière qui se traduit souvent par une aide à l'équipement sans toujours bien se préoccuper de la future utilisation et de la maintenance de cet équipement, de la coopération bilatérale car celle-ci ne relève pas du mandat de la Communauté Européenne mais de ses Etats membres et de la coopération du type Centres Internationaux de Recherche Agronomique, car ce système nous paraît être plus un moyen de trouver des solutions pour les pays en voie de développement que de les faire réellement participer à l'élaboration de celles-ci et donc de favoriser l'accroissement de leur capacité endogène de recherche. Actuellement, les donateurs de ce système étant aussi ceux qui sont sollicités pour les systèmes nationaux de recherche des pays en voie de développement, on pourrait même considérer qu'il y a une compétition entre les systèmes.

C'est-à-dire qu'il se veut un moyen permettant à des scientifiques de la Communauté Européenne et des pays en voie de développement de travailler ensemble sur des sujets de recherche importants pour les pays en voie de développement parce que cette coopération nous paraît être une manière efficace de renforcer les capacités de recherche sur ces sujets, tant dans les PED qu'en Europe, en donnant au mot capacités sa dimension la plus large, et surtout de permettre à ce renforcement de durer.

Cette démarche se veut aussi une valorisation des différentes initiatives des États membres dans ce domaine, tant au titre de la coopération scientifique qu'à celui de la formation.

Créé en 1982, ce programme qui en est aujourd'hui à sa troisième phase a évolué, quant à ses objectifs et quant à ses moyens.

En 1982, à sa création, il se voulait essentiellement un moyen de pallier au désengagement d'une « science tropicaliste » (si je puis dire) des pays membres et à un affaiblissement de la coopération scientifique consécutif à la décolonisation.

Dans STD2 (1987-1991), ces objectifs premiers étaient maintenus mais s'y ajoutaient d'une part l'amélioration des capacités de recherche des pays en développement, et d'autre part le souci de renforcement de la coordination et de la coopération en Europe sur ces sujets, afin de gagner en efficacité et même de créer une synergie entre les différentes initiatives existantes.

Enfin, dans STD3 (1991-1994), on a cherché à promouvoir une approche pluridisci-

plinaire afin de favoriser des solutions plus globales et donc plus facilement utilisables pour le développement. En outre, toujours dans ce souci de meilleur lien avec le développement, la recherche sociale et socio-économique a été prise en compte dans ce programme.

Quant aux moyens financiers, ils ont suivi une courbe intéressante et rare par les temps qui courent puisque le programme est passé de 40 M écus pour STD1 à 85 M écus pour STD2 et à 125 M écus pour STD3.

Ce programme ouvert à tous les pays en voie de développement doit avoir des thèmes qui soient assez larges pour que chacun puisse y trouver ce qu'il cherche et il est vrai qu'entre les pays du Maghreb, ceux d'Afrique sub-saharienne sèche ou humide ou ceux d'Amérique latine et d'Asie, les problèmes ne sont pas les mêmes et les moyens dont disposent ces pays ne sont pas identiques non plus.

En réalité, et c'est un reproche fait à ce programme, la gamme est très vaste et si cela correspond bien à un degré de flexibilité souhaité, la conséquence en est une très grande dispersion.

Les deux grands thèmes pour l'agriculture sont :

– la réduction du déficit alimentaire,

– le développement des productions agricoles à forte valeur économique au plan local et/ou à l'exportation.

Réduction du déficit alimentaire

But Améliorer la production agricole (végétale et animale) dans les zones où les problèmes d'alimentation sont (ou risquent d'être) une priorité.

Études sur

- le fonctionnement des systèmes de production,
- l'amélioration de la production végétale,
- les plantes alimentaires y compris secondaires,
- l'augmentation économe de la production
  - rendement
  - mise en culture de zones incultes,
- le développement de l'élevage et de la pêche,
- l'adaptation d'un système d'élevage aux contraintes du milieu,
- l'augmentation de l'utilisation des ressources locales pour pêche et aquaculture,
- la restauration d'un environnement fragile pour activité agricole adaptée (agroforesterie-régénération-pâturage,...).

Productions agricoles à forte valeur économique

But Fournir une base scientifique aux activités agricoles (exploitation de la forêt et des milieux aquatiques incluse) à forte valeur économique.

Études sur

- les principales cultures d'exportation traditionnelles,
- les cultures secondaires à forte valeur économique,

- certaines cultures alimentaires à forte valeur marchande sur les marchés urbains,
- la régénération et la gestion des ressources forestières,
- la production bio énergie.

Objectifs spécifiques

Qualitatif :
- satisfaire aux normes pour le commerce international,
- améliorer l'acceptabilité des produits sur le marché,
- permettre la transformation sur place.

Quantitatif :
- amélioration des plantes et races,
- réduction des pertes pré- post-récolte,
- amélioration des techniques agricoles et sylvicoles.

Les procédures de mise en œuvre de ce programme sont simples puisque c'est essentiellement au travers de contrats conjoints de recherche qu'elle est réalisée.

Les contrats résultent d'une sélection faite sur des propositions ayant été soumises à la Commission dans le cadre d'un appel d'offre international.

La sélection est faite sur des critères classiques et d'autres plus spécifiques.

Les critères généraux portent sur la qualité scientifique et technique et le caractère innovant du projet (objectifs convaincants et réalisables, méthodologie claire et cohérente avec les objectifs, faisabilité, etc.). Les critères plus spécifiques sont plus liés aux caractéristiques du programme et portent plus sur l'intérêt du sujet pour les pays en voie de développement, l'impact prévisible pour le développement, la qualité de la coopération dans la répartition des tâches. Enfin, en tant que programme communautaire, il nécessite la participation d'au moins deux participants indépendants d'États membres différents et, bien sûr, d'au moins un pays en développement, mais on cherche aussi à favoriser une coopération régionale Sud-Sud.

Comme vous avez pu le constater dans la description des thèmes éligibles, l'amélioration des plantes a bien entendu une place importante dans les deux secteurs agricoles concernés par le programme.

Pour quantifier cette importance, je peux vous dire que, dans STD2, sur les 179 contrats signés en agriculture pour un montant de 52 millions d'Écus, 36 portaient sur l'amélioration des plantes soit 20 % en nombre pour un montant total de 13,9 M écus (26 % en valeur) pour 4 ans.

Dans STD3 (le programme en cours), le premier appel à des propositions en 1991 a permis de conclure 84 contrats en agriculture pour 38,5 M écus dont 13 en amélioration des plantes (soit 15,5 %) pour 8,55 M écus (soit 22,2 % en valeur).

Le 2e appel, clôturé en novembre 1992, a permis la sélection de 33 projets dont 7 traitent de l'amélioration des plantes.

Ainsi donc entre 1988 et 1993, on peut estimer que environ 27 M écus ont été dévolus par le programme scientifique et technique pour le développement à l'amélioration des plantes

L'évolution semble être une légère diminution du nombre de projets retenus en amélioration des plantes, mais une augmentation de leur montant due, essentiellement, à une augmentation du nombre de partenaires.

Nous n'avons pas privilégié dans la sélection un type de plantes plutôt qu'un autre et c'est la stricte application des critères de sélection indiqués qui a déterminé notre choix.

C'est ainsi que des contrats traitent d'espèces alimentaires de base (haricot, sorgho, riz, bananes, plantains), d'autres, des espèces à vocation plus commerciale (ananas) ou

industrielle (arachide) ; des annuelles et des arbustives (noix de cajou, hévéa, *Casuarina*) et englobent les trois thèmes de ces journées, à savoir l'amélioration classique, l'amélioration par culture *in vitro* et celle par génie génétique, ces trois types étant parfois présents simultanément dans un seul projet.

Au cours de ces journées, certains travaux présentés sont d'ailleurs, pour partie au moins, des résultats de contrats scientifique et technique pour le développement (les 3 orateurs qui vont suivre en sont des exemples).

En revanche, si nous ne sommes pas directifs quant aux espèces, nous le sommes plus sur les objectifs de l'amélioration que nous cherchons à promouvoir ; c'est une amélioration qui vise à l'obtention de plantes économes tant en termes de fertilisants que de pesticides, ou d'eau, permettant la mise en valeur de terres nouvelles (sols salés, sols acides) et plus satisfaisante pour les consommateurs, y compris les consommateurs locaux que l'on a tendance à oublier.

C'est dire que l'on cherche à favoriser une démarche totalement différente de celle qui a été prônée, de ce que l'on appelle la révolution verte à laquelle l'Afrique n'a pas participé, et dont on constate aujourd'hui les limites tant en termes de rendement que d'environnement.

Vous voyez bien, et j'en arrive à ma conclusion, que l'on a des objectifs similaires. En lisant sur la brochure-programme les objectifs du réseau Biotechnologie de l'UREF, j'ai retrouvé beaucoup de ceux du programme scientifique et technique pour le développement.

Bien sûr, le programme scientifique et technique pour le développement n'est pas un programme de biotechnologie, vous l'avez bien compris ; bien sûr l'aspect linguistique de la démarche AUPELF/UREF diffère de l'approche multilingue de la Communauté Européenne mais les thèmes prioritaires définis sont parmi ceux que l'on cherche aussi à traiter.

Je voudrais également vous dire combien j'ai apprécié que vous abordiez dans vos journées les trois types d'amélioration.

Je suis un peu inquiet de la place que l'on donne aujourd'hui à l'amélioration par génie génétique non pas que je ne reconnaisse pas tous les progrès que l'on peut en attendre, mais parce qu'il me paraît indispensable de garder certains équilibres et de ne pas sacrifier, par mode, tout à une discipline scientifique si importante soit-elle et cela est d'autant plus vrai lorsque l'on pense au monde tropical. Il y a beaucoup à faire et parfois des méthodes très classiques, même simples, peuvent suffire.

En liaison avec cet aspect, je crois qu'il faut être très vigilant sur les problèmes de formation et je m'adresse ici aux laboratoires européens d'accueil de thésards originaires des pays en voie de développement. Soyez vigilants, quant aux travaux que vous proposez, sur les possibilités qu'aura le jeune chercheur de pouvoir utiliser et valoriser la formation que vous l'aurez aidé à acquérir lorsqu'il retournera dans son pays.

Enfin, je voudrais aussi vous dire qu'en cette période de crise économique en Europe, il ne faut pas trop se leurrer sur les moyens qui seront offerts à la coopération scientifique et technique avec les pays en voie de développement dans le prochain PC (1994-1998) qui est actuellement en discussion au Conseil et au Parlement européen.

C'est pourquoi il faut encourager toute démarche visant à renforcer la coordination, la concertation et même la répartition du travail. La démarche « réseau » est en ce sens très intéressante et très pertinente. Peut-être faudra-t-il aussi envisager une grande discussion à l'échelle internationale sur la répartition des rôles de chacun dans le dispositif de la recherche agronomique tropicale (niveau national, niveau écorégional, niveau international) afin que le défi auquel je faisais allusion en introduction puisse être relevé.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1995, pp. 15-21.

3

L'amélioration du riz en Afrique

J. BOUHARMONT

Laboratoire de Cytogénétique, Université Catholique de Louvain, 4, place Croix-du-Sud 4, 1348 Louvain-La-Neuve, Belgique.

La riziculture a été introduite à des époques relativement anciennes dans plusieurs régions d'Afrique, comme Madagascar, l'Afrique orientale et l'Afrique de l'Ouest. Elle est restée longtemps marginale dans la plupart des pays, l'aménagement des rizières était rudimentaire et les rendements médiocres. Ce retard s'explique surtout par la faible densité des populations. Les conditions ont beaucoup changé depuis quelques dizaines d'années, suite à l'évolution démographique et aux modifications des traditions alimentaires. Le riz a pris une place de plus en plus grande dans l'agriculture et dans l'alimentation de nombreux pays, avec souvent une production locale déficitaire qui doit être compensée par des importations coûteuses. La riziculture africaine actuelle n'occupe cependant qu'une place modeste au niveau mondial et les progrès restent décevants en comparaison de la situation de l'Asie du Sud-Est.

Contraintes

Comparée aux grandes régions rizicoles d'Asie, l'Afrique souffre de plusieurs handicaps. Le premier est la dispersion des faibles moyens disponibles entre de nombreux pays. Les centres de recherche et de sélection sont assez nombreux, mais de taille le plus souvent limitée. Pour les petits pays, une intégration dans des programmes internationaux est indispensable. L'influence de l'IRRI *(International Rice Research Institute)* est restée faible et les conséquences de la révolution verte ne se sont pratiquement pas fait sentir sur le continent africain. L'ADRAO (Association pour le Développement de

la Riziculture en Afrique de l'Ouest) peut jouer un rôle plus important, du moins pour la région où elle est implantée, comme intermédiaire entre les institutions locales et les autres organismes internationaux, par la formation des chercheurs et par la mise en œuvre de programmes communs d'amélioration.

Des associations de chercheurs, telle que la CORAF (Conférence des Responsables de la Recherche Africains), permettent aussi une coordination utile entre les programmes nationaux, sans cependant aboutir à une intégration vraiment efficace. La coopération avec les pays du Nord est une source appréciable de moyens et elle favorise aussi les relations entre pays africains ; les programmes ne sont cependant pas toujours adaptés aux besoins et leur continuité n'est pas garantie.

Les progrès spectaculaires de la riziculture dans certains pays du Sud-Est asiatique s'expliquent par l'introduction de quelques variétés modernes bien adaptées à la culture irriguée, qui est de loin la plus répandue et la plus rentable dans ces régions. En dehors de Madagascar, l'irrigation est peu pratiquée en Afrique et le coût élevé des investissements exclut une forte extension de ce mode de culture. La riziculture pluviale, qui dépend de la pluviosité et d'inondations plus ou moins contrôlées, donne des rendements plus faibles et plus aléatoires, à cause de l'irrégularité de l'alimentation en eau, de la pauvreté des sols et aussi de la présence fréquente de minéraux toxiques (fer, aluminium, sel). En Afrique de l'Ouest, de grandes surfaces sont contaminées par les remontées de chlorure de sodium. Les basses températures représentent un facteur limitant en montagne et pour les cultures effectuées en contre-saison dans les zones proches du Sahel. Un autre type de culture est réalisé dans le delta intérieur du Niger, soumis aux crues du fleuve, où le riz flottant a été introduit.

A cause de cette diversité des modes de culture et des contraintes environnementales, les variétés introduites sont rarement utilisables directement : une amélioration spécifique est nécessaire, mais les variétés ainsi créées ne peuvent généralement pas être distribuées sur des surfaces très importantes. L'amélioration implique donc l'obtention de variétés plus nombreuses, la mise en œuvre d'essais locaux, dans des milieux écologiques différents, mais aussi la recherche de génotypes capables de s'adapter à ces environnement divers ou instables.

Dans plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest, la culture traditionnelle de l'espèce africaine *Oryza glaberrima* se poursuit. Bien que généralement moins productive que les variétés d'*O. sativa*, cette espèce possède des caractères utiles dans certaines conditions, justifiant sa présence dans les programmes de plusieurs centres agronomiques.

Programmes actuels

Les programmes d'amélioration les plus anciens ont été ralentis ou interrompus lors de l'accession des pays africains à l'indépendance. Ultérieurement, de nouveaux projets ont été mis en œuvre par les centres nationaux et internationaux. Beaucoup de ces programmes ont pour objet l'évaluation du germoplasme constitué par les variétés introduites d'autres pays africains et d'Asie : un grand nombre de génotypes sélectionnés ou rassemblés à l'IRRI sont ainsi testés dans des conditions écologiques très diverses. La création variétale est indispensable pour combiner dans une même variété des caractères identifiés dans les collections de travail. Les centres du Sierra Leone, Nigeria, Burundi, Cameroun, Ghana, Tanzanie, entre autres, ont mis sur le marché de nouvelles variétés sélectionnées au cours de ces dernières années.

Les critères principaux sont le rendement et la résistance aux maladies. Parmi ces dernières, la pyriculariose est la plus importante et la résistance stable est surtout recherchée : plusieurs variétés d'Afrique de l'Ouest possèdent un bon niveau de résistance à cette maladie et sont utilisées comme géniteurs dans les croisements. Les maladies virales et bactériennes *(Sarocladium, Xanthomonas)* sont également envisagées, ainsi que plusieurs insectes (chilo, diopsis). La tolérance à diverses contraintes est recherchée : salinité (Sierra Leone), froid (Cameroun, Nigeria, Burundi, Madagascar), fer (IITA, ADRAO), déficit en phosphore (Sierra Leone), sécheresse (IITA). Les qualités culinaires et l'arôme du riz ont souvent été négligés : ces caractères sont cependant explicitement recherchés en Sierra Leone, Tanzanie, Nigeria, Égypte.

La création variétale est basée sur les méthodes traditionnelles : croisement, sélection généalogique, bulk, rétrocroisements. Une sélection récurrente, susceptible de favoriser l'amélioration de la résistance polygénique aux maladies et d'accroître l'adaptabilité des populations, est entreprise à Madagascar. La sélection récurrente est surtout destinée à la création de variétés synthétiques chez les plantes allogames. Elle est applicable aux autogames, surtout quand des gènes de stérilité mâle sont disponibles. La sélection récurrente (avec stérilité mâle récessive) est expérimentée en Côte d'Ivoire pour tenter de rompre les liaisons entre la sensibilité à la pyriculariose et des qualités agronomiques comme le grain long [4].

On reconnaît l'intérêt de certains génotypes d'*O. glaberrima* et de plusieurs espèces sauvages d'*Oryza* pour l'amélioration de la rusticité, mais il ne semble pas que leur utilisation soit envisagée à court terme pour l'amélioration variétale en Afrique.

La mutagenèse artificielle est expérimentée en Égypte pour tenter d'améliorer la teneur en protéines : la variabilité serait accrue en M2 et M3 après irradiation et la teneur en protéine atteint 13,3 % dans certaines descendances.

La mutagenèse, la culture d'anthères pour l'obtention de lignées homozygotes, les analyses d'enzymes et la recherche de marqueurs biochimiques sont appliquées à des programmes d'amélioration, en particulier en Côte d'Ivoire, mais ces programmes sont conçus dans le cadre de projets européens et réalisés en partie en dehors de l'Afrique. C'est également le cas pour des essais au champ de mutants sélectionnés à partir de cultures de cellules somatiques (Burundi, Togo, Sénégal).

Méthodes modernes d'amélioration

Après l'expansion très rapide des variétés semi-naines de l'IRRI dans beaucoup de pays d'Asie, d'autres progrès spectaculaires ont été faits ou peuvent être attendus dans un avenir assez proche. La mise au point et l'exploitation sur grande échelle des semences hybrides a fortement accru la production rizicole en Chine. Cette voie est basée sur l'utilisation de la stérilité mâle cytoplasmique et sur le choix de combinaisons parentales conduisant à un niveau élevé d'hétérosis.

Après avoir été négligée pendant plusieurs dizaines d'années, l'hybridation interspécifique a trouvé de nouvelles applications chez le riz, particulièrement à l'IRRI. Les croisements entre le riz cultivé et des espèces spontanées éloignées, diploïdes ou tétraploïdes, donnent des hybrides grâce à la culture *in vitro* des embryons. Malgré l'homologie chromosomique réduite et la forte stérilité des hybrides, des rétrocroisements sont possibles. La faible affinité entre les génomes facilite un retour rapide au génome et aux caractéristiques du parent récurrent cultivé. L'application de pressions sélectives au

cours des premières générations a permis de transférer au riz des caractères d'*Oryza officinalis* et d'*O. minuta* : résistance aux insectes, à la pyriculariose et à la bactériose [1, 2].

En 1983, la fondation Rockefeller, qui avait déjà participé à la création de l'IRRI, a organisé et financé un programme international sur la biotechnologie du riz. Dans ce cadre, une carte génétique comprenant 4 000 marqueurs RFLP a été établie : elle est utilisée pour localiser des gènes de résistance aux insectes, aux maladies et à la salinité. Les transformations génétiques sont peu efficaces chez les graminées : l'incorporation des gènes codant pour les toxines de *Bacillus thuringiensis* et pour une protéine virale n'a pas encore abouti à des résultats pratiques : l'utilisation de particules accélérées semble être la voie la plus efficace. La fusion de protoplastes de riz et de *Porteresia coarctata* est tentée pour accroître la tolérance à la salinité des variétés cultivées. L'introduction de gènes de légumineuses est envisagée pour déclencher la fixation de l'azote par des *Rhizobium* associés aux racines de riz. Un autre objectif plus ou moins lointain est l'induction ou l'introduction de gènes d'apomixie, qui permettrait la propagation aisée du riz hybride [5].

Pour l'exécution de son programme, la fondation Rockefeller fait appel à de nombreux laboratoires spécialisés dans divers domaines et répartis dans le monde, mais l'Afrique n'est pas représentée dans ce réseau. Beaucoup de recherches actuellement entreprises sont aléatoires, certaines peuvent même sembler utopiques, d'autres n'auront pas d'incidence prochaine sur la riziculture. Le riz hybride n'est rentable que si les rendements des variétés homozygotes sont déjà élevés ; son utilisation demande aussi une infrastructure adéquate pour la production et la distribution de la semence. La plupart des biotechnologies exigent un équipement coûteux et un personnel qualifié. Ces conditions sont difficiles à rencontrer en Afrique ; par ailleurs, il serait inutile de répéter, avec des moyens insuffisants, des essais déjà réalisés ailleurs.

Il serait cependant dangereux d'attendre passivement les retombées de recherches qui s'effectuent dans le reste du monde. Les pays et institutions participant à un programme international veillent à faire adopter des objectifs qui les intéressent plus particulièrement. On peut donc penser que les nouvelles variétés qui résulteront tôt ou tard de l'application des méthodes modernes d'amélioration répondront d'abord aux contraintes de l'environnement et aux souhaits des producteurs de régions où les rendements sont déjà les meilleurs. Au contraire, comme pour les révolutions précédentes de l'agriculture, l'Afrique risque d'être peu concernée par les effets bénéfiques attendus des nouvelles technologies.

Il est donc indispensable que, dans les pays africains où la riziculture, et plus généralement la production agricole, doivent être développées, des laboratoires atteignent un niveau justifiant leur insertion dans les programmes internationaux, ce qui facilitera leur accès aux retombées qui en découlent. Il n'est pas réaliste de choisir actuellement des orientations hasardeuses, comme la production de plantes transgéniques, d'hybrides somatiques ou l'induction de l'apomixie. Il est préférable de se limiter à des objectifs réalisables à court terme, exigeant un investissement moindre.

L'emploi de marqueurs biochimiques est un de ces objectifs : il facilite la sélection de gènes difficiles à identifier comme ceux qui contrôlent la résistance horizontale des plantes aux parasites et maladies. Les cultures *in vitro* peuvent aussi avoir des applications rapides et leur maîtrise facilitera le passage à des techniques plus sophistiquées dont l'utilisation peut s'avérer utile dans l'avenir. La culture d'anthères est bien maîtrisée chez le riz, où elle est appliquée pour l'obtention d'haploïdes et de lignées homozygotes, accélérant ainsi la production de variétés-lignées après hybridation. La variation

somaclonale est une source importante de mutations chez le riz : la régénération de plantes à partir de cals permet de modifier favorablement des caractères spécifiques dans des variétés déjà sélectionnées.

Variation somaclonale et sélection *in vitro*

Chez de nombreuses espèces, des modifications temporaires ou stables ont été décrites dans les lignées de cellules en culture, ainsi que dans les plantes régénérées à partir de ces cellules. L'ampleur de cette variation somaclonale diffère beaucoup suivant les espèces : elle est remarquable chez le riz [3]. L'utilité des mutations induites par la culture *in vitro* peut être accrue si une sélection est exercée au niveau des cellules, de manière à réduire le nombre de plantes à tester en laboratoire et au champ après régénération. Un tel programme a été entrepris à l'Université de Louvain, avec la participation de la Direction de la Recherche Agronomique du Togo, des universités du Burundi et de Dakar et de l'ADRAO. Des descendances de plantes régénérées à partir de cals ont été cultivées au Togo pendant 8 générations. Leur observation a confirmé la fréquence élevée des modifications induites chez le riz par la culture *in vitro* : pour certains caractères, plus de 80 % des plantes diffèrent de la variété d'origine. Les familles restent parfois hétérogènes pendant plusieurs générations, mais des lignées stables peuvent ensuite être isolées. Bien que la majorité des lignées modifiées soient moins intéressantes que la variété d'origine, certaines sont améliorées pour un ou plusieurs caractères agronomiques : chaume plus court, réduction de la période de végétation, longueur de la panicule, poids de 1 000 grains, résistance à la pyriculariose. Enfin, l'étude des hybrides F1 et F2 entre mutants et variétés parentales démontre l'hérédité mendélienne (le plus souvent monogénique) des caractères sélectionnés.

L'application de pressions sélectives aux cellules en culture doit, en principe, augmenter la proportion de plantes modifiées dans les populations régénérées. Les facteurs qui ont été expérimentés sont le froid, le chlorure de sodium et les sels d'aluminium. Une toxine extraite d'une bactérie *(Xanthomonas fuscovaginae)* semble aussi agir sur les cellules indifférenciées. Les durées de traitement, les températures et concentrations appliquées aux cals sont choisies de manière à arrêter la prolifération des cellules normales ou à provoquer leur nécrose. Plusieurs lignées ont été régénérées à partir de cals sélectionnés à 13 °C et cultivées en saison froide au Togo : elles ont donné une production normale ou plus ou moins nettement améliorée par rapport à la variété d'origine, sensible au froid. D'autres tests effectués en phytotron et dans des marais situés à des altitudes élevées (1550-1650 m), au Burundi, ont confirmé le meilleur comportement de certaines lignées aux points de vue croissance, fertilité et production. Ces lignées tolérantes dérivent de cals sélectionnés et non sélectionnés par culture à des températures sublétales.

La tolérance à la salinité est probablement le caractère qui a été le plus souvent sélectionné *in vitro*, chez le riz comme chez d'autres espèces. Chez le riz, un certain nombre de lignées régénérées montrent effectivement une amélioration des taux de survie en présence de concentrations en NaCl inférieures à 50 mM. Cultivées dans un milieu contenant du sel, les plantes sélectionnées contiennent plus de potassium dans leurs racines que les plantes non sélectionnées. Ces différences n'apparaissent pas au niveau des feuilles.

La tolérance à l'aluminium est plus difficile à estimer et à sélectionner *in vitro*,

parce que la solubilisation de ses sels dans les milieux de culture implique des modifications importantes de la composition minérale des solutions et un abaissement du pH qui peuvent avoir aussi un effet sélectif. Une tolérance stable à l'égard de l'aluminium a été observée dans plusieurs lignées après application de divers types de sélection, en particulier par culture de cals sur des milieux modifiés, mais dépourvus d'aluminium. Cette tolérance peut être due à divers facteurs, différents des mécanismes qui agissent chez des variétés tolérantes. Au niveau des cellules, elle se manifeste par une diminution de la pénétration de l'aluminium et par le maintien de concentrations suffisantes en phosphore et calcium, malgré la pauvreté du milieu en ces éléments. Au niveau de la plante, l'absorption de l'aluminium par les racines est moindre, ainsi que son transport vers la partie aérienne.

Conclusions

Comparée à d'autres grandes régions du monde, l'Afrique se caractérise, dans l'ensemble, par une productivité faible de la riziculture, par des progrès lents, par une utilisation négligeable des biotechnologies et autres méthodes modernes, et par une faible participation aux grands programmes internationaux.

Les sélectionneurs africains utilisent presque exclusivement les méthodes traditionnelles d'amélioration. Ces méthodes gardent toute leur valeur, mais certaines difficultés pourraient être évitées si elles étaient complétées par d'autres moyens. L'utilisation de marqueurs (RFLP) doit faciliter l'identification de gènes utiles, surtout pour la résistance aux maladies. L'haplodiploïdisation est un outil permettant d'accélérer le rétablissement de l'homozygotie après des croisements simples ou multiples : elle est donc utile lorsque le but de l'amélioration est la production de lignées pures. La variation somaclonale peut être avantageuse pour l'amélioration de caractères particuliers, surtout la tolérance à l'égard de facteurs de l'environnement. Ces applications des cultures *in vitro* ont aussi un intérêt indirect : ouverture aux programmes de biotechnologie, possibilité de faire connaître les besoins de la riziculture africaine et de profiter ultérieurement des progrès qui seront réalisés dans ce domaine.

La sélection récurrente est proposée dans quelques pays, afin de favoriser le brassage de gènes apportés par plusieurs géniteurs et de rompre des liaisons entre gènes favorables et défavorables, surtout pour l'amélioration de la résistance stable aux maladies. En général, on prévoit de rétablir ensuite l'homozygotie, éventuellement par culture d'anthères, afin de créer des lignées possédant les nouvelles combinaisons géniques. On espère isoler ainsi des lignées qui concilient la résistance stable aux principales maladies et une bonne productivité. Cependant, il est probable que la diversité génétique des populations obtenues à la suite de croisements multiples est le principal responsable de leur rusticité ; cet avantage risque de ne pas persister dans les lignées qui en découleront. Des variétés synthétiques, contenant éventuellement des gènes de stérilité mâle pour maintenir un certain niveau d'hétérozygotie, semblent préférables aux variétés-lignées dans beaucoup de régions d'Afrique. Ces populations devraient mieux s'adapter aux fluctuations de l'environnement (climat et maladies) et pourraient être cultivées dans des régions plus vastes que les lignées.

Références

1. Amante-Bordeos A, Sitch LA, Nelson R, Dalmacio RD, Oliva NP, Aswidinnoor H, Leung H (1992). Transfer of bacterial blight and blast resistance from the tetraploid wild rice *Oryza minuta* to cultivated rice, *Oryza sativa*. *Theor Appl Genet* 84 : 345-354.
2. Jena KK, Khush GS (1990). Introgression of genes from *Oryza officinalis* Wall ex Watt to cultivated rice, *O. sativa*. *Theor Appl Genet* 80 : 737-745.
3. Oono K (1982). Characteristics of mutation in cultured rice tissues. Proc. 5th. Intern. Cong. Plant Tissue and Cell Culture : 409-410.
4. Vales M (1992). Recurrent selection for partial rice blast resistance in Côte d'Ivoire. XIIIth Eucarpia Cong., Book of Poster Abstr : 595-596.
5. Van Roozendaal G (1993). The international program on rice biotechnology. *Biotechnology and Development Monitor* 15 : 20-21.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1995, pp. 23-30.

4

Ecophysiologie et amélioration des plantes, une relation utile?

J. F. LEDENT[1], P. GIRARDIN[2]

1. *ECOP, Grandes Cultures, Université Catholique de Louvain, 2, place Croix-du-Sud, 1348 Louvain-La-Neuve, Belgique.*
2. *Station de recherches « Grandes Cultures » INRA, 28, rue de Herrlisheim, BP 507, 68021 Colmar, France.*

Depuis le début du siècle, les rendements n'ont cessé d'augmenter et le potentiel est loin d'être atteint, les courbes d'augmentation des rendements ne semblant pas devoir s'infléchir à court terme. La part jouée par l'amélioration est difficile à évaluer exactement, mais il ne fait aucun doute qu'elle est considérable (de l'ordre de 50 % du total). Ce travail de sélection a été réalisé essentiellement par des méthodes conventionnelles, de façon pragmatique, faisant appel à la fois à l'intuition et à l'empirisme, la démarche du sélectionneur restant, partiellement au moins, un art. Il a consisté essentiellement en une sélection directe pour le rendement, ainsi qu'en une sélection de caractères permettant de diminuer l'impact des aléas de la production agricole : résistance aux contraintes biotiques et abiotiques, résistance à la sécheresse, au froid, à la verse, aux maladies [13, 32, 35]. Tout cela a été réalisé sans avoir recours à des études physiologiques ou écophysiologiques approfondies [13, 17, 27].

Cela amène le physiologiste à un constat d'humilité : avec seulement en arrière-plan une connaissance plus ou moins diffuse des mécanismes de fonctionnement de la plante, les sélectionneurs ont augmenté et régularisé les rendements de façon impressionnante et leur succès continue. La physiologie n'a joué qu'un rôle indirect et fort secondaire. On peut dès lors s'interroger sur les raisons de cet état de choses, et sur l'opportunité ou non de rechercher dans le futur une plus grande collaboration entre physiologistes et améliorateurs.

Indicateur de supériorité physiologique : un choix réussi par les améliorateurs

Un examen plus approfondi montre assez rapidement que sans avoir un rôle direct de premier plan, la physiologie (l'écophysiologie [1]) a imprégné de façon diffuse divers aspects de l'agronomie, et notamment la phytotechnie (conduite des cultures) et l'amélioration végétale. Que ce soit pour la suggestion ou la justification (après coup) des pistes à suivre, l'interprétation des résultats obtenus et l'élimination de fausses pistes, ses apports indirects, bien que difficiles à préciser, semblent loin d'être négligeables.

De plus, la physiologie a joué un rôle plus fondamental qu'il ne paraît à première vue. En changeant la constitution génétique du matériel végétal, on amène presque invariablement un changement des propriétés morpho-physiologiques de la plante [18]. D'autre part, les deux grands critères de sélection (rendement et résistance aux contraintes) impliquent des processus particulièrement intégrateurs : quasiment tous les caractères physiologiques sont concernés ; on peut penser qu'il en sera de même pour une amélioration de la qualité. Sans s'en rendre peut-être toujours compte, les améliorateurs ont donc ainsi sélectionné des génotypes ayant des caractères physiologiques supérieurs, l'ensemble des caractères physiologiques pouvant être touchés [12, 13].

Le choix du rendement ou de la résistance aux contraintes du milieu comme indicateur de la supériorité physiologique de génotypes est un choix parfaitement logique... que l'on soit améliorateur ou physiologiste, et il explique sans doute une bonne part des succès obtenus en amélioration.

Pourquoi la physiologie n'a-t-elle joué qu'un rôle indirect dans le passé ?

Si la physiologie sous-tend en quelque sorte les succès obtenus en amélioration, force est de reconnaître que le rôle direct des physiologistes a été fort restreint.

Diverses explications peuvent être fournies.

1) Les études physiologiques sont, le plus souvent, trop ponctuelles, trop ciblées sur des aspects trop limités, trop spécifiques. L'améliorateur est concerné en premier lieu par le rendement et la résistance aux contraintes, intégrant l'ensemble de la physiologie du végétal (et ses interactions avec le milieu). Or, si ces caractéristiques sont affectées pour chaque processus physiologique pris séparément, le lien reste fort partiel ; il est d'autant plus faible que le niveau d'intégration du processus est peu élevé, ce qui limite fort l'intérêt de ce genre de travaux pour l'améliorateur [13, 35].

Le cas des travaux sur la nitrate réductase est exemplaire à cet égard. La nitrate réductase est un enzyme clé du métabolisme azoté dont le niveau d'activité (ANR) montre une grande variabilité génotypique, et est fortement héritable. Toutefois dans les programmes de sélection, la base génétique est souvent trop étroite et ne permet pas la mise en évidence de différences suffisamment importantes pour avoir la chance d'être liées au rendement. Ainsi, il n'a pas été possible de trouver une relation avec le rendement en champ. Il en est de même pour les mesures ponctuelles de photosynthèse

1. Ecophysiologie : étude du comportement de la plante et du peuplement en fonction des facteurs du milieu.

potentielle (l'échec s'explique sans doute, en partie, par le faible lien entre ces mesures et l'évaluation de la photosynthèse de l'ensemble du feuillage au cours de la saison).

2) L'améliorateur a besoin d'une connaissance globale de la plante, or notre connaissance des processus d'intégration dans la plante et dans l'ensemble plante x milieu reste fort fragmentaire [25, 30]. Que savons-nous, en profondeur, des processus régulateurs et des interactions entre réactions enzymatiques (les activités *in vitro* ne correspondent pas à celles observées *in vivo*) ? La même question se pose au sujet des relations source-puits, du rôle des hormones, du fonctionnement du système racinaire [30] et même, ce qui semble incroyable (pour des processus aussi fondamentaux), des limitations imposées par la photosynthèse potentielle et les respirations à l'accumulation de biomasse [2, 18]...

3) De remarquables progrès ont été réalisés dans la mise à la disposition des chercheurs d'appareils de mesure portables, utilisables en champ (mesure de photosynthèse, poromètres, mesure de la lumière et de l'indice foliaire, mesure de la fluorescence de la chlorophylle, mesure non destructive de chlorophylle, etc.), et dans la mise au point par une équipe d'écophysiologistes de l'INRA Colmar d'un instrument permettant d'étudier la verse en végétation du maïs de façon beaucoup plus satisfaisante que les anciens tests d'arrachage, etc.

Dans l'ensemble toutefois, le manque de techniques (procédures, équipements) simples, rapides, fiables, non destructives, permettant un criblage efficace et précoce sur la base de caractères physiologiques, au sein de populations importantes, est ressenti fortement malgré quelques rares exceptions [3] et des controverses [12]. On peut comprendre la frustration des sélectionneurs à cet égard [12, 31]. Pourtant des espoirs sont permis. On citera, par exemple, un test simple de tolérance au stress comme celui proposé par Tollenaar et Mihajlovic [36], dans le cas du maïs et basé sur la similitude qu'il y aurait entre l'effet de stress au niveau membranaire et celui de certains herbicides.

4) La lisibilité et le type de présentation des résultats acquis par les physiologistes n'ont pas toujours contribué à leur utilisation par les améliorateurs. Malgré de notables exceptions, il y a trop peu de publications de synthèse pouvant présenter un intérêt pour le sélectionneur (et l'agronome). La publication d'ouvrages comme ceux traitant de la physiologie du maïs présentés par l'INRA et l'AGPM [6, 29] mérite d'être encouragée. On citera aussi des monographies auxquelles physiologistes et améliorateurs ont contribué [14, 18, 34] à côté des synthèses classiques écrites par les physiologistes [5, 26, 39...].

Un effort plus important pourrait être consenti en Europe par le biais d'associations comme l'AUPELF ou la Société Européenne d'Agronomie et de son journal *(European Journal of Agronomy)*.

5) Les méthodes traditionnelles de sélection ont donné et continuent à donner des résultats remarquables, alors que les programmes où une utilisation plus directe de la physiologie a été tentée ne se sont pas toujours distingués par des résultats supérieurs [10].

Des caractères tels que l'activité de la nitrate réductase [13], le taux potentiel de photosynthèse ou le port de la plante (angle foliaire, etc.) se sont avérés plutôt être des fausses pistes qu'autre chose.

Chez le maïs comme chez le blé, les augmentations considérables de rendement ont

été obtenues sans augmentation sensible de la biomasse ou du taux potentiel de photosynthèse (par unité de surface foliaire) [1, 35].

En Ontario, bien qu'aucun indicateur de stress n'ait été utilisé, la sélection classique a produit des hybrides de maïs plus résistants [35].

On n'a jamais vraiment pu établir un lien direct entre le port particulier (géométrie du feuillage) d'un génotype et ses performances agronomiques [13], chez les céréales à paille. Malgré des controverses [2], le diagnostic sur l'avantage éventuel d'un port dressé est plutôt négatif [19, 32]. Les riz très performants produits par l'IRRI ont un port dressé, alors que dans le cas des blés produits par le CIMMYT, les feuilles sont longues et tombantes [32]. La situation est plus complexe qu'il ne paraît souvent à première vue. Dans le cas du maïs, l'amélioration potentielle apportée par le port dressé peut avoir été masquée par les réorientations d'azimuths des feuilles [8, 9] ; par ailleurs, l'angle foliaire chez le blé est un caractère complexe, évoluant au cours du temps, sensible au stress hydrique, etc. [20, 28].

Ce qui s'applique aux caractères morpho-physiologiques s'applique aussi, mais dans une moindre mesure, à la sélection pour les composantes du rendement.

Les variétés modernes se caractérisent par une force des sources et des puits plus importante. En ce qui concerne les puits, le nombre de grains par m^2 est plus élevé chez les cultivars récents [2], ce qui s'explique par un nombre de grains par épi plus élevé [24], ou, de façon plus nette, par un nombre de plantes au m^2 plus important, permis, chez le blé, par l'utilisation de raccourcisseurs, et, chez le maïs, par une meilleure résistance à la verse. En ce qui concerne la source, l'indice foliaire a augmenté, suite au nombre plus élevé de tiges au m^2 chez le blé [32] et à une durée de surface foliaire verte prolongée chez le maïs.

Les variations de rendement par épi (entre génotypes ou à l'intérieur d'un même génotype) sont associées plus étroitement au nombre de grains, ce qui souligne l'importance de la phase de formation du nombre de grains pendant la montaison et à des implications profondes sur les relations entre caractères morphologiques et rendement [21, 22].

6) Les physiologistes se sont peut-être trop peu souciés des caractéristiques génétiques des caractères qu'ils étudiaient et plus particulièrement de l'héritabilité, aspect essentiel pour l'utilisation d'un caractère en amélioration, ou encore de l'hétérosis, de l'aptitude à la combinaison, etc.

De plus, la majorité des caractères physiologiques sont hérités de façon quantitative, étant sous le contrôle de nombreux gènes avec petits effets individuels [27, 32]. Cela rend difficile l'identification des génotypes intéressants. A cela, il faut ajouter les complications venant des gènes à effet pléiotropique et de l'importance des interactions génotypes x milieu [1, 13...].

Des liens génétiques peuvent n'avoir qu'une faible base physiologique (cas de corrélation entre caractères due aux liaisons (linkage) entre des gènes), mais l'inverse est également vrai. Les corrélations entre organes peuvent être le reflet de leur histoire commune (méristèmes d'où ils sont issus, succession de contraintes communes auxquelles ils ont été soumis pendant la croissance) ou encore d'une interdépendance fonctionnelle (hormones, assimilats, etc. [23]). Les raisons des liens entre caractères morpho-physiologiques et rendement sont loin d'être toujours évidentes et les risques d'erreurs d'interprétation sont nombreux.

Quoi qu'il en soit, les « idéotypes » proposés dans la littérature (par exemple [4]) n'ont jamais joué qu'un rôle fort mineur [13], le concept de type de plante idéal s'avé-

rant peu généralisable, vues les interactions avec le milieu [2] et peu convaincant, vue la complexité.

7) On a parfois associé la faible utilisation des acquis de l'écophysiologie des plantes de culture au développement récent de cette discipline [33]. Les améliorateurs ne pouvaient pas attendre les résultats des travaux des physiologistes pour travailler [12]. Les résultats seraient venus trop tard, et ne pouvaient servir qu'à des tentatives d'explication après coup du choix effectué et des résultats acquis. Cela est vrai dans une certaine mesure, mais doit être nuancé en notant que les racines de l'écophysiologie remontent à la fin du siècle dernier, époque à laquelle il a été reconnu qu'un suivi de la croissance était requis (voir Johnson, 1868, Robertson, 1907, Blackman, 1919 cités par Hunt [15], [11, 32,...]).

Les concepts d'indice foliaire de structure de couvert végétal, de distribution d'assimilats, etc. sont apparus dans les années 40 [11]. Les méthodes d'analyse de la croissance consistant à mettre en relation croissance en poids sec et surface foliaire, par le biais de paramètres tels que le taux net d'assimilation, indice foliaire, la durée d'activité du feuillage, etc. (voir par exemple Watson [37, 38]) sont apparues dans les années 20 et sont restées de mode dans les pays anglo-saxons jusque dans les années 60. Le rôle plus important (par rapport à celui du taux d'assimilation) de la surface foliaire et de sa durée, déjà mis en évidence par ces méthodes, a été largement confirmé par la suite (voir par exemple le cas de l'amélioration du maïs [35]).

Quel rôle futur pour la physiologie en amélioration des plantes ?

Les recherches physiologiques et, plus particulièrement celles en écophysiologie des grandes cultures, ont permis d'accumuler un ensemble impressionnant de connaissances sur le fonctionnement des plantes, malgré l'importance des lacunes qui subsistent. Une liste des acquis a été présentée notamment par Hageman et Lambert [13] et par Girardin [10]. Nous retiendrons spécialement les études de l'élaboration séquentielle du rendement (mise en place des composantes, remplissage du grain, redistribution des assimilats) et la mise en évidence de l'importance du stade de développement sur les besoins en fournitures d'assimilats (carbone, azote). Ces connaissances ont permis l'élaboration de modèles déterministes de croissance (par exemple CERES-Maize, Jones et Kiniry [16]) dont l'un des objectifs était l'utilisation pour de la simulation et qui devraient s'avérer utiles pour faire le lien entre différents niveaux d'intégration.

Il faut mentionner aussi les travaux très nombreux sur la résistance aux contraintes abiotiques, même si cette problématique reste encore mal connue. Des exemples réussis d'amélioration de la tolérance aux stress abiotiques (adaptation à des sols acides, salins, ou encore à des sols déficients ou toxiques en certains éléments mineurs) sont d'ailleurs rapportés dans la littérature [18, 32]. La compréhension de certains mécanismes liés au photopériodisme (utilisation en floriculture notamment) et toutes les expérimentations qui ont été à l'origine des techniques de cultures de tissus (comme outil jouant un rôle indirect en amélioration) sont d'autres exemples de contribution utile. On retiendra aussi la mise en évidence de l'importance de la durée d'activité du feuillage *(stay green)* par exemple dans le cas du maïs [35].

Il semble parfaitement logique que les acquis de la physiologie doivent un jour profiter aux agronomes et plus particulièrement aux sélectionneurs.

Plus précisément, l'écophysiologie peut fournir aux agronomes et aux améliorateurs des informations et/ou des outils issus de trois démarches.

1) L'analyse écophysiologique du progrès génétique devrait permettre d'en dégager les bases physiologiques, et, ainsi, orienter et rendre encore plus efficace le travail futur d'amélioration.

2) Le travail des écophysiologistes pourrait faciliter la mise au point de techniques ou d'appareils permettant l'utilisation, dans les programmes d'amélioration, de critères connus mais jusqu'alors inaccessibles aux sélectionneurs, faute d'outils adéquats.

3) Une troisième démarche consisterait à extraire, à partir des connaissances acquises en physiologie, de nouveaux critères de sélection. Elle permettrait d'orienter les biologistes moléculaires dans le choix des caractères génétiques à essayer de modifier par ingéniérie génétique [2]. Remarquons qu'en retour la physiologie devrait largement profiter de la meilleure compréhension des processus physiologiques qu'on devrait obtenir quand on sera capable de manipuler des gènes multiples [35].

Les moyens apportés par les connaissances physiologiques et l'ingéniérie génétique devraient assurer, en conjonction avec les méthodes classiques de sélection, une continuation de l'amélioration de la production agricole, et une adaptation meilleure et plus rapide aux contraintes de plus en plus changeantes de l'agriculture : protection de l'environnement, nouvelles utilisations et donc nouveaux critères de qualité, etc. [1, 27, 31]. L'utilisation de caractères physiologiques, conjointement à celle d'un modèle génétique adéquat et des nouvelles techniques issues de la biologie moléculaire (utilisation de marqueurs moléculaires, etc.) semble très prometteuse.

Un certain empirisme sera toujours nécessaire (nous connaissons trop peu de choses encore, pour prédire, à coup sûr, les effets de certaines modifications génétiques). Les caractères physiologiques, s'ils sont mesurables facilement, suffisamment héritables, liés génétiquement avec le rendement, pourraient être utilisés comme caractères secondaires dans le cas d'une sélection indirecte, multicaractères pour le rendement [7].

Les perspectives de la physiologie sont peut-être meilleures en agronomie (conduite de culture) qu'en amélioration des plantes [27, 30], mais il semble tout à fait inopportun de négliger pour autant les apports potentiellement considérables de la physiologie à l'amélioration. La mise au point d'indicateurs, de tests simples et rapides permettant de déceler précocement les génotypes aux caractéristiques intéressantes, semble une tâche particulièrement importante. Le test de rusticité du maïs basé sur la fluorescence de la chlorophylle est un exemple de ce type [36].

Conclusion

Les acquis indéniables de l'écophysiologie ont eu, jusqu'à présent, un impact direct faible sur l'amélioration génétique. On peut toutefois espérer que cet impact limité indique que les potentialités de l'écophysiologie n'ont pas encore été suffisamment exploitées, ou que les connaissances sont encore loin d'être suffisantes, plus qu'une inutilité ou une inadéquation de principe de cette discipline.

L'écophysiologie de ces dernières décennies a sans doute quelquefois manqué à son rôle en n'étudiant pas à la fois le comportement des lignées parentales et celui des

hybrides, en n'approfondissant pas certains concepts (la vigueur au départ, par exemple), en ne fournissant pas aux améliorateurs des techniques suffisamment adaptées à leurs besoins, ou même, en suggérant de fausses pistes. Elle a toutefois contribué à une meilleure compréhension des progrès réalisés et a apporté des outils utiles à la sélection pour la tolérance aux stress abiotiques.

Nous sommes persuadés qu'une meilleure collaboration entre phytotechniciens, écophysiologistes, biologistes moléculaires et améliorateurs ne pourrait qu'être bénéfique pour chacune des parties.

Références

1. Austin RB, Flavell RB, Henson IE, Lowe HJB (1986). *Molecular biology and crop improvement.* Cambridge : Cambridge University Press. 114 p.
2. Austin RB (1988). A different ideotype for each environment. In : Jorna ML, Slootmaker LAJ, eds. *Cereal breeding related to integrated cereal production.* Wageningen : Pudoc : 47-58.
3. Blum A (1989). Breeding methods for drought resistance. In : Jones MG, Flowers TG, Davies WG, eds. *Plants under stress.* Series of SEB symposium. Cambridge : Cambridge University Press : 197-213.
4. Donald CM (1968). The breeding of crop ideotypes. *Euphytica* 17 : 385-403.
5. Evans LT (1975). *Crop physiology some case studies.* Cambridge : Cambridge University Press, 374 p.
6. Gallais A (1984). *Physiologie du maïs.* Paris : INRA, 574 p.
7. Gallais A (1984). Use of indirect selection in plant breeding. In : Lange W, Zeven AC, Hogenboom NG, eds. *Efficiency in Plant Breeding.* Proc. of the 10th Congress of Eucarpia. Wageningen : Pudoc : 45-60.
8. Girardin Ph (1992). Leaf azimuth in maize canopies. *Eur J Agronomy,* 1 : 91-97.
9. Girardin Ph, Tollenaar M. (1992). Leaf azimuth in maize : origin and effects on canopy patterns. *Eur J Agronomy,* 1 : 227–233.
10. Girardin Ph (1993). *Ecophysiologie : méthodes, limites et acquis. Exemple du maïs grain.* Mémoire pour le diplôme d'habilitation à diriger des Recherches. INRA, Colmar, 60 p.
11. Goldsworthy PR, Fisher NM (1984). *The physiology of tropical crops.* Chichester : J. Wiley and Sons, 664 p.
12. Gusta LV, Chen THH (1987). The physiology of water and temperature stress. In : Heyne FG, ed. *Wheat and wheat improvement* (2nd ed.). Madison : ASA, CSSA, SSA : 116-150.
13. Hageman RH, Lambert RJ (1988). The use of physiological traits for corn improvement. In : Sprague GF, Dudley JW, eds. *Corn and corn improvement* (3rd ed.). Madison : ASA, CSSA, SSA : 431-461.
14. Heyne FG (1987). *Wheat and wheat improvement* (2nd ed.). Madison : ASA, CSSA, SSA, 765 p.
15. Hunt R (1978). Plant growth analysis. *The institute of biology's studies in biology* n° 96. London : Edward Arnold, 67 p.
16. Jones CA, Kiniry JR (1986). CERES-Maize. *A simulation model of maize growth and development.* College Station : Texas A§M University Press, 194 p.
17. Konzak CF (1987). Mutation and mutation breeding. In : Heyne FG ed. *Wheat and Wheat improvement.* 2nd ed. Madison : ASA, CSSA, SSA : 428-443.
18. Kuckuck H, Kobabe G, Wenzel G (1991). Fundamentals of plant breeding. Berlin : Springer-Verlag, 236 p.
19. Ledent JF (1974). Photosynthèse nette et angle foliaire chez le froment de printemps *(Triticum aestivum L.). Bull Acad R Belgique,* Cl. Sci, 60 : 961-972.

20. Ledent JF, Moss DN (1977). Spatial orientation of wheat leaves. *Crop Sci,* 17 : 873-879.
21. Ledent JF, Moss DN (1979). The relation of morphological characters and shoot yield in wheat. *Crop Sci,* 19 : 445-451.
22. Ledent JF (1982). Morphology and yield in winter wheat grown in high yielding conditions. *Crop Sci,* 22 : 1115-1119.
23. Ledent JF (1984). Morphological characters : a physiological analysis. In : Lange W, Zeven AC, Hogenboom NG eds. *Efficiency in plant breeding.* Proc. of the 10th Congress of Eucarpia. Wageningen : Pudoc : 65-68.
24. Ledent JF, Stoy V (1988). Yield of winter wheat. A comparison of genotypes from 1910 to 1976. *Cer Res Comm,* 16 : 151-156.
25. Loomis RS, Connor DS (1992). Crop ecology. *Productivity and management in agricultural systems.* Cambridge : Cambridge University Press.
26. Milthorpe FL, Ivins JD (1966). *The growth of cereals and grasses.* London : Butterworths, 359 p.
27. Monti LM (1990). *The role of crop physiology in production, Management and breeding.* In : Scaife A, ed. Proc. of the first ESAg Congress, Paris : 1-12 (session 1-0).
28. Peinetti R, Ledent JF (1990). Effect of water status on leaf angle and leaf movement in wheat. *J Agronomy Crop Sci,* 165 : 263-267.
29. Picard D (1991) *Physiologie et production du maïs.* Pau ; Paris : AGPM-INRA, 501 p.
30. Picard D (1992). *The future of crop physiology.* In : Scaife A, ed. Proc. 2nd ESAg Congr. Warwick : Warwick Univ : 16-23.
31. Raillard D (1991). Les attentes des établissements de semences de maïs. In : Picard D, ed. *Physiologie et production du maïs.* Pau, Paris : AGPM-INRA : 479-484.
32. Rasmusson DC, Gengenbach BG (1984). Genetics and use of physiological variability in crop breeding. In : Tesard MB, ed. *Physiological basis of crop growth and development.* Madison : ASA, CSSA : 291-321.
33. Simmons SR (1987). Growth, development and physiology. In : Heyne FG, ed. *Wheat and Wheat improvement.* 2nd ed. Madison : ASA, CSSA, SSA : 77-113.
34. Sprague GF, Dudley JM (1988). *Corn and Corn Improvement* (3rd ed.). Madison : ASA, CSSA, SSA, 986 p.
35. Tollenaar M, Dwyer LM (1991). The impact of physiology on the increase in productivity in maize. In : Picard D, ed. *Physiologie et production du maïs.* Pau-Paris : AGPM-INRA : 485-497.
36. Tollenaar M, Mihajlovic M (1991). Bromoxynil tolerance during the seedling phase is associated with genetic grain yield improvement in maize. *J Plant Sci,* 71 : 1021-1027.
37. Watson DJ (1952). The physiological basis of variation in yield. *Adv Agronomy,* 4 : 101-145.
38. Watson DJ (1968). A prospect of crop physiology. *Ann Appl Biol,* 62 : 1-9.
39. Fisher KS, Palmer AFE (1984). Tropical maize. In : Goldsworty, Fisher NM eds. *Physiology of tropical field crops.* Chichester : John Wiley and Sons, 664 p.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1995, pp. 31-49.

5

Amélioration de quatre espèces de légumineuses alimentaires tropicales : *Phaseolus vulgaris, P. coccineus, P. polyanthus* et *P. lunatus.* Sélection intra- et interspécifique

J.P. BAUDOIN [1], F. CAMARENA [2], M. LOBO [3]

1. FSAGx, Belgique.
2. UNALM, Pérou.
3. ICA, Colombie.

Dans de nombreuses régions tropicales, l'agriculture n'a toujours pas atteint des niveaux de productivité suffisants pour résoudre les problèmes de sous-alimentation ou de malnutrition. Les travaux de recherche agronomique réalisés dans le passé ont aussi souvent négligé les cultures vivrières au profit des cultures industrielles. Pour remédier à ces insuffisances, plusieurs centres internationaux de recherche ont été créés ou renforcés à travers divers pays d'Afrique, d'Amérique latine et d'Asie. Leurs activités sont coordonnées et supervisées par le Groupe Consultatif de la Recherche Agronomique Internationale (GCRAI) dont l'objectif principal est d'améliorer la productivité des plantes vivrières et des systèmes phytotechniques dans lesquels elles s'intègrent. Parmi toutes les espèces étudiées, les légumineuses alimentaires tiennent une part très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi divers que l'agronomie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie et la physiologie. Elles constituent un apport de protéines peu coûteux mais néanmoins important (18 % à 30 % de la graine sèche). Elles exercent une influence très favorable sur la fertilité des sols grâce à la symbiose fixatrice d'azote avec les souches de *Rhizobium.* Elles jouent par conséquent un rôle primordial dans la rotation des cultures. Si leurs excellentes propriétés suscitent de

nombreux espoirs, il convient pourtant de ne pas sous-estimer les difficultés inhérentes à ce groupe de plantes. En effet, les légumineuses alimentaires occupent toujours une place très modeste dans les systèmes culturaux traditionnels de ces pays. Le niveau faible et instable de leurs rendements par unité d'effort et leur grande susceptibilité aux maladies et aux ravageurs expliquent partiellement ce déséquilibre.

Une priorité absolue doit donc être accordée à l'amélioration du rendement, de la rusticité et de l'adaptabilité des légumineuses alimentaires. Cependant, de telles recherches ne peuvent négliger les systèmes culturaux : les cultures traditionnelles dans les régions tropicales ne permettent pas toujours à la plante d'exprimer son potentiel réel de production et cette situation nécessite en conséquence le développement de systèmes phytotechniques plus performants de culture pure ou associée. Les légumineuses devront obligatoirement s'adapter à ces nouveaux milieux, lesquels entraîneront inévitablement des obstacles supplémentaires à l'obtention d'une bonne productivité : pour ne citer qu'un exemple, l'intensification d'un système cultural s'accompagne très souvent d'une incidence plus sévère des maladies et des ravageurs, requérant des niveaux élevés et stables de résistance génétique.

Pour faire face à tous ces défis, le sélectionneur veillera en premier lieu à choisir l'espèce ou la variété cultivée qui convienne le mieux aux conditions écologiques locales. Celles-ci sont extrêmement diverses sous les tropiques, couvrant les zones des plus arides aux plus humides, et les zones des plus chaudes aux plus froides. Dans ce contexte, il est essentiel d'exploiter toute la diversité génétique au sein de la famille des légumineuses et de ne pas négliger des espèces dont la diffusion dans le monde est plus limitée.

Dans le cadre de la collaboration avec des institutions internationales et nationales situées au Nigéria, au Burundi, en Colombie, au Pérou et au Brésil, notre Unité a entrepris des travaux d'amélioration génétique des légumineuses vivrières du genre *Phaseolus*, d'origine néotropicale. *Phaseolus* comprend une cinquantaine d'espèces sauvages et cinq espèces domestiquées : *P. vulgaris* L. (le haricot commun, la légumineuse la plus diffusée du genre), *P. lunatus* L. (le haricot de Lima), *P. coccineus* L. (le haricot d'Espagne), *P. polyanthus* Greenm. et *P. acutifolius* A. Gray (le « tepary »). Eu égard à leurs fortes similarités écologiques et botaniques et à leur grande perméabilité génétique mutuelle, *P. coccineus* et *P. polyanthus* ont souvent été considérés au sein d'une même entité, désignée complexe *P. coccineus*.

Les recherches actuelles menées en collaboration avec l'Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, Colombie et l'*Universidad Nacional Agraria La Molina,* UNALM, Pérou, poursuivent les objectifs suivants :

– l'amélioration intraspécifique de *P. lunatus*, au niveau des déserts côtiers du Pérou et des savanes de la côte atlantique de Colombie, c'est-à-dire des zones tropicales de basse altitude ;

– l'amélioration intraspécifique de *P. polyanthus* et de *P. coccineus*, au niveau des régions andines de haute altitude du Pérou et de la Colombie ;

– l'amélioration interspécifique de *P. vulgaris*, au niveau des régions andines d'altitude des deux mêmes pays.

La méthodologie de travail s'articule autour de quatre axes majeurs :

– la prospection de matériel végétal dans les centres de diversité et la constitution de collections de base caractérisées par un spectre génétique très large ;

– l'évaluation de ces collections pour de nombreux traits morphologiques, agronomiques et moléculaires ;

– l'hybridation et la sélection suivant des techniques classiques et avancées ;
– la mise en place d'essais de rendement et d'adaptation multirégionaux, en tenant compte des systèmes de production prévalant dans les régions écologiques visées.

Prospection et constitution de collections de base

Pour obtenir des cultivars améliorés à la fois productifs et stables, le sélectionneur doit avoir à sa disposition la plus grande diversité génétique possible de la légumineuse étudiée. Selon le concept de Harlan et de Wet [10], les sources de variabilité exploitables englobent, d'une part, le réservoir génétique primaire (formes sauvages, subspontanées et cultivées de l'espèce biologique) et, d'autre part, le réservoir génétique exotique, c'est-à-dire les autres espèces phylétiquement voisines dans le genre et pouvant transmettre des gènes à l'espèce cultivée concernée. Pour ce dernier réservoir, les chances d'introgression dépendent de la plus ou moins grande difficulté à surmonter les barrières d'incompatibilité : selon l'importance de ces barrières, on distinguera le réservoir génétique secondaire ou tertiaire.

Le Nouveau Monde constitue l'aire d'origine et de domestication du genre *Phaseolus*. Selon Debouck [4], cette région se caractérise par trois centres de diversité primaire : le centre méso–américain (du sud des États-Unis à l'ouest de Panama), le centre nord-andin (de l'ouest du Venezuela au nord du Pérou), et le centre sud-andin (du centre du Pérou au nord de l'Argentine). A partir de ces trois centres, les espèces qui ont fait l'objet d'une domestication ont suivi plusieurs voies de diversification qui ont contribué, non seulement à élargir leur variabilité génétique, mais aussi à accroître considérablement leur adaptabilité à des zones climatiques très différentes. Cette adaptabilité a facilité la dispersion des plantes en dehors du continent américain, comme en Afrique, à Madagascar, en Asie du Sud-Est et dans les nombreuses îles du Pacifique. Ces régions représentent des centres importants de diversité secondaire [1].

Plusieurs collectes ont été réalisées dans ces centres par des scientifiques de la Faculté et avec l'appui de l'*International Plant Genetic Resources Institute* (Rome, Italie), du *Centro Internacional de Agricultura Tropical* (CIAT, Cali, Colombie) et de l'*International Institute of Tropical Agriculture* (IITA, Ibadan, Nigéria). Ces prospections ont permis d'accroître le nombre d'écotypes sauvages et de variétés de pays pour les principales espèces cultivées du genre *Phaseolus*, et de découvrir de nouvelles espèces, certaines ne possédant toujours pas un statut botanique bien identifié [5]. Les collectes et les échanges avec diverses stations de recherche ont aussi abouti à la création de collections mondiales de base, en particulier pour les trois espèces : *P. lunatus, P. coccineus* et *P. polyanthus*. Ces collections ou banques de gènes *(germplasm collection)* sont composées principalement de formes cultivées traditionnelles (les variétés de pays ou *landraces*) mais aussi de formes sauvages ou « sauvageoïdes », ces dernières résultant des échappées de culture ou d'hybridations accidentelles entre plantes sauvages et cultivées. Le matériel ainsi accumulé est multiplié sur le terrain en milieu tropical ou en serres à Gembloux. La phase de multiplication doit satisfaire à deux conditions essentielles : maintenir la variabilité génétique initiale de chaque introduction mais aussi préserver son intégrité génétique. Ces deux conditions ont nécessité, pour ces trois taxons à allogamie partielle, la mise au point d'une multiplication sous pollinisation contrôlée, avec intercroisements journaliers entre plantes distinctes de la même population [32]. Les graines ainsi obtenues constituent le stock de base de chacune des

introductions : ces graines sont destinées aux évaluations mais surtout à la conservation à long terme. Cette dernière s'effectue selon les recommandations émises par l'*International Plant Genetic Resources Institute :* les graines sont séchées progressivement pour atteindre une teneur en eau de 4 % sur base de la matière sèche, elles sont mises dans des sachets d'aluminium hermétiques et conservées en chambres froides à – 20 °C.

Evaluation des collections

L'évaluation porte à la fois sur le phénotype et le génotype.

Le phénotype concerne de nombreux caractères qualitatifs et quantitatifs, morphologiques et agronomiques, depuis le stade plantule jusqu'au stade de maturité. Une attention particulière a été accordée aux comportements des plantes vis-à-vis des contraintes biotiques. Le Tableau I indique les résistances observées chez *P. lunatus*, *P. coccineus* et *P. polyanthus* pour plusieurs maladies et ravageurs : ces résistances ont été confirmées par des tests d'inoculation artificielle réalisés en champ et en laboratoire [1, 15, 28].

Tableau I. Résistance de *P. lunatus, P. coccineus* et *P. polyanthus* à diverses maladies et ravageurs.

P. lunatus	P. coccineus, P. polyanthus
• Virus de la mosaique dorée du haricot de Lima (LBGMV)	• Virus de la mosaïque dorée du haricot (BGMV)
• Virus de la marbrure verte du haricot de Lima (LBGrMV)	• Ascochytose due à *Phoma exigua var diversispora.*
• Jassides, *Empoasca kraemeri*	• Anthracnose due à *Colletotrichum lindemuthianum*
• Bruches, *Acanthoscelides obtectus*	• Mouche du haricot, *Ophiomyia phaseoli*
• Nématodes à galles des racines, *Meloidogyne* sp.	• Jassides, *Empoasca kraemeri*

Les populations de *P. lunatus* se caractérisent aussi par leur tolérance à la sécheresse ou aux températures élevées tandis que celles de *P. coccineus* et de *P. polyanthus* manifestent une excellente tolérance au froid et un mode de croissance pérenne grâce à la présence de systèmes radiculaires tubéreux ou fibreux.

Mais les travaux d'évaluation peuvent impliquer directement **le génotype** et des caractéristiques moléculaires qui ne sont pas influencées par les pressions de sélection exercées par le milieu naturel, les systèmes phytotechniques ou les besoins des agriculteurs ou des consommateurs. L'utilisation des marqueurs moléculaires constitue un des outils les plus performants pour mieux comprendre l'organisation génétique d'une espèce.

Chez *P. lunatus*, l'étude électrophorétique des protéines de réserve des graines et de plusieurs systèmes enzymatiques a permis de mettre en évidence [1, 16, 17] :

– deux grandes familles génétiques : la famille mésoaméricaine, s'étendant du Mexique à l'Argentine, et la famille andine, à distribution plus limitée, s'étendant du sud-ouest colombien jusqu'au nord-ouest argentin, en passant par la zone côtière du Pérou et du Chili ;

– la correspondance entre formes sauvages et cultivées pour chacune de ces deux

familles ; la famille méso-américaine abritant les formes à petites graines (à l'origine des cultigroupes Sieva et Potato), la famille andine abritant celles à grandes graines (à l'origine du cultigroupe Big Lima) ;

– une forte réduction dans la diversité des patrons électrophorétiques en passant des formes sauvages aux formes domestiquées, conséquence directe de l'effet de fondation *(founder effect)* bien décrit par Ladizinsky [13] ;

– la présence d'introgression du pool méso-américain au sein du pool andin et chez ce dernier une liaison génique très forte entre certains patrons électrophorétiques, la forme et la couleur des graines.

Chez *P. polyanthus*, des travaux similaires portant sur l'électrophorèse des protéines de réserve des graines ont mis en évidence [27] :

– un centre primaire de diversité situé au Guatemala, avec coexistence de formes sauvages, subspontanées et cultivées ;

– une réduction de la diversité génétique, en passant des formes sauvages aux formes cultivées, traduisant aussi l'effet de fondation ;

– une aire de domestication s'étendant vers le nord, dans les régions montagneuses humides du Mexique, et vers le sud, dans les montagnes du Costa Rica et de la zone nord-andine.

De telles informations sont très utiles pour mieux orienter les futurs programmes de collectes et les stratégies d'amélioration à mettre en œuvre chez les légumineuses du genre *Phaseolus*. Les degrés de similitudes ou de divergences génétiques entre les pools vont notamment aider le sélectionneur à choisir à la fois les génotypes parentaux les plus éloignés mais également les plus compatibles (appartenant à un même pool génétique ou à deux pools différents) pour les travaux d'hybridations. De tels brassages génétiques pourront engendrer des ségrégations très larges chez les populations hybrides servant de base aux travaux de sélection.

La sélection intra- et interspécifique

L'amélioration des plantes se définit comme la recherche des meilleures voies permettant de réaliser, à partir d'une constitution imparfaite, une structure génétique adaptée aux critères et aux besoins des populations humaines [7]. Chez les légumineuses vivrières du genre *Phaseolus*, cet objectif final peut être obtenu en exploitant soit toute la variabilité génétique primaire de l'espèce, soit la variabilité génétique disponible chez d'autres espèces apparentées.

Les critères de sélection

Les populations de *P. lunatus, P. coccineus* et *P. polyanthus* se présentent comme des mosaïques de morphotypes divers, stables ou toujours en voie de disjonction, se distinguant principalement par la forme, la dimension et la couleur des graines ainsi que par l'habitus de croissance. Pour la Colombie et le Pérou, les critères de sélection peuvent être répartis en trois catégories :

• ***Critères d'adaptation aux contraintes biotiques et abiotiques***

Ces critères sont prioritaires et divergent suivant les zones agroécologiques. Pour les hautes altitudes, la priorité est donnée à la tolérance au froid et aux résistances à l'ascochytose (due à *Phoma exigua* var *diversispora*), à l'anthracnose (due à *Colletotrichum lindemuthianum*) et à la maladie des taches angulaires (due à *Phaeisariopsis griseola*). Pour les basses altitudes, c'est-à-dire pour la culture du haricot de Lima, l'accent est mis sur la tolérance au stress hydrique et les résistances aux nématodes à galles des racines (*Meloidogyne* sp.), aux jassides *(Empoasca kraemeri)*, aux larves de lépidoptère foreuses de gousses *(Maruca testulalis, Cydia ptychora...)*, à la cercosporiose (due à *Cercospora* sp.) ainsi qu'à plusieurs maladies virales non encore identifiées.

• ***Critères de qualité et d'acceptabilité des graines***

Ils concernent principalement la couleur, la forme et la dimension de la graine, souhaitées par l'utilisateur. Sur la côte péruvienne, une attention particulière est accordée à deux autres critères : la diminution de l'incidence de la germination prématurée des graines dans la gousse immature (défaut majeur des variétés du cultigroupe Big Lima) ainsi que la réduction dans la production d'acide cyanhydrique, résultant de l'hydrolyse enzymatique des glucosides cyanogénétiques des graines.

• ***Critères de productivité***

Ceux-ci englobent toutes les composantes morphophysiologiques du rendement en graines : nombre et dimension des gousses et des graines, dimension et durée de vie des feuilles, indice de surface foliaire, réaction au photothermopériodisme, précocité et tardiveté, capacité de fixation symbiotique...

Chez les trois légumineuses envisagées, la connaissance de l'hérédité des caractères agronomiques recherchés est très fragmentaire, ce qui constitue un frein majeur en amélioration variétale. Dans la recherche de génotypes plus performants, le sélectionneur doit aussi prendre en considération deux aspects importants : l'idéotype et le système cultural.

– ***L'idéotype :*** Même si la priorité est donnée aux résistances aux maladies et aux ravageurs – approche logique dans le contexte de systèmes d'exploitations agricoles à intrants limités –, la construction d'un idéotype adapté à chaque situation agroécologique ne doit pas être négligée. Cela se justifie d'autant plus que les caractères de productivité sont souvent contrôlés par des systèmes géniques indépendants [21, 25, 30]. Des essais multirégionaux de rendement, comprenant des génotypes de haricot distincts par leur origine, leur habitus de croissance, et leur réaction au photothermopériodisme ont mis en évidence trois composantes essentielles de la production en graines :

– l'accumulation rapide d'une biomasse aérienne suffisante,

– un indice à la récolte élevé (c'est-à-dire un bon rapport poids des graines matures/poids total de la plante),

– et le nombre de jours du semis à la maturité ajusté à la durée de la campagne culturale.

Une sélection simultanée pour ces trois composantes dans chaque zone culturale est indispensable. Le défi majeur de l'amélioration variétale sera de réduire la corrélation négative entre, d'une part, l'indice à la récolte, et, d'autre part, la production de biomasse et la durée du cycle biologique de la légumineuse (du semis à la récolte). Le facteur clef dans cette entreprise réside, en particulier, dans une meilleure maîtrise du

caractère oligogénique de sensibilité de la plante à la photopériode. Ce caractère agit en effet comme modulateur dans la répartition des photosynthétats entre organes végétatifs et génératifs [34, 35]. Chez les variétés indifférentes à la photopériode ou chez les variétés sensibles, en présence d'une photopériode inductive, l'initiation florale entraîne une distribution des photosynthétats au profit des inflorescences et de leurs gousses.

– ***Le système cultural :*** Tous les critères de sélection doivent être définis en fonction du système cultural. Selon Francis [8], dans la zone andine, 70 % à 80 % des haricots sont cultivés en association, principalement avec le maïs. Dans ce contexte, l'objectif final d'un programme d'amélioration ne concerne pas le seul rendement absolu de la plante mais aussi, et préférentiellement, le rendement global de l'association. Le calcul du « taux de surface équivalente » (TSE) constitue à cet égard une bonne mesure de l'efficience biologique du système de productions [11] :

$$TSE = \frac{X_1}{X_{1m}} + \frac{X_2}{X_{2m}} + \ldots + \frac{X_n}{X_{nm}}$$

X_1 = rendement de la composante 1 en culture associée
X_{1m} = rendement de la composante 1 en culture pure et à densité optimale.

Un taux de surface équivalente supérieur à l'unité signifie la supériorité biologique de la culture associée par rapport à la combinaison de cultures pures de chacune des composantes de l'association. La performance de la culture associée dépendra principalement des possibilités réelles de minimiser les niveaux de compétition interspécifique (entre maïs et haricot) et de valoriser au maximum les complémentarités entre les composantes associées. Pour la légumineuse, qui représente la composante dominée dans l'association avec le maïs, une priorité sera donnée aux critères de sélection suivants : une bonne vigueur de croissance au stade plantule, une réponse positive aux densités élevées de population, la tolérance à l'ombrage, l'efficacité dans l'utilisation de l'eau et des éléments nutritifs, la capacité élevée de fixation symbiotique...

L'identification de ces critères de sélection impliquera un dispositif expérimental approprié en cours de sélection et des stratégies d'amélioration différentes de celles mises en place pour la culture pure.

La sélection intraspécifique

Chez les trois légumineuses étudiées : *P. lunatus, P. coccineus* et *P. polyanthus*, le système de reproduction agit comme un opérateur mécanique non négligeable dans la transformation des populations en ségrégation. Ces trois espèces se caractérisent en effet par des taux d'allogamie relativement élevés, surtout parmi les génotypes du complexe *P. coccineus*. Les croisements accidentels créent une hétérozygotie rémanente. Chez le haricot de Lima, Harding et Allard [9] ont montré qu'il existait une liaison inverse entre la fréquence des hétérozygotes et leurs valeurs sélectives : ce facteur contribue ainsi à maintenir une variabilité résiduelle significative, même dans des populations soumises à des autofécondations. Ces sources de diversité pourront être exploitées habilement par le sélectionneur mais elles rendront aussi, d'une certaine façon, plus difficile le travail de purification et de stabilisation.

La Figure 1 donne l'organigramme des travaux d'amélioration que nous avons conduits chez *P. lunatus* en zone tropicale. Les essais empruntent deux schémas directeurs : l'amé-

Gestion des collections

- ***Apport de matériel nouveau***
  var. *silvester,* var. *lunatus* (cv-gr Sieva, Potato, Big Lima)
- ***Évaluation***
  morphologique, agronomie, moléculaire
  (protéines, isozymes et ADN)
- ***Sélection***
  au sein des deux familles : méso-américaine et andine

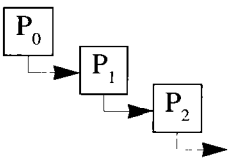
Phase d'amélioration

Amélioration variétale

- ***Choix précoce des génotypes***
  sélection massale
  reprise en lignées pures
  sélection généalogique
  sélection par rétrocroisement
- ***Choix différé des génotypes***
  populations hybrides « bulk »
  filiation unipare

Amélioration des populations

- ***Sélection cumulative***
  cycles successifs, constitués
  chacun de l'alternance des
  phases de sélection et
  d'intercroisements



Phase de rendement et d'adaptation

- ***En station***
  confirmation des rendements dans des essais avec répétition
  tests en culture pure et associée (haricot-maïs)
- ***Au niveau de l'exploitation agricole***
  tests des variétés élites en culture pure et associée

Figure 1. Organigramme de sélection intraspécifique.

lioration variétale avec un choix précoce ou différé des géniteurs intéressants et l'amélioration des populations dont le but n'est pas de créer, contrairement à l'amélioration variétale, des variétés élites mais de construire des populations améliorées. Ces dernières, une fois constituées, pourront être intégrées dans un cycle de sélection variétale.

• ***Amélioration variétale***

Chez *P. lunatus*, des schémas classiques d'amélioration ont été adaptés, comme par exemple :

– la sélection massale et la reprise en lignées, à partir d'un matériel suffisamment hétérogène constitué de variétés de pays *(landraces)* ou de mélanges variétaux,

– la sélection généalogique et la sélection par rétrocroisements, à partir d'hybrides intervariétaux.

Nous avons utilisé ces systèmes classiques pour des objectifs souvent très précis, comme l'association entre la tolérance à la sécheresse, la précocité et la qualité de la graine chez les variétés Big Lima (type à grandes graines) cultivées sur la côte désertique péruvienne ou comme l'amélioration de la résistance à la mosaïque dorée du haricot de Lima chez les variétés Sieva (type à graines moyennes et plates) et Potato (type à graines petites et rondes) cultivées dans les savanes et les forêts humides de l'Afrique occidentale et centrale.

Néanmoins, toutes ces méthodes de sélection traditionnelles ont une portée limitée. Elles entraînent une perte progressive des caractères à faible héritabilité et le retour trop rapide vers l'homozygotie, rendant inefficace de nombreux *crossing-over*. Cete évolution peut cependant être freinée chez le haricot de Lima grâce à son taux d'allogamie relativement élevé. Ces méthodes ne sont pas les plus efficaces lorsqu'il s'agit d'introduire dans le matériel testé de nombreux caractères à la fois, souvent de nature polygénique. Elles se heurtent également à une contrainte communément observée chez de nombreuses légumineuses vivrières : la faiblesse du taux de multiplication des individus sélectionnés, limitant sérieusement les effectifs des descendances. Mais le principal défaut de ces techniques, notamment de la sélection généalogique, est de réaliser un choix déterminant à un stade précoce, la F_2, où l'information sur les potentialités de chaque individu est très incomplète.

Pour corriger ce défaut majeur et retarder ainsi le choix des géniteurs intéressants, deux méthodes peuvent être adoptées : elles visent à séparer la phase de consanguinité *(inbreeding)* de la phase de sélection, cette dernière opérant parmi un matériel très divers mais constitué de multiples lignées homozygotes.

– La méthode des populations hybrides *(bulk hybrid populations)* : Le principe est simple et consiste à récolter en vrac l'ensemble des génotypes hybrides pendant plusieurs générations. Chaque plante progresse ainsi vers l'homozygotie et à une génération donnée du processus, la sélection se fera descendance par descendance, c'est-à-dire en sélection généalogique. Cette méthode est très efficace si les conditions de sélection naturelle sont bien équilibrées et peu intenses durant les premières générations. Elle présente cependant l'inconvénient de favoriser les génotypes les plus prolifiques, notamment ceux donnant des graines petites et nombreuses. Or, dans de nombreuses régions tropicales (en particulier les Andes), les agriculteurs donnent plutôt la préférence aux cultivars à grandes graines. Il sera donc nécessaire d'intervenir, durant la sélection naturelle, pour retenir les formes, les couleurs et les tailles des graines souhaitées par les utilisateurs.

– La méthode de la filiation unipare *(single seed descent)* : Cette méthode, encore appelée méthode des descendances monograine, a évolué en méthode des descendan-

ce monofruit *(single pod descent)* chez les légumineuses vivrières. Ici une seule graine (ou gousse) est prélevée sur chaque plante pendant plusieurs générations et l'ensemble est semé en l'absence de toute pression de sélection, souvent en milieu artificiel (en serre). Comme pour la méthode précédente, on termine par une sélection généalogique. Ce processus de travail facilite l'avancement rapide des générations : une seule graine ou gousse doit être récoltée par individu, ce qui permet des semis à haute densité, en serre ou dans l'hémisphère le plus favorable pour l'initiation de la floraison. L'avantage principal de la méthode réside dans le report de la sélection vers les stades les plus homozygotes et dans la possibilité de tester des effectifs plus réduits en F_2 mais provenant d'un plus grand nombre de croisements. On relève néanmoins une faiblesse majeure dans cette méthode : le fait de ne récolter qu'une ou quelques graines par individu constitue un échantillonnage biaisé. Celui-ci risque d'entraîner la perte des qualités recherchées. De plus, pour des plantes à allogamie partielle, la gousse récoltée peut très bien ne pas refléter le génotype du pied-mère.

• ***Amélioration des populations***

Toutes les méthodes envisagées précédemment aboutissent, avec des degrés de vitesse divers, à réduire la diversité génétique présente dans les populations de départ. L'amélioration des populations, encore appelée méthode de sélection cumulative ou récurrente, poursuit un objectif très différent : celui de maintenir ou d'accroître, au cours de plusieurs générations, l'hétérozygotie ou la variabilité des populations initiales. Cette technique est caractérisée par des brassages cycliques comprenant, pour chaque cycle, deux phases successives : une phase de sélection destinée à cumuler les allèles favorables et une phase d'intercroisements entre les meilleurs génotypes.

La sélection cumulative est efficace pour l'introduction de nombreux caractères souhaités dans le matériel cultivé, surtout si ces caractères sont à déterminisme polygénique et si l'effet d'additivité des gènes concernés est important. Le succès de cette méthode est évidemment conditionné par la possibilité de réaliser de nombreux croisements à chaque cycle et de pouvoir ainsi créer rapidement des populations polymorphes où les *crossing-over* seront importants. Chez les légumineuses vivrières du genre *Phaseolus*, les hybridations artificielles requièrent malheureusement du temps et de l'habileté. Pour contourner cette difficulté, on peut faire appel soit à des stérilités mâles nucléaires, soit au taux d'allogamie naturelle élevé. Chez *P. lunatus*, aucun cas intéressant de stérilité mâle n'a encore été identifié. C'est essentiellement l'allogamie naturelle qui a été exploitée pour l'adoption de la sélection cumulative. Ainsi Rachie et Gardner [24] ont proposé un schéma de sélection original, baptisé *dual population scheme*. Ce schéma consiste à semer sur le terrain en ordre alterné deux populations, chacune possédant un trait récessif distinctif pour lequel l'autre population montre la dominance. Les hybrides naturels sont facilement repérés lors de chaque génération. Au début, le matériel est sélectionné principalement sur la base de caractères qualitatifs ; par la suite, la sélection porte sur les caractères quantitatifs.

Cette technique de travail a été utilisée au Nigéria pour transférer, chez les génotypes productifs et précoces des cultigroupes Sieva et Potato, la résistance au virus de la mosaïque dorée du haricot de Lima observée chez plusieurs populations du cultigroupe Big Lima.

La Figure 2 illustre la méthodologie adoptée. Les deux sous-populations comprennent des individus sensibles et résistants à la mosaïque dorée mais se distinguent, l'une de l'autre, par deux caractères monogéniques : port nain (récessif) *versus* port volubile et hypocotyle vert (récessif) *versus* hypocotyle pourpre. Les génotypes manifestant l'al-

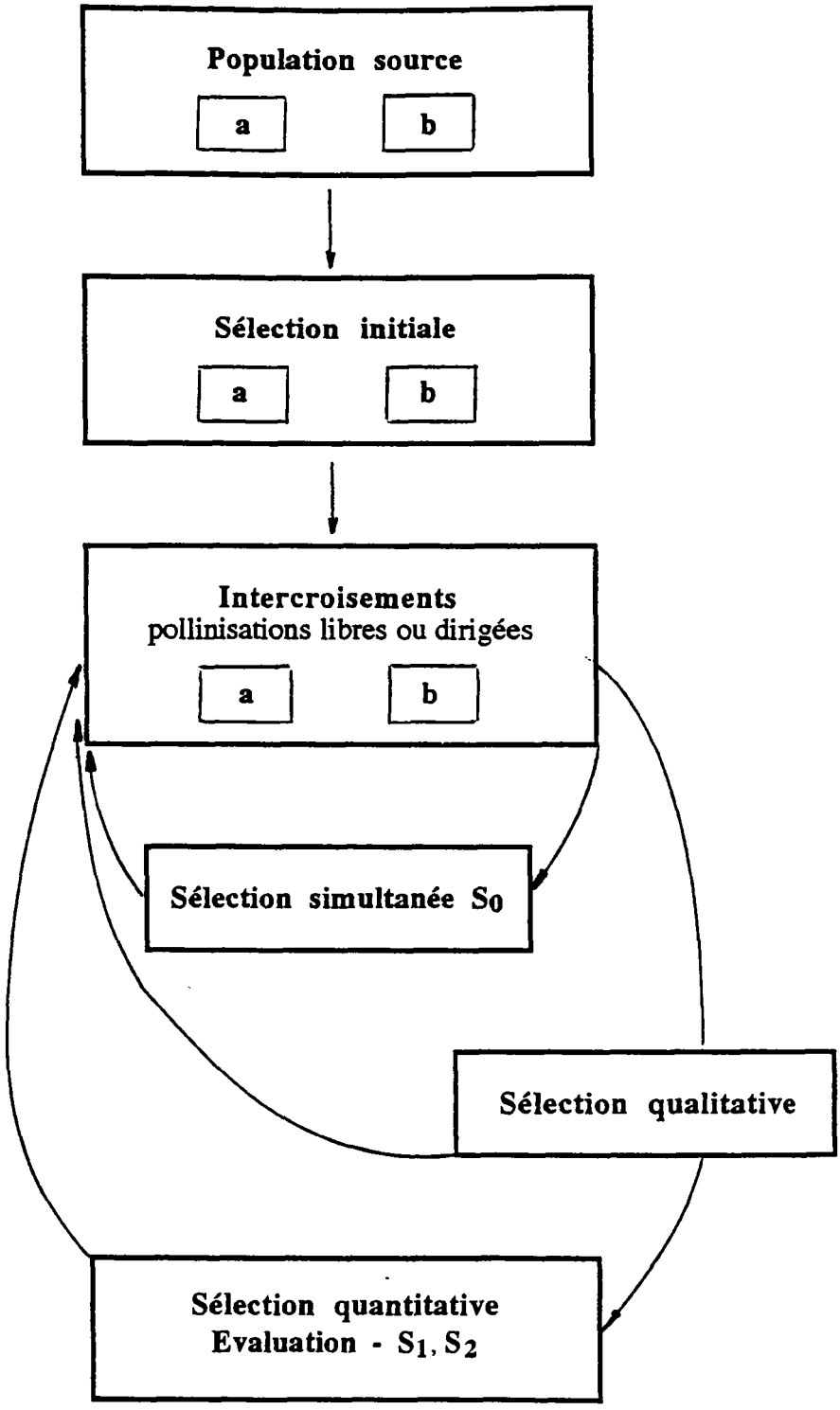


Figure 2. Amélioration par populations : sélection cumulative chez le haricot de Lima.

lèle récessif sont utilisés comme parents maternels dans la phase de recombinaisons issue de pollinisations libres ou dirigées. Les hybridations naturelles entre plantes a et b sont favorisées par leur proximité sur le terrain (alternance de poquets).

Il est évident que des techniques avancées pourraient se greffer utilement sur l'organigramme proposé. Nous pensons notamment à l'haplodiploïdisation par culture *in vitro* d'anthères ou d'ovules d'hybrides F_1, suivie du doublement du nombre chromosomique des explants ainsi produits. Cette technique a l'avantage de créer une nouvelle variabilité, de faciliter les opérations d'évaluation, mais surtout de raccourcir la phase de consanguinisation à une seule génération. Malheureusement, chez *Phaseolus*, il n'a pas encore été possible d'obtenir des haploïdes *in vitro* : les recherches en cours dans le laboratoire de Gembloux ont permis de mettre au point un milieu performant de callogenèse au départ de culture d'anthères, mais aucune regénération d'explants n'a été obtenue à ce jour [20].

Quelle que soit la stratégie d'amélioration adoptée, il ne faut pas perdre de vue le contexte dans lequel le sélectionneur travaille : le milieu tropical est caractérisé par la très grande variabilité de plusieurs facteurs écologiques, économiques et sociaux. En conséquence, les variétés améliorées doivent présenter au stade final de la sélection une bonne homogénéité agronomique mais également garder une bonne réserve de polymorphisme génétique, celui-ci leur conférant une souplesse adaptative. Ce matériel devra aussi s'adapter à des systèmes culturaux, certes plus intensifs, mais qui ont gardé le caractère de multiplicité des modes d'exploitation traditionnelle : culture en mélange, culture intercalaire, culture en relais, etc. A cette fin, l'amélioration des légumineuses alimentaires sous les tropiques nécessitera donc l'évaluation du matériel parental et des populations hybrides, dès les premiers stades de la sélection, suivant un dispositif phytotechnique simulant la diversité de ces modes d'exploitation rurale. Les meilleures lignées issues de la sélection seront testées dans des essais réalisés, au début, dans les stations de recherche, ensuite, au niveau des exploitations agricoles.

La sélection interspécifique

L'hybridation interspécifique constitue également une voie très prometteuse pour l'obtention de cultivars améliorés chez *Phaseolus* et notamment chez les deux légumineuses *P. vulgaris* et *P. lunatus*. Cette voie fait appel à toutes les espèces phylétiquement voisines qui se rangent, suivant le concept de Harlan et de Wet [10], dans le pool génétique secondaire ou tertiaire de l'espèce récurrente.

Les objectifs d'un programme d'hybridation interspécifique concernent essentiellement l'introduction de caractères utiles absents ou faiblement exprimés dans le pool génique primaire de l'espèce cultivée. Mais le matériel interspécifique peut aussi contribuer à élargir considérablement la variabilité génétique générale de l'espèce grâce à l'apparition de nouveaux caractères ou de nouvelles combinaisons de caractères, offrant ainsi des perspectives originales en amélioration végétale. Plus que les caractères ponctuels, l'hybridation interspécifique apporte au niveau du végétal une plus grande homéostase, une vigueur végétative et générative très marquée et une très large variabilité de ségrégations, offrant aux sélectionneurs des possibilités de choix unique dans des phénotypes inattendus [7].

Malgré le potentiel génétique énorme de ce matériel, force est de constater que la sélection interspécifique au sein du genre *Phaseolus* occupe toujours une place très marginale dans les programmes d'amélioration des centres de recherche. Cela s'explique par les nombreuses contraintes auxquelles doit faire face le sélectionneur. Il n'est pas inutile

de rappeler ici les conditions essentielles pour l'obtention de résultats significatifs en hybridation interspécifique : la connaissance approfondie des relations phylétiques entre espèces du genre, l'évaluation agronomique complète du réservoir génétique secondaire ou tertiaire et la mise en œuvre d'une stratégie d'amélioration très stricte, depuis la création des hybrides jusqu'au développement de lignées stables et fertiles.

• ***Les relations phylétiques au sein du genre Phaseolus***

L'élaboration d'un programme d'hybridations interspécifiques repose sur une bonne connaissance de la phylogénie du genre et de la position taxonomique respective des espèces à l'intérieur de celui-ci. *Phaseolus* se compose d'une cinquantaine d'espèces sauvages et cultivées d'origine géographique différente [5]. L'observation de plusieurs caractères (morphologiques, cytologiques, biochimiques...) a permis de mieux saisir l'organisation de la diversité génétique du genre [6, 12, 19]. Plusieurs sections ont été définies, dont la section *Phaseolus* s. str., abritant les cinq cultigènes : *P. vulgaris, P. coccineus, P. polyanthus, P. acutifolius* et *P. lunatus* ainsi que diverses espèces sauvages. Au sein de cette section, deux domaines d'investigations – la palynologie et le polymorphisme de restriction de l'ADN chloroplastique – ont permis de préciser les affinités existant entre les taxons.

– Les données palynologiques observées par Stainier [31] ont mis en évidence quatre groupes polliniques différents constituant les étapes d'une orthogenèse :

- groupe I : pollen tricolporé muni de pseudocolpus ;
- groupe II : pollen tricolporé avec ébauches de pseudocolpus ;
- groupe III : pollen tricolporé démuni de pseudocolpus ;
- groupe IV : pollen triporé démuni de pseudocolpus.

– Le sens de cette évolution irait du groupe I vers le groupe IV. Cette organisation séquentielle de la section est confirmée par les résultats des essais d'hybridation entre taxons différents (voir Tableau II) : il existe ainsi un parallélisme entre, d'une part, le degré de compatibilité interspécifique (nombre d'univalents à la méiose) et, d'autre part, les différences observées entre les caractères polliniques des espèces parentales. A partir des études palynologiques, il est possible de considérer deux pôles extrêmes à l'intérieur de la section *Phaseolus* : le pôle *P. vulgaris – P. coccineus – P. polyanthus* (pollen IV) et le pôle *P. lunatus* (pollen I). Les autres taxons (pollen II et III) se répartissent entre ces deux groupes à des distances variables.

– L'analyse électrophorétique des polymorphismes de restriction de l'ADNcp contribue aussi à mieux préciser les relations phylétiques entre taxons. Les travaux de Schmit *et al.* [29] confirment l'éloignement de *P. lunatus* vis-à-vis de *P. vulgaris* mais surtout clarifient les distances génétiques entre les taxons gravitant autour de *P. vulgaris* et du complexe *P. coccineus*. Parmi ces taxons, il se dessine deux groupes : d'une part, le groupe *P. vulgaris – P. polyanthus*, d'autre part, le groupe *P. coccineus*. *P. polyanthus* apparaît ainsi comme un taxon distinct de *P. coccineus* et génétiquement plus proche de *P. vulgaris*, ce qui va nous servir de guide dans l'élaboration des programmes d'hybridations interspécifiques.

• ***Les hybrides interspécifiques réussis***

Le Tableau II donne la liste des hybrides interspécifiques réussis au sein de la section *Phaseolus*. Le nombre d'univalents à la métaphase de la première division méiotique des hybrides F_1 est mis en relation avec les groupes polliniques des espèces parentales.

Les données proviennent des travaux de Braak et Kooistra [3], de Le Marchand *et al.* [14], de Maréchal et Baudoin [18], de Prendota *et al.* [23], de Belivanis et Doré [2], de Weilenmann de Tau *et al.* [36] et de Baudoin [1]. L'aptitude à la combinaison confirme en général l'organisation génétique définie par les études sur les caractères morphologiques, palynologiques et moléculaires.

Chez *Phaseolus*, des barrières d'incompatibilité se manifestent lors d'hybridations :

– soit entre espèces phylétiquement éloignées : le cas de *P. vulgaris* x *P. filiformis*, *P. vulgaris* x *P. acutifolius*, *P. vulgaris* x *P. ritensis* ;

– soit entre espèces phylétiquement proches, mais où le sens du croisement est imposé : le cas des hybrides *P. coccineus* (ou *P. polyanthus*) utilisés comme parent femelle avec *P. vulgaris*.

Tableau II. Combinaisons interspécifiques réalisées dans le genre *Phaseolus* : groupe pollique des espèces parentales et nombre d'univalents à la première division de la métaphase méiotique des hybrides F_1.

Combinaisons interspécifiques	Groupe pollinique		Nombre d'univalents à la première division de la métaphase
	1er parent	2e parent	
P. lunatus x *P. maculatus*	I	I	2
P. lunatus x *P. ritensis*	I	I	2
P. lunatus x *P. jaliscanus*	I	I	2
P. lunatus x *P.* sp. NI 702	I	I	2
P. lunatus x *P. salicifolius*	I	II	4
P. lunatus x *P. polystachyus**	I	II	7
P. filiformis x *P. angustissimus*	III	II	4
P. vulgaris x *P. ritensis**	IV	I	15
P. vulgaris x *P. angustissimus**	IV	II	7
P. vulgaris x *P. acutifolius**	IV	III	6
P. vulgaris x *P. filiformis**	IV	III	–
P. vulgaris x *P. purpurascens*	IV	III	1
P. vulgaris x *P. coccineus*	IV	IV	0
P. vulgaris x *P. polyanthus*	IV	IV	0
P. coccineus x *P. polyanthus*	IV	IV	0

* Hybrides à forte stérilité, dont l'obtention nécessite souvent l'embryoculture.

Les barrières d'incompatibilité surviennent après la fécondation et se traduisent par l'avortement des embryons. Cet avortement se produit pour des raisons essentiellement nutritionnelles : le mauvais fonctionnement de l'albumen, du suspenseur et des tissus maternels entrave en effet l'alimentation normale de l'embryon et le maintien d'un équilibre minéral et hormonal nécessaire au métabolisme de l'embryogenèse. La culture *in vitro* des embryons extraits de l'ovule peut théoriquement conduire au développement des hybrides mais le taux de réussite est ici fonction du stade de différenciation atteint par l'embryon au moment de l'avortement. Si celui-ci survient au stade cotylédonnaire, le sauvetage des embryons ne pose pas de difficultés majeures. Si, au contraire, l'avortement se produit à un stade plus précoce (globulaire ou cordiforme jeune), l'embryoculture est plus délicate et nécessite la mise au point de techniques et de milieux de culture précis : extraction douce des embryons des ovules par micromanipulation, transfert des embryons dans une solution à haute osmolarité, stimulation de la germination et de l'enracinement des embryons sur des milieux nutritifs différant par

les teneurs en éléments minéraux, en vitamines, en hormones de croissance et en agarose, adaptation progressive des explants à la lumière et à la transplantation sur substrat terreux. L'amélioration des méthodes *in vitro* sur embryons immatures nous a permis de réussir des combinaisons difficiles comme *P. polyanthus (!)* x *P. vulgaris, P. vulgaris* x *P. acutifolius, P. vulgaris* x *P. filiformis*. Le perfectionnement des techniques d'embryoculture est néanmoins nécessaire afin de créer de nouvelles combinaisons impliquant, chez l'espèce donneuse, les génotypes sélectionnés pour leurs caractères utiles (comme la résistance aux maladies). Des essais sont en cours dans le laboratoire de Gembloux pour développer de nouveaux hybrides entre *P. polyanthus* (ou secondairement *P. coccineus*), tous deux utilisés comme parents maternels, et *P. vulgaris*. La présence du cytoplasme des deux espèces donneuses facilite l'introgression de leurs gènes utiles dans le patrimoine génétique du haricot commun. La réussite des essais d'embryoculture pour ces combinaisons interspécifiques est tributaire d'une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques mis en jeu aux différentes étapes de l'embryogenèse zygotique.

• ***Les méthodes de sélection interspécifique***

Afin d'accroître la productivité du haricot commun dans la zone andine de hautes altitudes, les travaux d'amélioration interspécifique ont été focalisés sur les croisements entre cette espèce et les populations de *P. coccineus* ou *P. polyanthus*, choisies pour la tolérance au froid, le très haut niveau de résistance à l'ascochytose et la rusticité face à de nombreuses contraintes biotiques. Les hybrides sont relativement faciles à réaliser lorsque le haricot commun est utilisé comme parent maternel. La fertilité en F_1 et dans les générations ultérieures est très satisfaisante, voire excellente. La difficulté principale réside dans la construction, au départ des populations en disjonction, de variétés agronomiquement acceptables : c'est-à-dire des variétés cumulant les qualités du parent récurrent et les caractéristiques recherchées chez le parent donneur. La cohabitation de deux génomes, présentant pourtant de nombreuses homologies structurelles, entraîne des désordres de nature physiologique ou des phénomènes de rejet du stock génétique du parent donneur, surtout chez les individus les plus fertiles. Plusieurs facteurs expliquent ce comportement général des populations interspécifiques : l'interaction entre le cytoplasme et le génome nucléaire ou entre le zygote hybride et le tissu maternel, l'élimination des gamètes hybrides, la stérilité pollinique, la différenciation cryptique des chromosomes, les liaisons géniques très fortes entre caractères favorables et rédhibitoires, et surtout le transfert des linkats. Ces derniers, selon Demarly [7], représentent des segments chromosomiques caractérisés à la fois par des séquences alléliques coadaptées et par une forte réduction des taux de recombinaison. Ils représentent pour chaque espèce l'aboutissement du processus d'évolution. Ce sont précisément ces linkats qui expliquent la difficulté de transférer, chez une espèce récurrente, un caractère même monogénique d'une espèce donneuse, sans introduire dans le même temps d'autres traits non souhaités de la deuxième espèce.

Pour surmonter ces difficultés, il est essentiel d'adopter des méthodes de sélection très rigoureuses, lesquelles varient en fonction du nombre de caractères à introgresser, du déterminisme génétique de ces caractères et du degré de fertilité des hybrides. Dans nos travaux nous avons retenu deux méthodes :

– la sélection cumulative, comprenant plusieurs cycles de recombinaison ; elle est conçue pour maintenir durant plusieurs générations un niveau très élevé d'hétérozygotie, ce qui accroît les possibilités de crossing-over entre les gènes liés ;

– la sélection par rétrocroisement, mais en utilisant de manière alternée les deux

espèces parentales *(congruity backcross)* ; cette méthode vise les mêmes objectifs que la première mais elle favorise dans le même temps une augmentation de la fertilité et un brassage constant du matériel génétique des deux espèces parentales.

Ces deux méthodes ont été appliquées aux hybrides directs *P. vulgaris* x *P. coccineus, P. vulgaris* x *P. polyanthus* mais également aux hybrides indirects, utilisant comme « pont » entre les formes cultivées des deux taxons le cytoplasme de populations sauvages de *P. coccineus*. Ce cytoplasme s'est révélé un facteur efficace de compatibilité entre les deux génomes des parents récurrent et donneur et comme un facteur de maintien des introgressions.

La mise en œuvre de ces programmes d'amélioration interspécifique dans les stations de Rionegro (ICA, Colombie) et de Chiquian (UNALM, Pérou) a permis d'obtenir du matériel hybride élite parmi les combinaisons suivantes :

– *P. vulgaris* (!) x *P. polyanthus*
GUA 467 x GUA 1259, GUA 1008 x PILOY, ECU 299 x PILOY, PASTO x GUA 1259, MORTINO x X7
– *P. vulgaris* (!) x *P. coccineus*
NI 141 x G 35174,....
– [*P. coccineus silvester* (!) x *P. vulgaris*] (!) x *P. coccineus*
(NI 889 x BAT 1274) x DGD 78300, (NI 889 x BAT 1274) x DGD 78015, (NI 889 x D 145) x NI 15

Ce matériel est testé au niveau d'exploitations agricoles pratiquant l'association culturale. Les meilleures combinaisons ont aussi été semées en parcelles isolées afin d'atteindre un degré de stabilité et d'uniformité satisfaisant.

Conclusions générales et perspectives

Les progrès dans l'amélioration des légumineuses sous les tropiques sont en grande partie conditionnés par l'étendue des prospections et des évaluations des ressources génétiques disponibles. Ces ressources, chez les légumineuses du genre *Phaseolus*, dépassent souvent le cadre biologique de l'espèce et englobent plusieurs taxons phylétiquement proches. L'exploration des centres de diversité primaire et secondaire et la caractérisation complète du réservoir génétique de la légumineuse étudiée s'imposent comme une nécessité première. Les missions de collecte et les évaluations morphologiques, agronomiques et moléculaires que nous menons sur les trois espèces *P. lunatus, P. coccineus* et *P. polyanthus* répondent à ce souhait.

La seconde priorité consiste à combiner les gènes les plus utiles, en particulier ceux contrôlant directement la résistance aux maladies et aux ravageurs, en établissant de vastes programmes d'hybridations entre toutes les formes, sauvages et cultivées, collectées dans les centres de diversité. Ce travail se réalise en collaboration étroite avec l'ICA en Colombie et l'UNALM au Pérou, et le matériel généré par ces croisements est constamment testé dans les systèmes culturaux et les rotations traditionnellement pratiqués dans ces régions.

Il est donc primordial que les techniques classiques de sélection et d'essais phytotechniques au niveau des exploitations agricoles se poursuivent sans relâche, l'amélioration variétale étant essentiellement un processus dynamique.

Des techniques avancées pourront cependant s'intégrer utilement dans ces schémas

de travail. Nous privilégierons à ce niveau deux axes de recherche susceptibles de jouer un rôle complémentaire et d'assistance aux travaux de sélection classique :

– l'utilisation des marqueurs moléculaires (protéines, isoenzymes et ADN) pour étudier la diversité des pools géniques, pour localiser les gènes les plus utiles, et pour faciliter les opérations de triage des génotypes les plus performants en cours de sélection ;

– l'application des techniques de culture *in vitro* pour les embryons, ce qui permettra l'obtention de nouveaux hybrides interspécifiques, mais aussi pour les anthères, ce qui permettra l'obtention de plantes haploïdes chez les légumineuses.

Remerciements

Les recherches sur l'amélioration des légumineuses vivrières ont bénéficié de l'appui financier de la Commission des Communautés Européennes (programme STD) et de l'Administration Générale de la Coopération au Développement de Belgique. Nous les en remercions. Nous tenons aussi à exprimer notre gratitude à M. Bannerot (INRA, France) et Maréchal (Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique) pour les conseils qu'ils nous ont prodigués lors de nos travaux.

Références

1. Baudoin JP (1991). La culture et l'amélioration de la légumineuse alimentaire *Phaseolus lunatus* L. en zones tropicales. CTA (Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale, Ede, Pays-Bas) et FSAGx (Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique) : 209 p.
2. Belivanis T, Doré C (1986). Interspecific hybridization of *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus angustissimus* A. Gray using *in vitro* embryoculture. *Plant Cell Rep* 5 : 329-331.
3. Braak JP, Kooistra E (1975). A successful cross between *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus ritensis* Jones with the aid of embryo culture. *Euphytica* 24 : 669-679.
4. Debouck DG (1986). Primary diversification of *Phaseolus* in the Americas : three centres ? FAO/IBPGR *Plant Genet Resourc Newsl* 67 : 2-8.
5. Debouck DG (1991). Systematics and morphology. *In :* Van Schoonhoven A, Voysest O, eds. *Common beans. Research for Crop Improvement.* CAB International and CIAT, Oxon, UK : 55-118.
6. Delgado-Salinas A (1985). Systematics of the genus *Phaseolus (Leguminosae)* in Mexico and Central America. Ph. D. Diss. Texas Univ., Austin, Texas, USA : 363 p.
7. Demarly Y (1977). *Génétique et amélioration des plantes.* Masson, Paris : 287 p.
8. Francis CA (1986). *Multiple cropping systems.* Macmillan, New York : 383 p.
9. Harding J,Allard RW (1969). Population studies in predominantly self-pollinated species. XII. Interactions between loci affecting fitness in a population of *Phaseolus lunatus* L. *Genetics* 61 : 721-736.
10. Harlan JR, De Wet JMJ (1971). Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon,* 20 : 509-517.
11. Harwood RR (1973). Crop interrelationships in intensive cropping systems. IRRI Seminar. Philippines.
12. Lackey JA (1983). A review of generic concepts in American *Phaseolinae (Fabaceae, Faboideae). Iselya* 2 : 21-64.

13. Ladizinsky G (1985). Founder effect in crop-plant evolution. *Econ Bot* 39 (2) : 191-199.
14. Le Marchand G, Maréchal R, Baudet JC (1976). Observations sur quelques hybrides dans le genre *Phaseolus*. III. *P. lunatus* : nouveaux hybrides et considérations sur les affinités interspécifiques. *Bull Rech Agron Gembloux* 11 : 183-200.
15. Lyman JP, Cardona C (1982). Resistance in Lima beans to a leaf hopper, *Empoasca kraemeri*. *J Econ Entomol* 75 : 281-286.
16. Maquet A, Guttierez Salgado A, Debouck DG (1990). Further biochemical evidence for the existence of two pools in Lima beans. *Ann Rep Bean Improv Coop* 33 : 128-129.
17. Maquet A, Wathelet B, Baudoin JP (1993). Further studies on the genetic diversity of Lima beans *(Phaseolus lunatus* L.) using allozymes. *Ann Rep Bean Improv Coop* 36 : 55-56.
18. Maréchal R, Baudoin JP (1978). Observations sur quelques hybrides dans le genre *Phaseolus*. IV. L'hybride *Phaseolus vulgaris* x *Phaseolus filiformis*. *Bull Rech Agron Gembloux* 13 : 133-240.
19. Maréchal R, Mascherpa JM, Stainier F (1978). Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna (Papilionaceae)* sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera* 28 : 1-273.
20. Muñoz LC, Baudoin JP, Bradfer C (1993). *In vitro* induction of androgenesis in *Phaseolus*. *Ann Rep Bean Improv Coop* 36 : 18-19.
21. Murthy BR, MenGesha MH (1989). World germplasm collections and their potential in crop productivity. In : *Collaboration on Genetic Resources*. Patancheru, India ; ICRISAT : 41-46.
22. Obando L, Baudoin JP, Dickburst C, Lepoivre P (1990). Identification de sources de résistance à l'ascochytose du haricot au sein du genre *Phaseolus*. *Bull Rech Agron Gembloux* 25 (4) : 443-457.
23. Prendota K, Baudoin JP, Maréchal R (1982). Fertile allopolyploids from the cross *Phaseolus acutifolius* x *Phaseolus vulgaris*. *Bull Rech Agron Gembloux* 17 : 177-190.
24. Rachie KO, Gardner CO (1975). Increasing efficiency in breeding partially outcrossing grain legumes. In : Int. Workshop on Grain Legumes. ICRISAT, Hyderabad, India : 285-300.
25. Sandhu TS (1992). Potential of genetic resources and biotechnology in pulse breeding. *Plant Breeding Abstracts* 62 : 131-139.
26. Schmit V, Baudoin JP (1987). Multiplication et évaluation de *Phaseolus coccineus* L. et *P. polyanthus* Greenm., deux espèces intéressantes pour l'amélioration de la productivité des légumineuses vivrières. *Bull Rech Agron Gembloux* 22 (3) : 235-253.
27. Schmit V, Debouck DG (1991). Observations on the origin of *Phaseolus polyanthus* Greenman. *Econ Bot* 45 : 345-364.
28. Schmit V, Baudoin JP (1992). Screening for resistance to *Ascochyta* blight in populations of *P. coccineus* and *P. polyanthus* Greenman. *Field Crops Res* 30 : 155-165.
29. Schmit V, Du Jardin P, Baudoin JP, Debouck DG (1993). Use of chloroplast DNA polymorphisms for the phylogenetic study of seven *Phaseolus* taxa including *P. vulgaris* and *P. coccineus*. *Theor Appl Genet.* 87 : 506-516
30. Singh KB (1991). Wild species as a source of resistance in cool season food legumes. *In :* Golden Jubilee Symposium on Genetic Research and Education : Current Trends and the Next Fifty Years. New Delhi, India ; Indian Society of Genetics and Plant Breeding, 297.
31. Stainier F (1974). Contribution à l'étude palynologique des *Papilionaceae – Phaseoleae – Phaseolinae* III. Étude de quelques espèces des genres *Phaseolus* L., *Vigna* Savi et *Physostigma* Balf. *Jard Bot Natl Belg* 44 : 1-15.
32. Vanderborght T (1983). Increasing seed of *Phaseolus coccineus* L. FAO/IBPGR *Plant Genet Resour Newsl* 53 : 17-18.
33. Wallace DH, Baudoin JP, Beaver J, Coyne DP, Halseth DE, Masaya PN, Munger HM. Myers JR, Silbernagel M, Yourstone KS, Zobel RW (1993). Improving efficiency of breeding for higher crop yield. *Theor Appl Genet* 86 : 27-40.
34. Wallace DH, Yourstone KS, Masaya PN, Zobel RW (1993). Photoperiod gene control over partitioning between reproductive and vegetative growth. *Theor Appl Genet* 86 : 6-16.

35. Wallace DH, Zobel RW, Yourstone KS (1993c). A whole-system reconsideration of paradigms about photoperiod and temperature control of crop yield. *Theor Appl Genet* 86 : 17-26.
36. Weilenmann de Tau ME, Baudoin JP, Maréchal R (1986). Obtention d'allopolyploïdes fertiles chez le croisement entre *Phaseolus vulgaris* et *Phaseolus filiformis. Bull Rech Agron Gembloux* 21 : 35-46.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1995, pp. 51-63.

6

Sélection récurrente des plantes autogames, exemple du blé tendre

MAXIME TROTTET, LAURENT SAUR

INRA, Station d'Amélioration des plantes, BP 29, 35650 Le Rheu, France.

Depuis les débuts de l'amélioration raisonnée des plantes, à la fin du XIX[e] siècle, les sélectionneurs ont régulièrement réutilisé les meilleures lignées et variétés issues d'un programme de sélection comme géniteurs (avec des lignées venant d'autres programmes ou de l'extérieur) pour les croisements du cycle suivant. Peu à peu, le temps entre la réalisation d'un croisement et l'utilisation des lignées qui en sont issues s'est raccourci et, actuellement, beaucoup de sélectionneurs utilisent des lignées jeunes (F6 ou F5) dans leurs programmes de croisements. Dès le début, la sélection a donc eu un aspect cyclique avec amélioration progressive d'un type de matériel, ce qui correspond à un des aspects de la sélection récurrente. Cependant, alors qu'en sélection « classique » l'intensité de sélection est très forte et variable d'un croisement à l'autre, en sélection récurrente, elle est souvent fixée à l'avance et peu élevée. C'est une différence importante entre la sélection récurrente et la sélection « classique ». Cela conduit à sélectionner un plus grand nombre de familles qui participeront à l'intercroisement pour débuter le cycle suivant. Le but de la sélection récurrente est de conserver une grande variabilité dans une population, afin de permettre de continuer l'amélioration génétique. Dans la sélection classique, on cherchera à pallier la perte de variabilité par l'utilisation de géniteurs provenant d'autres programmes ou obtenus par d'autres sélectionneurs. Très tôt, certains sélectionneurs ont insisté sur l'intérêt de séparer la sélection en deux phases : la création et l'amélioration de populations, et l'exploitation de la variabilité en création variétale [18]. Cette distinction est aussi une des caractéristiques de la sélection récurrente. La sélection récurrente conduit souvent à un raccourcissement du cycle de sélection (un à trois ans entre deux intercroisements), mais ce n'est pas toujours le cas puisque les premiers auteurs réalisaient leurs tests de sélection sur des F5 [5].

La sélection récurrente, d'abord appliquée aux animaux et aux plantes allogames, est encore peu utilisée pour l'amélioration des plantes autogames. Cependant, plusieurs expériences sont menées, en particulier sur les céréales à paille et le soja, soit en réalisant des croisements manuels, soit en utilisant la stérilité mâle génique.

Une des limites des méthodes de sélection récurrente avancée par de nombreux auteurs est le nombre maximum de croisements qu'il est possible de réaliser dans le programme de sélection. Compton [5] a décrit une procédure de sélection récurrente pour les plantes autogames, basée sur le principe de la filiation unipare, ne nécessitant que peu de croisements (200 à 400). Mais elle ne permet d'exploiter que la variabilité génétique additive, et suppose que celle-ci est prépondérante. Elle n'exploite que la variabilité entre croisements, mais l'auteur montre que celle-ci est la plus importante pour les caractères additifs. Empig [7] propose une amélioration de cette méthode en réalisant plusieurs diallèles en série, mais le nombre de croisements à réaliser devient rapidement très grand lorsque le nombre de génotypes augmente, ce qui limite le nombre de géniteurs utilisés au début de chaque phase d'intercroisement.

L'existence ou l'induction de systèmes de stérilité mâle génique chez le blé [6, 8, 19], a permis d'augmenter fortement le nombre de croisements réalisés par unité de temps. Suneson [23] a montré que, pour le blé, l'utilisation de la stérilité mâle génique permettait d'obtenir quatre fois plus de semence hybride par unité de temps dans le cas de la réalisation de croisements dirigés. Ce rapport est beaucoup plus favorable dans le cas de la réalisation d'intercroisements au hasard car il suffit alors de repérer les plantes mâles stériles lors de la floraison, mais il faut également semer la population en isolement. Des systèmes de stérilité mâle génique existent également chez de nombreuses autres espèces autogames (orge, soja...).

Quelques applications décrites dans la littérature

L'efficacité d'un schéma de sélection récurrente dépend beaucoup de la précision du test utilisé pour évaluer le matériel avant intercroisement. Au début, les sélectionneurs ont beaucoup hésité à réaliser ces tests sur des S_1 et ont préféré utiliser des lignées généralement obtenues par filiation unipare [5], avant d'adopter les tests sur S_1. Cependant, les études théoriques montrent que le progrès par cycle de sélection dépend de la corrélation entre les unités testées et les unités participant à l'intercroisement ; le progrès est le plus grand si l'on réalise les tests sur des lignées fixées, d'où l'intérêt des haploïdes doublés [4, 10, 12]. Ce qui intéresse le sélectionneur étant le progrès par année, il faut pouvoir obtenir les haploïdes doublés dans un temps suffisamment court pour que le progrès par année soit maximum. Il faut, en pratique, trouver le meilleur compromis entre le degré de fixation du matériel en évaluation, qui conditionne le progrès par cycle, et la durée du cycle de sélection.

Une autre question souvent posée est celle du nombre de cycles d'intercroisements à réaliser entre les unités sélectionnées avant de recommencer un cycle de sélection. Les études théoriques réalisées [1, 2, 17, 29] montrent que le résultat dépend des types d'interactions entre gènes. S'il n'y a que de l'additivité, le meilleur résultat sera obtenu avec un seul intercroisement ; seules certaines formes d'épistasie peuvent justifier les intercroisements multiples. De même, si ces intercroisements en série peuvent briser des liaisons indésirables, ils briseront aussi des liaisons favorables et le résultat est nul s'il n'y a pas sélection entre les intercroisements pour accumuler des liaisons favorables.

Les applications réalisées et les problèmes posés par la sélection récurrente, selon que l'on réalise des croisements manuels ou que l'on utilise la stérilité mâle génique, sont différents et nous allons aborder successivement ces deux aspects.

Utilisation des croisements manuels

Un certain nombre d'exemples de sélection récurrente avec utilisation des croisements manuels ont été publiés chez le blé. Ces travaux montrent, lorsqu'ils sont bien conduits, l'efficacité de la sélection récurrente pour améliorer les caractères sélectionnés. Comme dans toutes les expériences de sélection, la sélection sur un caractère n'est pas toujours sans influence sur les autres. Une sélection pour l'augmentation du taux de protéines [15] conduit, sur deux cycles, à une augmentation de 11 % par cycle mais aussi à une diminution du rendement de 8 % et du poids de 1 000 grains de 10 %, ainsi qu'à un accroissement de la hauteur et de la tardiveté des plantes. Hernandez Sierra [14] a obtenu une augmentation de rendement de 6 % par cycle. Une sélection pour l'augmentation du poids de 1 000 grains a conduit en quatre cycles à un progrès de 3 % à 7 % par cycle mais n'a eu aucun effet sur le rendement [3].

Pour les céréales d'hiver, la durée du cycle est généralement de 3 à 4 ans, mais pour des céréales de printemps avec 2 générations en serre et une génération de test au champ, on peut réaliser un cycle par an, comme l'ont fait Frey *et al.* [9] chez l'avoine de printemps en réalisant trois générations par an. Ils ont obtenu un progrès de 4,7 % par cycle (an) pour le rendement en protéines, et de 5,4 % pour le rendement en grains.

La plupart des expériences publiées correspondent à la sélection pour un ou un très petit nombre de caractères, souvent composantes d'un autre caractère. Pour créer des populations à partir desquelles on pourra sélectionner des variétés, la sélection récurrente doit être multicaractère, ce qui amène à utiliser des index de sélection.

Utilisation de la stérilité mâle génique

L'utilisation des croisements manuels conduit souvent à limiter le nombre de lignées utilisées, et, dans les grandes populations, il n'est pas toujours matériellement possible de réaliser un plan diallèle de croisement des unités sélectionnées, ce qui limite l'exploitation de la variabilité. L'utilisation de la stérilité mâle génique permet en partie de remédier à ces inconvénients.

L'utilisation de la stérilité mâle génique est bien adaptée à l'utilisation des ressources génétiques et à l'accumulation de caractères intéressants dans des génotypes qui seront ensuite repris dans d'autres méthodes de sélection pour faire de la création variétale. C'est d'ailleurs une des utilisations les plus fréquentes qui en est faite [20, 24, 26, 27]. La plupart de ces populations ont été créées et sélectionnées pour l'augmentation du niveau de résistance aux maladies, avec le plus souvent une sélection massale entre deux intercroisements.

Dans des populations avec stérilité mâle génique, les tests doivent être réalisés sur des plantes fertiles ou leur descendance, au moins pour les caractères liés au grain comme le rendement ou la résistance aux maladies de l'épi. Dans le cas d'une stérilité mâle récessive, la plante fertile est hétérozygote, et sa descendance sera en disjonction pour le caractère de fertilité ; cela peut nuire à la précision de l'estimation du rendement, mais permet de faire une sélection simultanée sur les deux sexes, puisque la descendance ou les frères des plantes testées sont en disjonction pour la fertilité. Dans le cas d'une stérilité mâle dominante, les plantes fertiles ne produiront plus de plantes

mâles stériles dans leur descendance. Les tests de sélection sur apparentés concernent donc un seul sexe. Le croisement des unités sélectionnées par la population en disjonction ferait perdre la moitié du progrès génétique. Ramage, Sorrells et Fritz [18, 22] proposent différents schémas de sélection récurrente utilisant la stérilité mâle génique dominante et faisant appel à des tests sur apparentés. Ils suggèrent de faire des tests sur des demi-frères descendant de la même plante mâle stérile pour sélectionner également les plantes femelles. On peut aussi, en faisant se chevaucher les cycles de sélection, croiser chaque année les plantes mâles testées par la population issue du croisement de l'année précédente, ce qui revient à croiser les plantes testées par des descendants des plantes testées l'année précédente, selon un schéma proche de celui utilisé par Trottet [28] avec la stérilité mâle génique récessive.

A partir des exemples tirés de la littérature, les croisements manuels semblent plus souvent utilisés lorsque l'objectif est de créer des variétés, et la stérilité mâle génique est plus souvent utilisée pour créer du matériel amélioré qui sera ensuite repris par une autre méthode pour faire de la sélection variétale.

Quelques exemples d'applications pour l'amélioration du blé tendre à l'INRA

Plusieurs populations sont sélectionnées à l'INRA ; nous présenterons ici trois exemples représentatifs de la grande variabilité des méthodes possibles : une population créée en utilisant des croisements manuels, et améliorée pour tous les caractères importants pour une variété ; deux populations utilisant une stérilité mâle génique, l'une récessive avec pour objectif principal de créer des plantes courtes et résistantes à la septoriose provoquée par *Stagonospora nodorum*, l'autre dominante avec pour objectif principal la résistance aux parasites qui se développent pendant la phase de formation du grain (rouille brune, septoriose et fusariose de l'épi).

Utilisation des croisements manuels : population PA

Trois stations de l'INRA ont créé, à partir de 1975, une population (PA) à partir de 16 parents par croisement pyramidal [25]. La durée du cycle est de trois ans. Cette population a subi quatre cycles de sélection récurrente, utilisant des observations réalisées dans trois lieux (Clermont-Ferrand, Le Moulon et Rennes). La population de départ est notée PA_0, celles issues de chaque cycle de sélection sont indiciées du numéro du cycle.

Année 1 : observation en un lieu favorable au développement des parasites (Rennes) des plantes S_0,
sélection sur index des meilleures plantes pour des caractères à forte héritabilité (comportement vis-à-vis des rouilles et de l'oïdium, hauteur et quelques composantes du rendement),
sélection de 300 plantes sur 1 500 à 2 000 plantes observées.

Année 2 : observation en pépinière en trois lieux des familles S_1,
test de résistance au piétin-verse à Rennes,
essai de rendement en parcelle monoligne dans les trois lieux,

sélection des 160 meilleures familles sur un index combinant le rendement et la résistance aux parasites,
réalisation de quelques tests indirects d'estimation de la qualité boulangère (teneur en protéines, Zeleny, Pelshenke),
sélection sur index des 80 meilleures familles.

Année 3 : intercroisement des familles sélectionnées,
chaque famille est croisée avec six autres : trois fois comme mâle et trois fois comme femelle, pour exploiter la variabilité intra-famille qui reste importante, des plantes différentes de chaque famille sont utilisées pour chacun des croisements, l'objectif est d'obtenir au moins 2 000 grains pour débuter le cycle suivant.

Après quatre cycles de sélection, nous constatons que le progrès a été important sur les caractères de résistance aux maladies, particulièrement sur les rouilles et l'oïdium. Des progrès ont également été réalisés pour la valeur boulangère. Le caractère sur lequel les progrès sont les plus faibles est le rendement. Mais entre les meilleures lignées sélectionnées à partir de PA_0 et les meilleures lignées issues de PA_1 on observe un légère progression du rendement.

Le point faible de ce schéma est l'estimation du rendement. Le faible nombre de grains disponibles impose de très petites parcelles (une ligne), les interactions entre parcelles sont fortes et difficiles à corriger. Par ailleurs, la ségrégation pour la précocité et la hauteur dans les lignes diminue la précision de l'estimation du rendement.

Utilisation de la stérilité mâle génique récessive : population CPms

Cette population a été créée avec un mutant mâle stérile récessif de Probus [8], pollinisé par 60 génotypes apportant la résistance à *S. nodorum* et/ou la taille courte et une résistance aux rouilles et à l'oïdium, l'objectif principal étant d'obtenir des plantes courtes et résistantes à la septoriose de l'épi.

Le premier cycle a commencé après trois ans d'intercroisement au hasard et a duré quatre ans. Depuis, la durée des cycles a été ramenée à trois ans [28]. Le cycle se compose comme suit :

Année 1 : sélection massale de « belles » plantes fertiles dans la population en ségrégation sur la hauteur, le comportement vis-à-vis des parasites (surtout les rouilles et l'oïdium), et la fertilité de l'épi.

Année 2 : observation en pépinière pour la résistance aux rouilles et à l'oïdium et, dans un test spécial, pour le comportement vis-à-vis de *S. nodorum* des descendances des plantes choisies.
Sélection des meilleures familles sur index combinant résistance et hauteur.

Année 3 : intercroisement en isolement des familles sélectionnées, en utilisant des grains S_1 (frères de ceux qui ont servi au test) qui ont été conservés, sélection massale sur des caractères faciles à observer avant et aussi après la floraison.
Un quart des plantes est mâle stérile, ce qui suffit pour permettre l'intercroisement.

En fait, pour équilibrer la quantité de travail à réaliser chaque année et permettre d'augmenter le nombre d'intercroisements sans augmenter la durée du cycle, un système de chevauchement des cycles est utilisé ; la durée totale de chaque cycle est de cinq

ans, mais la durée du début du cycle *n* au début du cycle *n+1* n'est que de trois ans (Figure 1).

Nous avons tenté d'évaluer l'efficacité de cette sélection en comparant la population de départ, $CPms_0$, et celles issues des deux premiers cycles de sélection, $CPms_1$ et $CPms_2$. L'année où l'essai a été réalisé au champ, le climat trop sec n'a pas permis le développement de la septoriose au champ. Bien que la sélection ait été réalisée avec des tests sur plantes adultes, nous avons estimé le progrès à partir du comportement de jeunes plantes S_0 et S_1 contaminées par *S. nodorum* au stade 2-3 feuilles. Dans une échelle à neuf classes, le gain a été d'un point par cycle de sélection, les estimations réalisées sur les deux générations sont concordantes. Ce progrès a été réalisé sans que la hauteur moyenne des plantes de la population soit modifiée. On observe cependant une diminution de la variance, ce qui traduit l'élimination des génotypes très hauts dans la population. Le progrès a également été important pour la résistance aux rouilles et à l'oïdium. Cela peut être dû au fait que, pour ces parasites, on a probablement sélectionné quelques gènes majeurs de résistance efficaces vis-à-vis des populations de parasites présentes à Rennes, et n'est pas une assurance de stabilité des résistances cumulées.

Utilisation de la stérilité mâle génique dominante : population DMs

Cette population a été créée à partir d'un mutant mâle stérile génique dominant de Chris [19], pollinisé par 200 génotypes apportant la résistance à la septoriose et/ou à la fusariose de l'épi, aux rouilles et à l'oïdium, et la taille courte. L'objectif principal est de sélectionner des plantes courtes ayant un bon niveau de résistance aux parasites se développant pendant les phases de fin montaison et de remplissage du grain.

Le cycle de sélection est analogue à celui pratiqué avec la population CPms, la principale différence se situant au niveau du plan d'intercroisement. En effet, la stérilité étant dominante, il n'y a plus de ségrégation de la fertilité dans les descendants des plantes fertiles. Les familles sélectionnées pour les caractères évalués après la floraison (résistance aux septoriose et fusariose) sont utilisées comme pollinisateurs des plantes mâles stériles non sélectionnées pour ces caractères. En pratique, les plantes S_1 des familles mâles fertiles sélectionnées et celles S_0 de la population en ségrégation pour la fertilité sont semées en lignes alternées ; les plantes fertiles de la ségrégation sont arrachées en tout début de floraison pour que l'intercroisement se fasse principalement par pollinisation des plantes mâles stériles par les plantes sélectionnées. Cela entraîne la perte de la moitié du progrès génétique attendu. Le chevauchement des cycles de sélection (Figure 2), qui conduit à des plantes issues d'un intercroisement par d'autres plantes sélectionnées l'année suivante, permet de retrouver une partie de ce progrès, mais cela est obtenu au prix du travail supplémentaire que représente l'élimination des plantes fertiles dans la partie en ségrégation de la population. Cette population termine son premier cycle de sélection.

Considérations sur le progrès génétique dans les différents schémas

Selon Gallais [11], le progrès génétique (ΔG) dépend de l'intensité de sélection (i), du taux de contrôle de la sélection sur les deux sexes (θ), de la corrélation entre la valeur en test et la valeur des descendants (r_{TM}), de l'héritabilité du test (h^2_T), de la variance génétique des descendants des unités sélectionnées (s^2_M) et de la longueur du cycle de sélection (t)

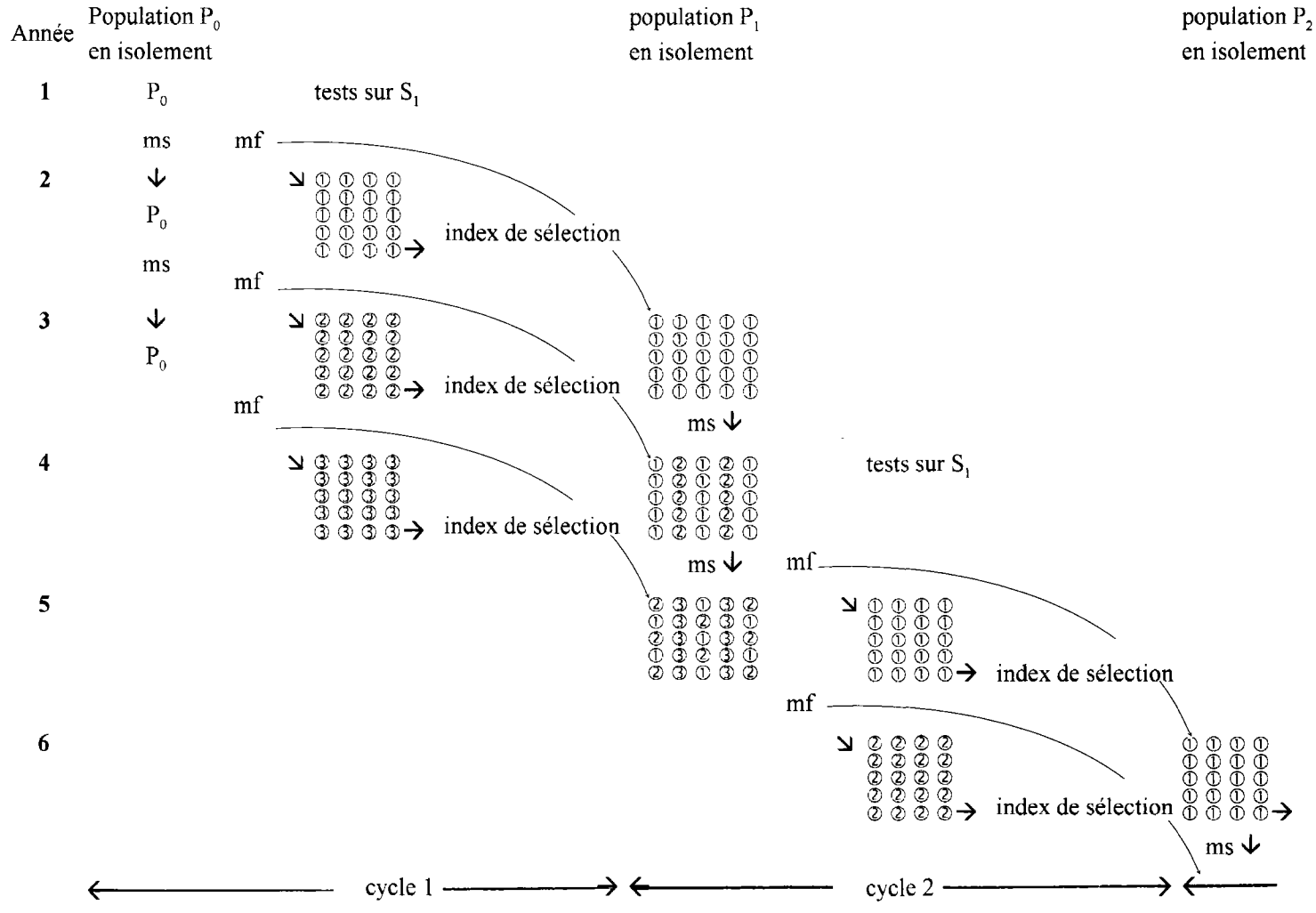


Figure 1. Schéma de sélection récurrente facilitée par la stérilité mâle génique récessive avec chevauchement des cycles de sélection.
① : plantes issues de la première année du cycle ; ② : plantes issues de la deuxième année du cycle ; ③ : plantes issues de la troisième année du cycle. ms : plantes mâles stériles ; mf : plantes fertiles.

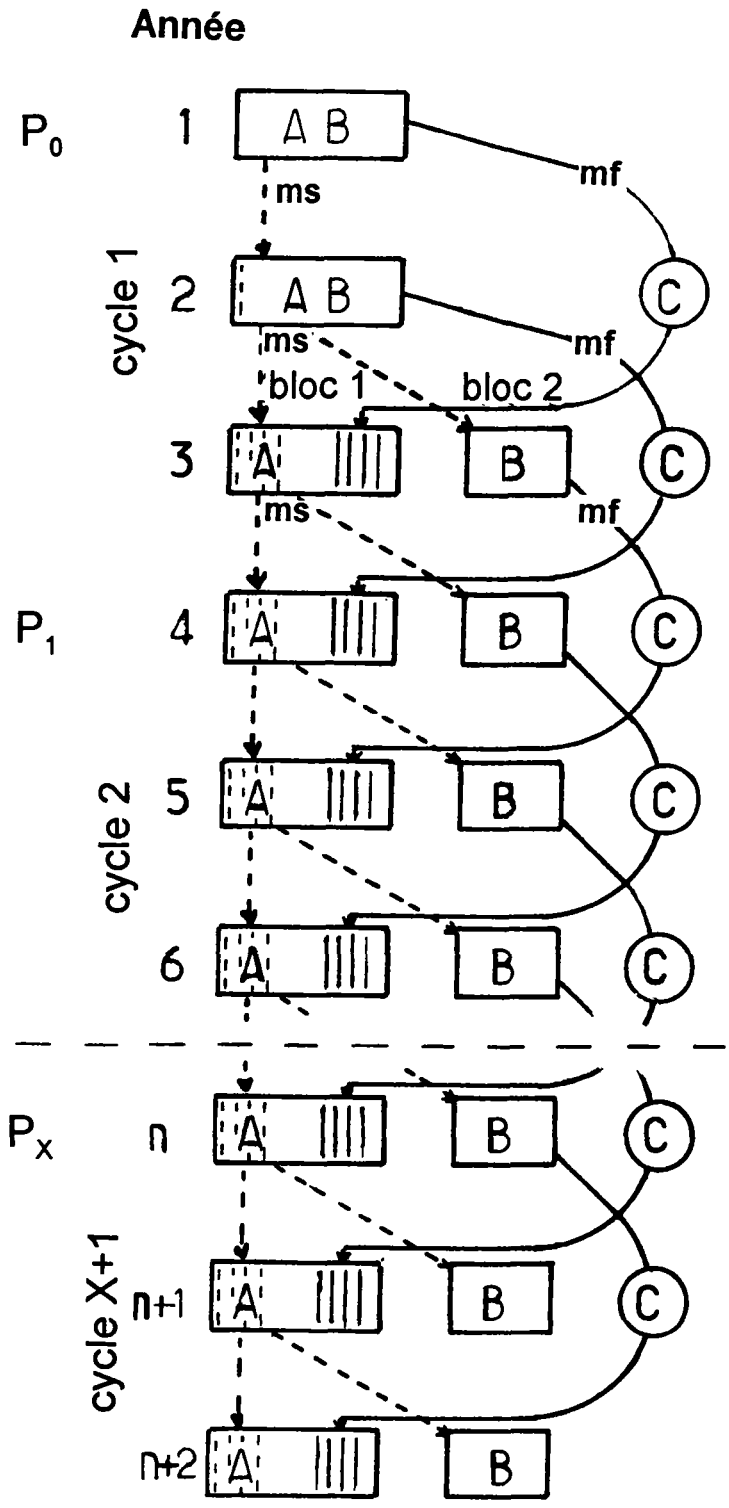


Figure 2. Schéma de sélection récurrente facilitée par la stérilité mâle génique dominante avec chevauchement des cycles de sélection.

A : sélection massale des plantes mâles stériles **(ms)** ; **B :** sélection massale des plantes fertiles **(mf)** ; **C :** tests de familles S_1 et sélection sur index ; $\mathbf{P_0}$ **:** population d'origine ; $\mathbf{P_1}$ **:** population dérivée du cycle x ; **bloc 1 :** plantes cultivées en isolement ; **bloc 2 :** plantes cultivées sans isolement. ..... : semences S_0 issues de plantes mâles stériles : _____ : semences S_1 issues de plantes fertiles.

$$\Delta G = \frac{i\, r_{TM}\, h_T \theta\, s_M}{t}$$

Pour différentes méthodes de sélection avec tests sur familles S_1, h_T (qui ne dépend que du test) et r_{TM} (qui dépendent des variances additives et de dominance du caractère) sont constants. Si l'intensité de sélection et la longueur du cycle sont les mêmes, les différences de progrès génétique attendu ne dépendent que de θ et S_M. Si F est le coefficient de consanguinité des génotypes testés et S_A^2 la variance génétique additive, il vient : $S_M^2 = \frac{1+F}{2} S_A^2$. Dans le cas des croisements manuels (Figure 3a), la sélection est réalisée sur les deux sexes, $\theta = 1$ pour les mâles et les femelles. Il en est de même avec la stérilité mâle génique récessive (Figure 3b), les plantes intercroisées étant les descendants des plantes sélectionnées. Dans les schémas avec une stérilité mâle génique dominante, la sélection pour certains caractères est faite seulement sur les plantes mâles. Le contrôle de la sélection pour les mâles est $\theta = 1$. Sans chevauchement des cycles, il n'y a pas de sélection des plantes femelles, $\theta = 0$. Dans le schéma avec chevauchement des cycles, les plantes femelles de la seconde année du cycle dérivent des plantes pollinisées avec les plantes mâles sélectionnées : le contrôle de la sélection est de 0,5. La troisième année, $\theta = 0{,}75$ pour les femelles. Le contrôle moyen pour les trois années du cycle est donc de 0,42 pour les femelles, soit 1,42 en moyenne pour les deux sexes.

Dans tous nos schémas, les plantes utilisées comme parents sont des pleins-frères des plantes testées. Le rapport des efficacités correspond donc au rapport de contrôle des parents lors de l'intercroisement. Cela doit néanmoins être nuancé lorsque le test est réalisé sur des plantes en ségrégation pour la fertilité, surtout lorsque l'on évalue des caractères du grain.

Sorrells et Fritz [22] suggèrent des schémas avec semis en ligne des plantes demi-frères descendant de chaque plante mâle stérile issue de sélection massale, et sélection de plantes fertiles et mâles stériles dans les lignes. Ainsi, les tests sur les plantes S_1 fertiles donnent une information sur leurs apparentés mâles stériles. Si les lignes sont cultivées en isolement (Figure 3c), les plantes mâles stériles sont des demi-frères des S_1 ($S_M^2 = \frac{1}{4} S_A^2$, $\theta = 0{,}5$ pour les plantes femelles). Si elles ne sont pas cultivées en isolement (Figure 3d), le reliquat de semences des plantes à l'origine des S_1 sélectionnées sera utilisé comme source de stérilité mâle ($S_M^2 = \frac{1}{8} S_A^2$, $\theta = 0{,}5$ pour les plantes femelles). Mais les plantes mâles stériles sont pollinisées par les plantes fertiles de l'ensemble de la population, ce qui réduit de moitié le contrôle des plantes mâles, à moins que l'on ne réalise des croisements frère-sœur.

Les comparaisons entre les progrès génétiques attendus pour les différentes méthodes sont données dans le Tableau I pour le même nombre de familles S_1 évaluées dans un cycle.

Le chevauchement des cycles améliore fortement l'efficacité de la sélection par rapport à un schéma dans lequel les plantes femelles ne sont pas sélectionnées. L'avantage est plus faible lorsque les femelles sont des demi-frères des familles S_1, comme dans le schéma de Sorrells et Fritz [22]. Mais toutes ces méthodes sont moins efficaces que celles utilisant les croisements manuels ou la stérilité mâle génique récessive. Cela était déjà mis en évidence par Knapp et Cox [13] pour des méthodes sans chevauchement de cycle. Dans le cas de la stérilité mâle génique récessive, la valeur de h_T^2 est réduite pour les caractères liés au grain, le progrès attendu pour ces caractères est donc infé-

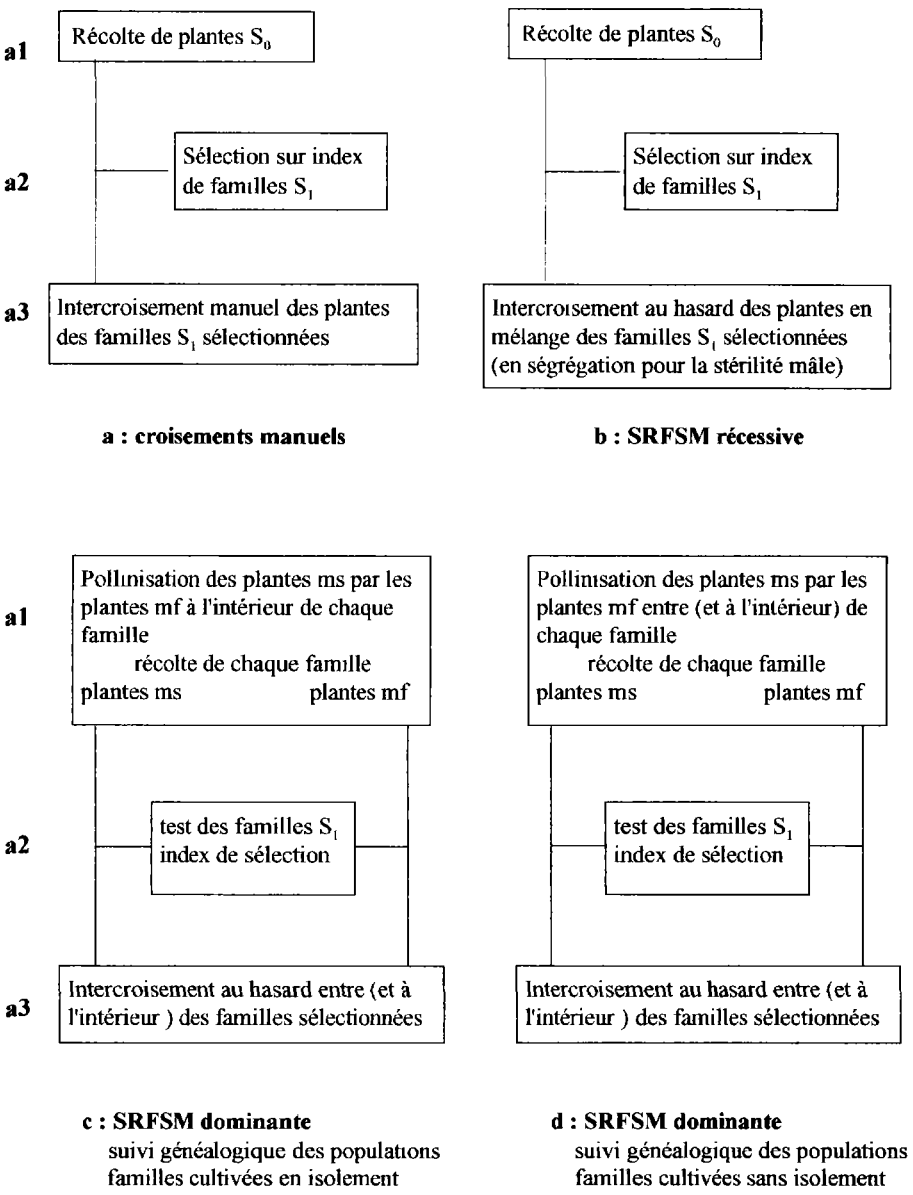


Figure 3. Représentation de quatre schémas de sélection récurrente chez des plantes autogames avec des tests de sélection sur familles S_1 et un cycle de sélection de trois ans.
(**a1, a2, a3 :** années 1, 2, 3 ; **ms :** mâle stérile, **mf :** mâle fertile.)

Tableau I. Progrès génétique attendu par cycle de trois ans pour différents schémas de sélection récurrente avec sélection sur S_1.

Méthode		θ	σ_M	Progrès génétique
Croisements manuels ou SRFSM récessive	mâle	1	$\sqrt{\frac{1}{2}}S_A$	1,414 i h_T r_{TM} s_A
	femelle	1		
SRFSM dominante avec plantes femelles en bulk non sélectionnées	mâle	1	$\sqrt{\frac{1}{2}}S_A$	0,707 i h_T r_{TM} s_A
	femelle	0		
SRFSM dominante avec chevauchement des cycles	mâle	1	$\sqrt{\frac{1}{2}}S_A$	1,004 i h_T r_{TM} s_A
	femelle	0,42		
SRFSM dominante avec maintien généalogique en isolement de la population des femelles demi-frères	mâle	1	$\sqrt{\frac{1}{2}}S_A$	0,957 i h_T r_{TM} s_A
	femelle	0,5	$\sqrt{\frac{1}{4}}S_A$	
SRFSM dominante avec maintien généalogique sans isolement de la population des femelles demi-frères	mâle	1	$\sqrt{\frac{1}{2}}S_A$	0,884 i h_T r_{TM} s_A
	femelle	0,5	$\sqrt{\frac{1}{8}}S_A$	

SRFSM : Sélection récurrente facilitée par la stérilité mâle génique.
θ : taux de contrôle de la sélection sur les deux sexes.
σ^2_M : variance génétique des descendants des unités sélectionnées.
i : intensité de sélection.
h^2_T : héritabilité du test.
r_{TM} : corrélation entre la valeur en test et la valeur des descendants.
s^2_A : variance génétique additive.

rieur à celui des schémas avec croisements manuels. Ainsi, pour des populations créées avec un petit nombre de parents (moins de 20) il vaut probablement mieux utiliser les croisements manuels. Pour un plus grand nombre de parents, l'utilisation de la stérilité mâle génique pourrait compenser la perte de gain génétique attendu par l'augmentation du nombre de croisements qui permet une meilleure exploitation de la variabilité.

Remarques conclusives

Les deux systèmes de stérilité mâle présentent des avantages et des inconvénients complémentaires. La stérilité récessive permet facilement de faire une sélection sur les deux sexes, mais rend plus difficile la sélection sur les caractères estimés à partir du grain (rendement, qualité), et retarde la fixation lors du processus de création variétale. La stérilité dominante permet plus facilement l'évaluation du rendement et la fixation de lignées, mais impose un schéma de sélection plus coûteux. Le gain d'efficacité apporté par le chevauchement des cycles, et le contrôle de la pollinisation induisent un travail supplémentaire. L'utilisation de gamétocides chimiques permettrait de cumuler les avantages des deux systèmes sans en avoir les inconvénients.

Les deux schémas avec stérilité mâle que nous avons présentés prennent en compte uniquement la résistance aux parasites, quelques caractères morphologiques et l'aspect des épis et des grains. Un caractère important comme le rendement n'est pas pris en compte. Pour ne pas allonger le cycle de sélection, on peut, soit réintroduire les meilleures lignées pour le rendement du cycle n lors de l'intercroisement du cycle $n + 2$, soit utiliser les lignées résistantes obtenues comme géniteurs dans d'autres programmes.

Les gènes de nanisme *Rht1* et *Rht2* sont présents dans ces populations ; or la taille optimale recherchée correspond à des lignées portant un seul de ces gènes (demi-naines). Lors de l'intercroisement, on obtient également des plantes hautes et naines qu'il faut éliminer, et la ségrégation pour la hauteur diminue l'efficacité de l'évaluation d'autres caractères. Pour éliminer ce défaut, nous sommes en train de constituer des populations avec un seul gène de nanisme. Dans le même ordre d'idée, on peut suggérer d'introduire à l'état homozygote d'autres gènes gouvernant des caractères importants, comme le gène *Pch1* de résistance au piétin-verse.

La stérilité récessive est la plus efficace pour exploiter tout le progrès lors de la réalisation de l'intercroisement, mais elle peut gêner l'estimation des caractères liés au grain, et il faut au moins deux générations pour obtenir des lignées fixées pour la fertilité. La stérilité dominante a les avantages et les inconvénients inverses : l'évaluation des familles et la fixation des lignées est plus facile, mais cela se traduit par une perte du progrès pour certains caractères lors de l'intercroisement.

Références

1. Altham DW, Busch FH (1984). Random intermating before selection in spring wheat. *Crop Sci* 24 : 1085-1089.
2. Bos I (1977). More arguments against intermating F2 plants of a self-pollinating crop. *Euphytica* 26 : 33-46.
3. Busch RH, Kofoid K (1982). Recurent selection for kernel weight in spring wheat. *Crop Sci* 22 : 568-572.
4. Choo TM, Kannenberg LW (1988). Selection response and efficiency of doubled-haploid recurrent selection in a cross-fertilized species. *Theor Appl Genet* 75 : 410-414.
5. Compton WA (1968). Recurrent selection in self-pollinated crops without extensive crossing. *Crop Sci* 8 : 773.
6. Deng JY, Gao ZL (1982). Discovery and determination of a dominant male-sterile gene and its importance in genetics and wheat breeding. *Sciencia Sinica* (Series B) 25 : 508-516.

7. Empig LT (1971). A program designed to maximize genetic variability in the breeding of self-fertilising crops. *Philippine Agriculturist* 54 : 319-324.
8. Fossati A, Ingold M. (1970). A male sterile mutant in *Triticum aestivum. Wheat Information Service* 30 : 8-10.
9. Frey KJ, McFerson JK, Branson CV (1988). A procedure for one cycle of recurrent selection per year with spring sown small grains. *Crop Sci* 28 : 855-856.
10. Gallais A (1989). Optimisation of recurrent selection on the phenotypic value of doubled haploid lines. *Theor Appl Genet* 77 : 501-504.
11. Gallais A (1990). *Théorie de la sélection en amélioration des plantes.* Masson, Paris, 588 p.
12. Griffing B (1975). Efficiency change due to use of doubled-haploids in recurrent selection methods. *Theor Appl Genet* 46 : 367-386.
13. Knapp SJ, Cox TS (1988). S_1 family recurrent selection in autogamous crops based on dominant genetic male sterility. *Crop Sci* 28 : 227-231.
14. Hernandez-Sierra A (1982). Recurrent selection methods in wheat *(Triticum aestivum* L.). *Dissertation Abstracts International* 43 : 11B.
15. Mahdy EE (1988). Recurrent selection for grain protein content in spring wheat, *Triticum aestivum* L. *Cereal Res Commun* 16 : 195-201.
16. Nanda GS, Hazarika GN, Gill KS (1981). Recurrent selection in an inter-varietal cross of wheat. *Indian J Genet Pl Breed* 41 : 18-24.
17. Pederson DG (1974). Arguments against intermating before selection in a self fertilising species. *Theor Appl Genet* 45 : 157-162.
18. Ramage RT (1977). Varietal improvement of wheat through male-sterile facilitated recurrent selection. *ASPAC Food & Fertiliser Technology Ctr Tech Bull* 37 : 6p.
19. Sasakuma T, Maan SS, Williams ND (1978). EMS induced male sterility in euplasmic and alloplasmic common wheat. *Crop Sci* 18 : 850-853.
20. Sharp EL (1979). Male sterile facilitated recurrent selection populations for developping broad-based resistance by major and minor effect genes. *Phytopathology* 69 : 1045 (Abstr.).
21. Silvela L, Diez-Barra R (1985). Recurrent selection in autogamous species under forced random mating. *Euphytica* 34 : 817-832.
22. Sorrells ME, Fritz SE (1982). Application of a dominant male sterile allele to the improvement of self-pollinated crops. *Crop Sci* 22 : 1033-1035.
23. Suneson CA (1962). Use of Pugsley's sterile wheat in cross breeding. *Crop Sci* 2 : 534-535.
24. Suneson CA, Pope WK, Jensen NF, Poehlman JM, Smith GS (1963). Wheat composite cross I created for breeders everywhere. *Crop Sci* 3 : 101-102.
25. Thomas G, Rousset M, Pichon M, Trottet M, Doussinault G, Picard E (1991). Méthodologie de l'amélioration de blé tendre *(Triticum aestivum* L.). I. Création par croisements et analyse d'une population artificielle à 16 parents, base de cette étude méthodologique. *Agronomie* 11 : 359-368.
26. Thompson RK, Shantz KC (1978). Registration of MSFRS wheat germplasm composite crosses A and B-76. *Crop Sci* 18 : 698.
27. Thompson RK (1983). Registration of AZ-MSFRS-82RR rust resistant common wheat germplasm (Reg. No. GP217). *Crop Sci* 23 : 605.
28. Trottet M (1988). Use of genic male sterility for breeding wheat lines resistant to *Leptosphaeria nodorum* Müller : results of a first selection cycle and prospect. *Proc 7th Int Wheat Genet Symp* Cambridge : 1199-1202.
29. Yonezawa K (1983). Selection strategy in breeding of self-fertilizing crops. V. Evaluation of intermating under a fixed breeding cost. *Jpn J Breed* 33 : 423-438.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1995, pp. 65-78.

7

Évaluation de six accessions de lentille *(Lens culinaris* L.*)*

ABDELAZIZ EL HOUJJAJI [1,2], FARHAT CHIBANI [2], HABIB KALLEL [1], ALY AAIES [1,2]

1. Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences de Tunis, Campus Universitaire, 1060 Le Belvédère, Tunis, Tunisie.
2. Unité de Biologie, INRST BP 95, 2050 Hammam-Lif, Tunisie.

Résumé

La mise en évidence d'une variabilité morphologique inter et intra-accessions a été réalisée sur six accessions de lentille (Lens culinaris. *L) prospectées et collectées à travers différentes régions de la Tunisie. L'analyse de la variance des caractères morphologiques étudiés a montré une diversité assez importante. La comparaison des moyennes nous a conduits à la construction de dendrogrammes à partir des indices de proximité déterminant ainsi le degré de ressemblance entre les différentes accessions de lentille en Tunisie. Cette analyse a montré par ailleurs que les accessions ont tendance à se regrouper selon leurs origines géographiques. En outre, nous avons pu dégager un ensemble de caractéristiques présentes chez certaines variétés. Ainsi, les accessions du Sud présentent un aspect prostré. L'aspect spiralé a été rencontré chez une variété du Nord. L'aspect érigé caractérise les variétés du Centre. Les accessions du Sud sont des variétés du type* Microsperma. *Celles du Centre et du Nord appartiennent à la catégorie* Macrosperma.

La lentille *(Lens culinaris.* L*)* est une plante herbacée dont le cycle de développement est variable, dépendant principalement des conditions du milieu [10].

Les lentilles occupent une place importante dans les systèmes de culture en zones arides, semi-arides ainsi que dans les zones tempérées. Elles constituent un important

réservoir de richesse génétique. Leur importance réside surtout dans leurs multiples fonctions et usages [3, 7].

Dans le but d'étudier et d'estimer la diversité génétique des lentilles tunisiennes, une évaluation morphologique et agronomique a été réalisée en culture contrôlée.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé provient de différentes collectes effectuées dans le cadre du programme « Conservation et Évaluation des Ressources Phytogénétiques : Banque de Gènes ».

Notre étude a porté sur six accessions dont l'origine géographique est indiquée sur la carte (Figure 1) :

Deux accessions du Sud :	* L-07-89 : de Béni-Khédache
	* L-12-89 : de l'île de Djerba
Deux accessions du Centre :	* L-17-89 : de Souassi
	* L-30-89 : de Sayada

Les accessions L-26-89 de Ncir et L-33-89 de Nefza ont été fournies par le Laboratoire des Légumineuses Alimentaires de l'Institut National de Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT). Elles étaient acclimatées dans le nord de la Tunisie. Ce sont des variétés originaires de Syrie et de Palestine introduites par le biais de l'ICARDA.

On appelle accession un lot, un échantillon ou une population de plantes d'une espèce donnée collectée et conservée dans notre « Banque de Gènes » en vue de son évaluation et de son amélioration.

L-X-89 est le numéro d'identité d'une accession dans une « Banque de Gènes » avec :

« L » initiale de la plante étudiée relative à *Lens,*

« X » le numéro d'ordre de la collecte,

« 89 » l'année de la collecte..

Étude de la variabilité morphologique

Les essais de culture ont été effectués dans la serre de la Faculté des Sciences de Tunis durant la période s'étendant du 17.11.1991 au 10.05.1992. Le but de cette étude est de mettre en évidence une variabilité morphologique inter et intra-accessions surtout durant les premiers mois du développement de la plante.

• *Dispositif expérimental*

Les six accessions sont mises à germer dans des boîtes de Pétri de 15 cm de diamètre, à raison de trente graines par boîte. Les boîtes de Pétri sont placées dans une chambre de culture à 25 °C et à l'obscurité.

Le taux de germination des différentes accessions est de 95 % à 100 %. Les graines germées sont ensuite repiquées dans des pots en plastique et disposées selon une randomisation totale à raison de 40 individus par accession. Ces individus sont considérés comme des répétitions.

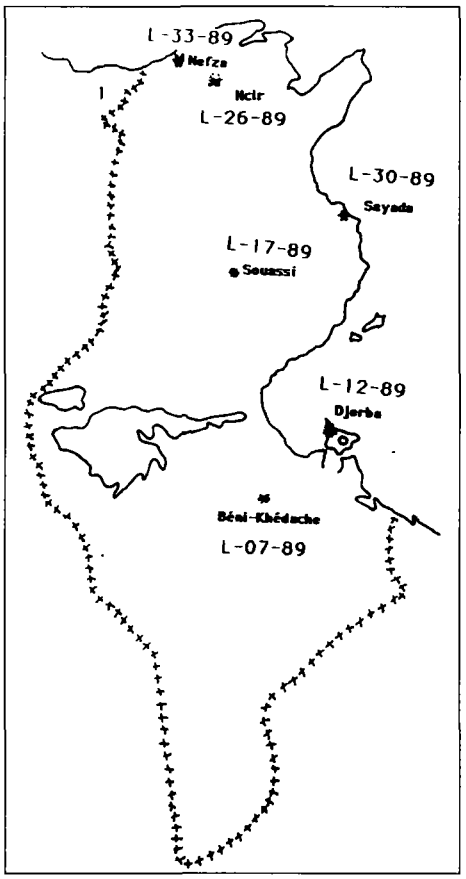


Figure 1. Localisation géographique des accessions de lentille étudiées.

• ***Caractères morphologiques mesurés durant les trois premiers mois de culture***

Les caractères morphologiques analysés sont :

- LTP : Longueur de la tige principale en centimètre
- Nb.F/Pl : Nombre de feuilles par plante
- Nb.f/d.F : Nombre de folioles portées par la dernière feuille
- Nb.f/Pl : Nombre de folioles par plante
- Nb.B.I : Nombre de branches primaires
- Nb.B.II : Nombre de branches secondaires
- Nb.B.III : Nombre de branches tertiaires

Les deux derniers caractères n'apparaissent qu'à partir du deuxième mois de culture.

• ***Analyse des résultats***

Les données expérimentales ont été traitées par des méthodes d'analyse statistique.

Afin de mettre en évidence la variabilité due au génotype, nous avons utilisé le

modèle d'analyse de la variance à un critère de classification [5]. Cette analyse permet de calculer la valeur de « F » (facteur Fisher) que nous comparons à une valeur théorique. Trois cas peuvent se présenter :

– Si « F » calculé est inférieur à « F » théorique, le test est non significatif (NS).

– Si « F » calculé est supérieur à « F » théorique au seuil de 5 %, le test est dit significatif (S).

– Dans le cas où « F » calculé est supérieur à « F » théorique au seuil de 1 %, le test est dit hautement significatif (HS). Dans les deux derniers cas, l'hypothèse de l'hétérogénéité des moyennes est donc retenue. Ainsi nous pouvons comparer les moyennes pour chaque caractère des accessions prises deux à deux en utilisant le test de Duncan [4].

La méthode de Duncan nous permet d'obtenir un ensemble de groupes à partir desquels nous avons pu estimer la ressemblance entre les accessions étudiées, et ce, en adoptant la méthode de calcul des indices de proximité [9]. Cette méthode consiste à calculer les distances entre les accessions pour chaque caractère.

Cette distance est nulle entre deux accessions appartenant à un même groupe pour un caractère donné. Elle est égale à 1 lorsque les deux accessions appartiennent à deux groupes distincts, chevauchants ou adjacents. Elle sera égale à 2 si les deux accessions appartiennent à deux groupes différents et séparés par un seul groupe, etc.

On construit ainsi une matrice des distances pour chaque caractère. A partir de ces matrices, nous calculons la somme des distances pour construire une matrice renfermant les distances globales. Celles-ci sont obtenues en additionnant les distances obtenues pour tous les caractères étudiés. On définit l'indice de proximité pour chaque couple considéré comme suit :

$$Ip = (M - d_{ij})/M \times 100$$

M : distance globale maximale

d_{ij} : distance globale entre deux accessions i et j

Les indices de proximité calculés nous permettent de construire un dendrogramme [9].

Autres paramètres mesurés

– l'indice de floraison de 50 % de la population : Ip.50 %,

– le nombre de fleurs par pédoncule : Nb.fl/pd,

– la couleur des fleurs : Cl.fl,

– le poids de 100 grains.

Résultats

L'analyse biométrique de l'ensemble des données expérimentales obtenues à partir d'une culture en serre nous a permis d'estimer la diversité qui existe entre les différentes accessions de lentille de Tunisie. De même elle a permis de déterminer leur degré de ressemblance.

L'analyse des caractères morphologiques par des méthodes statistiques a démontré l'efficacité de celles-ci dans l'étude de la variabilité [6, 8, 14].

Analyse de la variance et comparaison des moyennes

Certaines graines ne se sont pas développées lors de l'expérimentation, en conséquence le nombre d'individus pris dans l'analyse de la variance n'est que de 212 (30 à 35 par accession).

Les résultats obtenus par l'analyse de la variance : les tableaux I, II, III, montrent l'existence d'un « effet génotype » significatif et d'une hétérogénéité inter-accessions pour tous les caractères étudiés durant le stade végétatif.

L'analyse de la variance est complétée par une comparaison des moyennes de tous les caractères considérés en utilisant le test de Duncan [5]. Les Tableaux IV, V, VI résument les résultats obtenus. Ceux-ci indiquent que les accessions se répartissent en groupes dont le nombre varie de 4 à 5, et dont certains sont chevauchants.

Le caractère « LTP » présente une moyenne variant entre 4,208 et 8,828 au stade du 1er mois ; 9,680 et 19,355 au stade du 2e mois et 24,500 et 45,711 au 3e mois. La valeur la plus élevée se rencontre chez l'accession du Nord (L-33-89). Cette caractéristique est observée durant tout le stade végétatif de la plante, alors que les accessions du Sud présentent au contraire les moyennes les plus faibles.

Au deuxième et au troisième mois, la L-26-89 provenant du Nord semble être plus proche des accessions du Centre que de la L-33-89 provenant elle aussi du Nord. Ainsi, cette dernière se caractérise par une hauteur maximale de la tige principale. Cette caractéristique contribue de façon importante à une bonne productivité, alors que l'accession L-26-89 présente le maximum de branches primaires, secondaires et tertiaires. Tous ces facteurs convergent vers un point commun qui est l'obtention d'un rendement élevé.

Pour le caractère « LTP », et malgré son origine (Nord), la L-26-89 présente des tiges de la même longueur que les accessions du Centre. Cela peut être justifié par l'apparition d'autres caractères morphologiques qui prennent le relais comme par exemple le caractère Nb.B.I. De même, les caractères Nb.B.II et Nb.B.III manifestent des moyennes maximales respectivement durant le deuxième et le troisième mois. Le caractère « LTP » présente un gradient de taille croissant en allant du Sud vers le Nord.

Pour le caractère : nombre de feuilles par plante (Nb.F/Pl), les accessions du Sud présentent des moyennes minimales alors que les accessions du Nord se caractérisent par les moyennes maximales. Au stade du premier mois, ce caractère pourrait être utilisé comme critère de discrimination.

Le nombre de folioles par plante (Nb.f/Pl) montre des moyennes maximales aussi bien au premier (Tableau IV) qu'au deuxième mois (Tableau V) chez les accessions du Nord. Les accessions du Sud présentent des moyennes minimales aussi bien au premier qu'au deuxième mois. Ce caractère montre trois groupes non chevauchants au deuxième mois de culture (Tableau V).

Cette analyse nous permet d'expliquer certains phénotypes observés. Ainsi chez l'accession L-33-89, la tige principale de longueur maximale finit par se spiraliser en donnant ainsi un port spiralé aux individus de cette accession (Figure 2). De même, l'abondance de branches primaires, secondaires et tertiaires donne aux individus de l'accession L-26-89 un port prostré (Figure 3). Ce même port est observé chez les accessions du Sud qui présentent durant leur développement végétatif une tige principale de petite taille et un nombre important de branches primaires malgré leur apparition tardive contrairement aux autres accessions étudiées. Les accessions du Centre présentent un port prostré chez certains individus et un port érigé chez d'autres.

Tableau I. Analyse de la variance pour les mesures effectuées au premier mois.

Variables	Source de variations	S.C.E.	d.d.l	C.M.	F
L.T.P.	échantillon	752.30	5	150.64	42.01**
	résiduelle	755.69	211	3.58	
Nb.F/Pl.	échantillon	173.580	5	37.716	20.10**
	résiduelle	364.346	211	1.726	
Nb.f/dF	échantillon	40.756	5	8.751	13.47**
	résiduelle	127.722	211	0.605	
Nb*B.laire	échantillon	81.575	5	16.315	33.66**
	résiduelle	102.27	211	0.484	
Nb.f/Pl	échantillon	3056.87	5	611.37	16.89**
	résiduelle	7639.32	211	36	

F^{5}_{211} = 3.11 (Théorique à 1 %) * effet significatif

F^{5}_{211} = 2.26 (Théorique à 5 %) ** effet hautement significatif

Tableau II. Analyse de la variance pour les mesures effectuées au deuxième mois.

Variables	Source de variations	S.C.E.	d.d.l	C.M.	F
L.T.P	échantillon	2651.37	5	530.27	32.05**
	résiduelle	3491.00	211	16.545	
Nb.F/Pl.	échantillon	2853.55	5	570.71	17.27**
	résiduelle	6974.67	211	33.05	
Nb.f/dF	échantillon	463.932	5	92.786	35.46**
	résiduelle	558.307	211	2.646	
NbB.laire	échantillon	42.52	5	8.504	2.46*
	résiduelle	728.47	211	3.452	
Nb.f/Pl	échantillon	230941.03	5	461.8820	21.2**
	résiduelle	445605.72	211	211.87	
Nb.BIIaire	échantillon	121.161	5	24.232	8.82**
	résiduelle	579.40	211	2.745	

F^{5}_{211} = 3.11 (Théorique à 1 %) * effet significatif

F^{5}_{211} = 2.26 (Théorique à 5 %) ** effet hautement significatif

Tableau III. Analyse de variance pour les mesures effectuées au troisième mois.

Variables	Source de variations	S.C.E.	d.d.1	C.M.	F
L.T.P	échantillon	11459.81	5	2291.96	57.69**
	résiduelle	8382.23	211	39.72	
Nb.F/Pl.	échantillon	123931.52	5	24786.30	07.20**
	résiduelle	726054.75	211	3441.01	
Nb.f/dF	échantillon	398.124	5	79.624	26.76**
	résiduelle	627.810	211	2.975	
NbB.Iaire	échantillon	233.51	5	46.702	4.96*
	résiduelle	1988.01	211	9.421	
Nb.f/Pl	échantillon	1563.033	5	312.606	12.31**
	résiduelle	5357.437	211	25.390	
Nb.BIIIaire	échantillon	111.133	5	22.226	04.26**
	résiduelle	1096.806	211	51.98	

F^{5}_{211} = 3.11 (Théorique à 1 %) * effet significatif

F^{5}_{211} = 2.26 (Théorique à 5 %) ** effet hautement significatif

Tableau IV. Comparaison des moyennes par le test de Duncan pour les mesures effectuées au premier mois, des accessions de lentille.

	Accessions					
Origine géographique	Nord		Centre		Sud	
Variables	L-33-89	L-26-89	L-30-89	L-17-89	L-07-89	L-12-89
L.T.P.	8.828 (a)	8.067 (a, b)	8.016 (b)	7.8258 (b)	4.442 (c)	4.208 (c)
Nb.F/Pl	5.368 (b)	6.081 (a, b)	6.200 (a)	4.736 (c)	4.105 (d)	3.833 (d)
Nb.f/dF	4.657 (a)	4.837 (a)	4.066 (b)	4.078 (b)	3.921 (b, c)	3.583 (c)
Nb.B.Iaire	0.921 (b)	1.405 (a)	1.600 (a)	0.552 (c)	– (d)	– (d)
Nb.f/Pl	18.342 (a)	19.216 (a)	16.567 (a)	13.158 (b)	10.605 (b, c)	9.500 (c)

Les valeurs marquées avec la même lettre ne sont pas significativement différentes.

Tableau V. Comparaison des moyennes par le test de Duncan pour les mesures effectuées au deuxième mois, des accessions de lentille.

	Accessions					
Origine géographique	Nord		Centre		Sud	
Variables	L-33-89	L-26-89	L-30-89	L-17-89	L-07-89	L-12-89
L.T.P.	19.355 (a)	15.365 (b)	14.833 (b)	15.828 (b)	9.776 (c)	9.680 (c)
Nb.F/Pl	16.684 (b)	20.865 (a)	15.633 (b, c)	13.289 (c, d)	11.526 (d, c)	9.944 (c)
Nb.f/dF	13.605 (a)	12.729 (b)	10.933 (c)	11.973 (b)	9.763 (d)	9.777 (d)
Nb.B.Iaire	3.368 (b)	2.648 (a, b)	1.833 (b)	2.605 (a, b)	2.447 (a, b)	2.388 (b)
Nb.f/Pl	125.71 (a)	145.000 (a)	93.33 (b)	85.58 (b)	42.87 (c)	54.19 (c)
Nb.BIIaire	1.078 (a)	2.243 (a)	0.266 (b, c)	0.447 (b, c)	0.289 (b, c)	0.083 (c)

Les valeurs marquées avec la même lettre ne sont pas significativement différentes.

Tableau VI. Comparaison des moyennes par le test de Duncan pour les mesures effectuées au troisième mois, des accessions de lentille.

	Accessions					
Origine géographique	Nord		Centre		Sud	
Variables	L-33-89	L-26-89	L-30-89	L-17-89	L-07-89	L-12-89
L.T.P	45.711 (a)	34 405 (c)	32.733 (c)	38.197 (b)	26.237 (d)	24 500 (d)
Nb.F/Pl	117.55 (a)	141.86 (a)	86.20 (b)	88.58 (b)	80.03 (b)	75.33 (b)
Nb.f/dF	14.710 (a, b)	14.891 (a, b)	14.1335 (b)	15.052 (a)	11.789 (c)	12.083 (c)
Nb.B.Iaire	9.078 (a)	7.297 (b)	5.566 (c)	7.736 (a, b)	6710 (b, c)	7.027 (b, c)
Nb.f/Pl	7.763 (b)	11.811 (a)	8.367 (b)	6.026 (b, c)	4.658 (c)	3.733 (c)
Nb.B.IIIaire	0.894 (b)	2.513 (a)	0.566 (b)	1.076 (b)	0.394 (b)	0.583 (b)

Les valeurs marquées avec la même lettre ne sont pas significativement différentes.

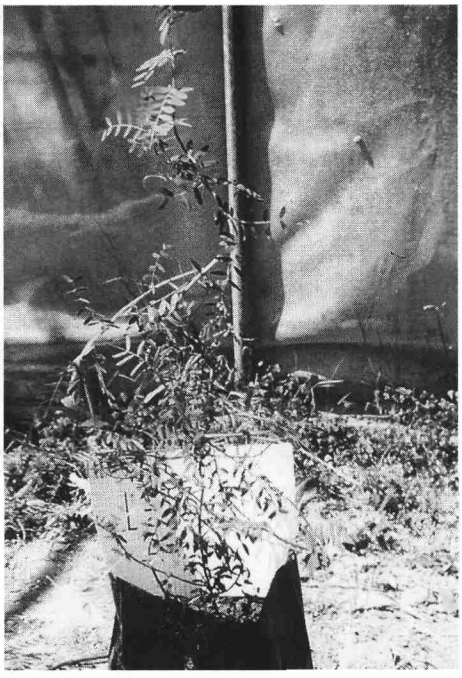


Figure 2. Port spiralé.

Figure 3. Port prostré.

Indice de proximité

La représentation schématique des indices de proximité est traduite sous forme de dendrogramme. Pour les mesures effectuées au premier mois (Figure 4), nous constatons qu'au seuil de 39 % de ressemblance, les accessions du Nord, du Centre et du Sud se ressemblent et forment un seul groupe. A un niveau plus élevé de proximité et au seuil de 50 % de ressemblance, deux groupes s'individualisent :

– l'un est formé par les accessions du Sud et une accession du Centre (L-17-89),
– l'autre groupe englobe les accessions du Nord et la L-30-89 du Centre.

Au niveau de proximité légèrement supérieur à 75 %, quatre groupes sont formés :

– un premier groupe très homogène constitué de L-07-89 et L-12-89,
– un deuxième groupe comprenant une accession du Nord (L-26-89) et une accession du Centre (L-30-89),
– les accessions L-33-89 et L-17-89 forment respectivement le troisième et le quatrième groupe.

Le dendrogramme construit à partir des données mesurées au deuxième mois est représenté dans la Figure 5. Au seuil de 46 %, les lentilles tunisiennes se ressemblent. Ainsi les accessions des différentes régions géographiques forment un seul groupe. A un seuil de 50 % de ressemblance, il y a divergence totale entre les accessions du Nord et celles du Centre et du Sud qui restent jointives en formant un groupe à part.

A un seuil supérieur à 76 %, les accessions du Sud et du Centre se scindent pour former deux groupes séparés. Les accessions du Nord forment chacune un groupe à part. Nous remarquons que les caractères étudiés présentent une homogénéité pour les accessions à issue très proche. L'hétérogénéité des accessions du Nord peut s'expliquer par l'influence humaine. En effet, ces accessions ont fait l'objet d'un programme de sélection et d'amélioration intensif en se basant sur des caractères morphologiques et culinaires différents et à bénéfice commercial important.

Pour le troisième mois (Figure 6), au seuil de 53 % de ressemblance, toutes les accessions se ressemblent. A un indice de proximité de 60 %, les accessions du Sud forment un groupe homogène. A 63 % de ressemblance, les accessions L-26-89 et L-30-89 forment un premier groupe. Un deuxième groupe est constitué par les accessions L-33-89 et L-17-89. Au-delà de 63 % de ressemblance, les accessions L-26-89 et L-30-89 se dissocient entre elles. La L-33-89 et la L-17-89 ne se détachent l'une de l'autre qu'à un indice de proximité supérieur à 81 %.

Pour le dendrogramme englobant les différents caractères étudiés à différents stades de développement végétatif (Figure 7), les accessions d'origine géographique proche montrent une certaine analogie morphologique à des indices de proximité différents. Ainsi à un indice de proximité de 50 %, toutes les accessions forment un seul groupe.

A 65 % de ressemblance, nous remarquons deux groupes :

– un groupe avec les accessions du Sud (L-07-89 et L-12-89),
– un deuxième groupe rassemblant les accessions du Centre et du Nord (L-17-89, L-30-89 et L-26-89, L-33-89).

A 70 % de ressemblance trois groupes sont constitués selon les régions géographiques :

– un groupe du Sud (L-07-89 et L-12-89),
– un groupe du Centre (L-17-89 et L-30-89),
– un groupe du Nord (L-26-89 et L-33-89).

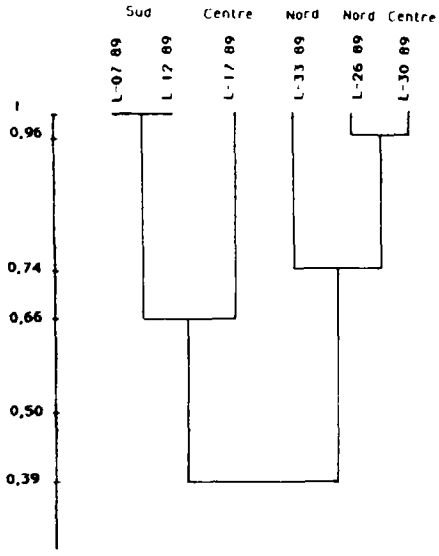


Figure 4. Dendrogramme de proximité construit à partir des caractères morphologiques mesurés au stade 1 mois.

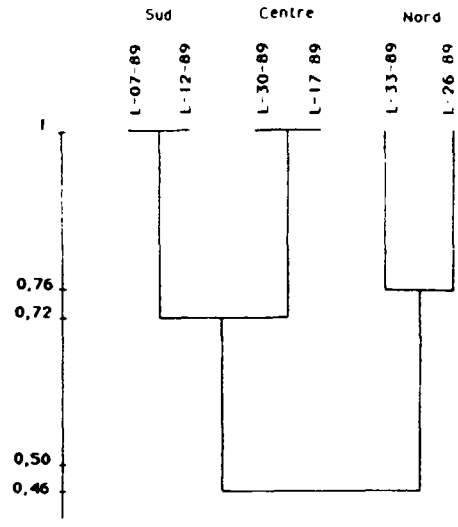


Figure 5. Dendrogramme de proximité construit à partir des caractères morphologiques mesurés au stade 2 mois.

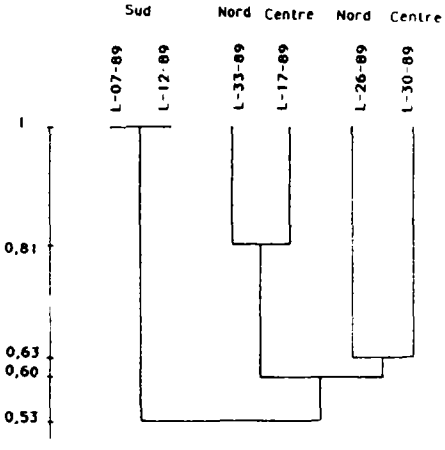


Figure 6. Dendrogramme de proximité construit à partir des caractères morphologiques mesurés au stade 3 mois.

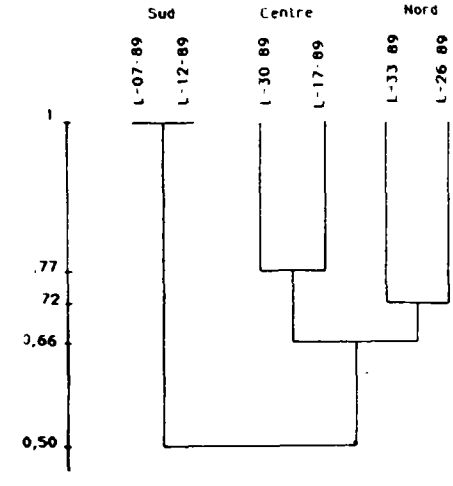


Figure 7. Dendrogramme de proximité basé sur la totalité des caractères morphologiques durant les trois premiers mois du développement végétatif.

Par conséquent, nous remarquons qu'aux différents stades étudiés, les accessions du Sud manifestent une ressemblance très nette pour les caractères étudiés. Ce qui laisse supposer que celles-ci dérivent d'une même variété ayant été disséminée dans les régions du Sud tunisien. En outre, ces deux accessions échappent à la forte contrainte de sélection et d'amélioration, ce qui laisserait leur patrimoine génétique uniforme et sans modification.

Autres caractéristiques

Durant le développement végétatif, les plantules des accessions du Sud sont assez petites avec des feuilles qui se terminent par des vrilles. En outre, elles présentent une forte pigmentation et elles sont dépourvues de branches. L'accession L-33-89 du Nord se caractérise par la dominance totale de la hauteur de la tige principale. Ses feuilles jeunes se terminent aussi par des vrilles. Quant à l'accession L-26-89, elle se caractérise par un grand nombre de branches primaires et secondaires.

Les accessions du Centre présentent une pigmentation qui finit par disparaître au stade fructification. Les accessions étudiées présentent une différence significative pour la longueur des entre-nœuds. Cette dernière est faible chez les accessions du Sud, et très élevée chez l'accession L-33-89. Cependant, elle est presque la même entre les accessions du Centre et la L-26-89.

Les données des autres paramètres mesurés sont mentionnées dans le Tableau VII.

Tableau VII. Données des autres paramètres mesurés.

Accessions	Ip.50 %	Nb.fl/pd.	Cl.fl.	Poids.100 grains
L-33-89	14 jours	1 à 5	bleu violacé	4,859 g
L-26-89	12 jours	1 à 4	bleu violacé	7,153 g
L-30-89	25 jours	1 à 4	blanche	6,713 g
L-17-89	23 jours	1 à 4	blanche	6,650 g
L-07-89	5 jours	1 à 3	bleu violacé	1,895 g
L-12-89	7 jours	1 à 4	bleu violacé	2,168 g

Nous constatons que les accessions du Sud présentent un indice de précocité de la floraison de 5 et 7 jours respectivement pour L-07-89 et L-12-89, alors que les accessions du Nord ne fleurissent qu'au bout de 14 jours pour la L-33-89 et 12 jours pour la L-26-89. Les accessions du Centre se caractérisent par un indice de précocité assez long.

En ce qui concerne la couleur des fleurs, nous avons noté que les accessions du Centre se distinguent par des fleurs blanches de celles du Nord et du Sud qui présentent des fleurs bleu-violacé. Le nombre de fleurs par pédoncule paraît semblable entre les accessions étudiées.

Les accessions du Sud présentent un poids de 100 graines relativement faible compte tenu de la petite taille de leurs graines. Ces accessions sont qualifiées de « Microsperma ». Les accessions du Centre et du Nord sont caractérisées par des graines plus grandes et sont dites « Macrosperma ».

Discussion, conclusion

Bien que le phénotype ne puisse pas expliquer des phénomènes aussi complexes, il nous a permis de dégager un ensemble de caractéristiques présentes chez certaines variétés et absentes chez d'autres et par conséquent une variabilité entre les accessions étudiées. Cette variabilité est bien décelable durant les premiers mois de développement végétatif. En effet, plus on avance dans ce développement, plus les accessions étudiées se ressemblent entre elles (39 %, 46 % et 53 % de ressemblance respectivement après 1, 2 et 3 mois de développement).

Ainsi nous avons déterminé l'aspect prostré chez les accessions du Sud, l'aspect spiralé chez une variété du Nord (L-33-89) et l'aspect érigé chez les variétés du Centre. Aussi nous avons remarqué la grande taille de la tige principale des accessions du Nord et du Centre, en revanche une petite taille a été observée chez les accessions du Sud.

De même la dimension des graines a été trouvée de l'ordre de 3 à 6 mm chez les accessions du Sud, alors qu'elle est de 6 à 9 mm chez celles du Centre et du Nord. Cela montre la relation étroite entre la dimension des graines et la vigueur de la plante comme cela a été rapporté par [1, 13, 15].

Les variétés à graines larges présentent un retard dans la floraison et leur nombre de gousses et de graines reste assez limité. Cela laisse supposer que la coïncidence des périodes critiques de ces plantes (floraison et maturité) avec les températures relativement élevées du mois de mars et d'avril entraîne une chute accrue de fleurs et de gousses avant remplissage. Une telle constatation a été rapportée par [2, 11, 12].

L'indice de floraison de 50 % de la population est faible chez les variétés du Sud, moyen chez celles du Nord et assez élevé chez les accessions du Centre.

Ces critères morphologiques étudiés ont montré une diversité entre les accessions qui ont tendance à se regrouper selon leurs origines géographiques, surtout pour les accessions du Sud qui manifestent une ressemblance très nette. Ce qui suppose probablement que la L-07-89 et la L-12-89 proviennent d'une même variété ayant été disséminée dans les régions du Sud tunisien.

Références

1. Agrawal PK (1982). The effect of seed size on germination vigor and field emergence of lentil. *Lens* 9 : 28-29.
2. Ahlawat IPS, Singh A, Sarah C (1982). Yield of lentil cultivar as affected by date and rate of seeding under late sown condition. *Indian J Agronomy* 27 : 257-262.
3. Bhatty RS (1988). Composition and quality of lentil *(Lens culinaris Medik). Can Inst Food Sci Technol J* 21 (2) : 144-160.
4. Dagnelie P (1965). A propos de quelques méthodes de comparaison multiple de moyennes. *Biom Pracsim* 6 : 115-124.
5. Dagnelie P (1975). *Théories et méthodes statistiques.* Vol. 2. Presse Agronomique de Gembloux : 463 p.
6. Hussaini SH, Goodman MM, Timothy DH (1977). Multivariante analysis and the geographical distribution of the world collection of finger millet. *Crop Sci* 17 : 157-163.
7. Islam R (1981). Improved nitrogen fixation. In : Weeb C, Hawtin C, eds. *Lentils.* Commonwealth Agriculture Bureaux : 155-161.
8. Morishima H, Oka HI (1961). The pattern of inter-specific variation in the genus oryza : its quantitative representation by statistical methods. *Evolution* 14 : 153-165.

9. Pernes J (1972). Organisation évolutive d'un groupe préférentiellement agamique : la section des maximae du genre Panicum (Graminées). Thèse de Doctorat d'État. Univ. Paris-Sud. Centre d'Orsay.
10. Saxena MC, Hawtin GC (1981). Morphological growth patterns. In : Weeb C, Hawtin C, eds *Lentils*. Commonwealth Agricultural Bureaux : 93-52.
11. Sharma SK, Sharma B (1982). Induced early mutants in large seeded lentil. *Indian J Agricult Res* 16(2) : 79-82.
12. Shrivastava GP (1979). Effect of dates of sowing and raw spacing on the performance of lentil varieties. *Indian J Agronomy* 24 (4) : 458-459.
13. Solh M (1980). Classification of large and small seeded lentils by seed weight. *Lens* 7 : 23.
14. Somayajulo PLN, Joshi AB, Murty BR (1970). Genetic divergence in wheat. *Indian J Genet Plant Breed* 30 : 47-58.
15. Waldia RS, Singh VP, Kharb RPS (1988). Stability of seed yield of some lentil genotypes in relation to seed weight. *Lens News Letter* 15 (1) : 17-19.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1995, pp. 79-85.

8

Le caroubier en Tunisie : situation et perspectives d'amélioration

MOHAMED NEJIB REJEB

Centre de Recherches du Génie Rural, BP 10, Ariana, Tunisie.

Le matériel végétal utilisé est le caroubier *Ceratonia siliqua* L. C'est un arbre de la famille des légumineuses, de la sous-famille des Césalpinées. Il peut atteindre une quinzaine de mètres de hauteur, à cime très étalée et se rencontre essentiellement dans les régions de basse altitude. Son tronc à la base peut avoir 2 mètres de circonférence et sa longévité est considérable (jusqu'à 200 ans).

Répartition biogéographique

Le caroubier est un arbre typiquement méditerranéen (Figure 1). Les plantations artificielles dépassent souvent l'aire de répartition naturelle. Il a été largement diffusé par les Arabes et les Berbères dans la péninsule ibérique. On le rencontre actuellement en allant de l'Espagne et du Portugal jusqu'en Turquie, en Syrie, en Yougoslavie en passant par le Maroc, l'Algérie, la Tunisie, la Libye, l'Égypte, la Grèce, la Crète, Chypre, l'Italie et la France (Figure 1). Le caroubier a été introduit aussi avec succès dans plusieurs autres pays ayant des régions à climat méditerranéen. On peut citer l'Australie, l'Afrique du Sud, les États-Unis (Arizona, Californie du Sud), les Philippines et l'Iran [2].

En Tunisie (Figure 2), le Caroubier croît dans les conditions naturelles à l'état sauvage en association avec l'olivier et le lentisque. Il est bien défini dans les étages humide, sub-humide, et semi-aride supérieur, à variante chaude à tempérée [8]. On le rencontre aussi en mélange avec *Callitris articulata* au niveau des pentes, et avec des

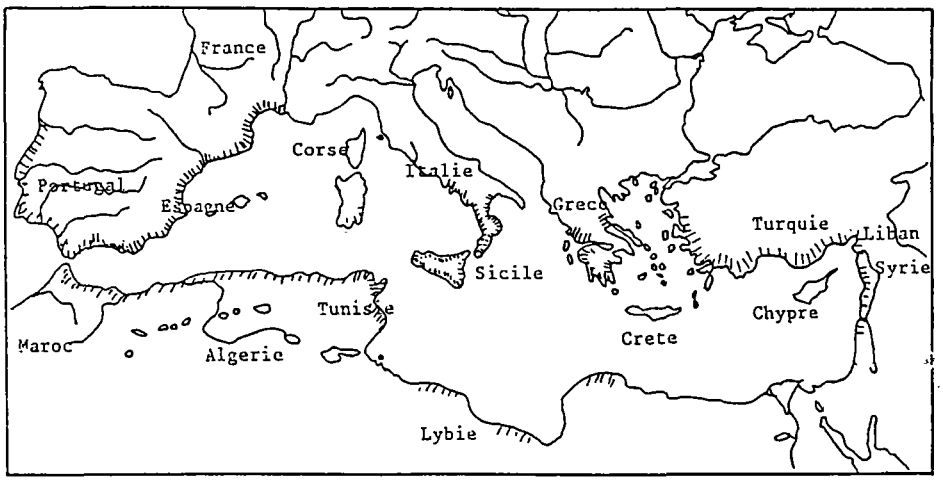


Figure 1. Répartition du Caroubier en Méditerrannée.

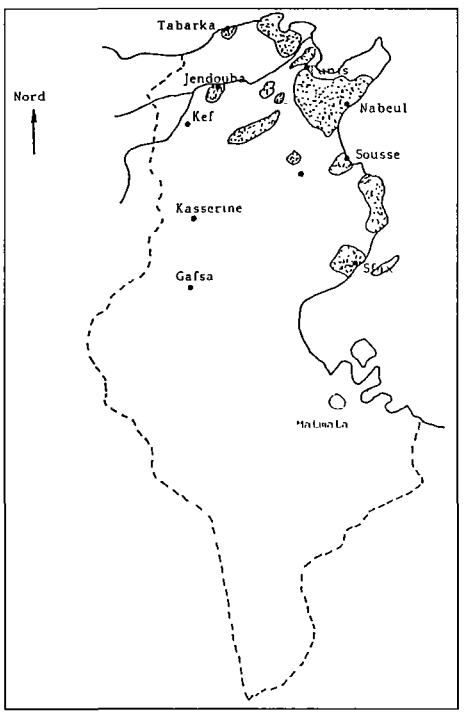


Figure 2. Répartition du Caroubier en Tunisie

espèces humicoles et sciaphiles au fond des vallées. La forêt naturelle est presque entièrement défrichée et transformée en cultures annuelles, parcours, vignobles et plantations d'oliviers. Il est de plus en plus difficile de retrouver la végétation forestière d'origine.

La culture du caroubier en Tunisie ne présente actuellement que peu d'importance. On le rencontre souvent le long des côtes de Tabarka à Matmata, là où la pluviosité dépasse 200 mm et où les hivers ne sont pas froids. Son aire de répartition correspond au bioclimat de type méditerranéen avec un été sec soumis à l'humidité atmosphérique apportée par la mer. Les gelées sont rares ou inexistantes.

Le caroubier s'adapte à plusieurs types de sols à l'exception des sols hydromorphes et salés et sur les croûtes schisteuses. On le rencontre sur sols marneux, sur sols pauvres superficiels et rocailleux calcaires, sur des pentes rocheuses, des escarpements peu accessibles et des collines incultes. On l'a retrouvé au nord du Djebel Abderrahman sur des sols marneux. Il peut monter jusqu'à 950 mètres près de Djebel Serj [6]. Au sud du Djebel Abderrahman, on l'a rencontré sur des sols à croûtes calcaires, sur des calcaires marneux, des grès, du sable limoneux dans les régions de Zaghouan, Enfidha, Saouaf et la plaine de Kairouan.

Biologie de *Ceratonia siliqua*

Les feuilles du caroubier sont composées, persistantes, vertes, luisantes sur la face dorsale, plus claires et mates sur la face ventale, à folioles ovales entières légèrement échancrées au sommet, paripennées. La feuille est composée de 4 à 10 folioles glabres.

Floraison

L'arbre est dioïque, parfois hermaphrodite. Les pieds mâles sont stériles et improductifs. Cet aspect a été bien étudié par Schrœder [10] sur 59 clones méditerranéens introduits en Californie.

La floraison apparaît en hiver, sur le vieux bois. Les fleurs verdâtres sont petites et réunies en grand nombre pour former des grappes droites et axillaires plus courtes que la feuille à l'aisselle desquelles elles se sont développées. La corolle est absente. Il y a 5 étamines. Les grains de pollen peuvent germer facilement selon Sfakiotakis [11].

Le développement du fruit est très long. Pour arriver à maturité (été), il met généralement entre 9 et 10 mois. Il est de grande taille : de 10 à 20 cm de longueur, et de 2 à 3 cm de largeur. Il est vert puis brun, et, au moment de la maturité, brun foncé à noir. Il est sinueux sur les bords, aplati et présente un tissu pulpeux, sucré, rafraîchissant, et renferme de 12 à 16 graines brunes. La gousse est séparée à l'intérieur par des cloisons pulpeuses. Les graines ou carats ont servi aux joailliers pendant longtemps d'unité de poids pour peser les diamants, les perles et les pierres précieuses : (1 carat = 205,3 mg). Jusqu'à présent le poids des diamants est désigné en « carats ». La valeur du fruit réside dans sa richesse en sucre. L'âge d'une première fructification normale d'un caroubier de semis est de 10 ans. Le fruit récolté attend la complète dessiccation avant le stockage. Le rendement est variable selon les provenances, les bioclimats, les substrats et l'âge des arbres. Le rendement moyen est de 50 q / ha et de 200 à 300 kg par arbre adulte ; ce rendement important se maintient jusqu'à l'âge de 100 ans. Les pays les plus gros producteurs de caroubiers sont Chypre et l'Espagne. La production

du caroubier est bisannuelle. Cependant, dans les plantations bien conduites, on peut avoir une régularité dans la production et un rendement annuel satisfaisant.

Les utilisations du caroubier

Le caroubier peut être cultivé en arbre isolé comme arbre ornemental, pour son ombrage, en alignement, comme arbre d'allée (Menzel Bourguiba, Californie) et en verger comme plantation homogène de production (Espagne, Portugal, Crète).

Selon Lavallée [3], son bois est rarement sain sur une grande longueur et craint l'humidité. Le bois jeune est blanc jaunâtre et rouge foncé quand il est utilisé en ébénisterie et surtout comme bois de chauffe.

Le caroubier est beaucoup utilisé en alimentation humaine et animale. Les fruits entrent dans la composition de plusieurs menus et pâtisseries et sont aussi consommés crus. L'arbre a une valeur fourragère comparable à celle de l'orge (1 UF/kg de matière sèche) et peut contribuer à l'amélioration des ressources pastorales du pays. La valeur fourragère, citée par Lepoutre, Schoenenberger [4] et Putod [7], est, pour les feuilles, de 0,29 UF/kg de matière sèche, et, pour les gousses, de 1,15 UF/kg de matière sèche. Les gousses séchées, entières ou découpées, sont mélangées à du concentré et données aux chevaux, aux bovins, ovins, aux porcs et aux volailles.

La farine du fruit est utilisée en pharmacopée contre les troubles gastro-intestinaux (diarrhée des nourrissons). La pulpe est recommandée contre la tuberculose pulmonaire et les affections des bronches. L'écorce est réputée astringente. Les utilisations industrielles sont aussi nombreuses. Une bonne partie de la récolte est distillée pour la fabrication d'alcool à raison de 20 à 25 l d'alcool par 100 kg de pulpe [2].

La richesse du fruit en sucres peut permettre selon Baumgartner *et al* [1] de détecter l'addition de farine de caroubier au cacao dont l'utilisation commerciale est importante.

La graine contient des gommes qui ont de nombreuses utilisations. Selon Coit [13], une tonne de caroube chypriote donne 20 kg de gommes utilisées en imprimerie, photographie, matière plastique, encre, cirage, cosmétique et surtout en industrie alimentaire (sauce, mayonnaise, glace...). Selon Tichor [12], le taux de gomme par graine varie selon les pays et les provenances, il est de 30 % à Chypre et de 50 % en Grèce. En Tunisie, Égypte et certains autres pays méditerranéens, on extrait des fruits de caroubier un sirop et on fabrique des boissons désaltérantes très appréciées. L'écorce a été longtemps utilisée en tannerie.

Culture

Le caroubier peut se multiplier par semis, par bouture ou par greffe. La technique la plus utilisée est la multiplication par semis. Le bouturage est moins utilisé parce qu'il demande beaucoup plus de soins ; il a été pratiqué surtout par les Italiens. La greffe est employée à la suite des semis pour surgreffer les pieds mâles par les femelles. L'espacement entre les arbres diffère d'une région à une autre selon la nature du terrain et selon la disponibilité en eau. Il y a des plantations de 10 m sur 10 m (100 pieds à l'hectare), de 12 m sur 12 m (70 pieds à l'hectare), de 15 m sur 15 m (44 pieds à l'hectare). En Californie, la densité est encore plus faible (20 pieds à l'hectare). A Chypre, ils sont plantés à 20 m (25 arbres à l'hectare).

Physiologie de la sécheresse du caroubier

Sur le plan anatomique et morphologique, les feuilles de caroubier sont composées et recouvertes par une couche lisse et épaisse de cire. Elles sont hypostomatées et la densité stomatique est de 217 stomates au mm^2, de 17,5 µ de longueur. Ce nombre élevé de stomates constitue un caractère de xéromorphie [5].

Le caroubier retarde la déshydratation en améliorant l'absorption par des adaptations morphologiques et physiologiques.

Si la sécheresse estivale n'est pas très importante, les adaptations morphologiques mises en place par la plante pour améliorer l'absorption de l'eau suffisent pour passer le cap de l'été. Les stomates demeurent ouverts, le système racinaire est très développé et permet un approvisionnement permanent en eau, les surfaces de contact des feuilles sont réduites par de légers mouvements d'enroulement des feuilles ; un dépôt de cire important réduit les pertes en eau. Cette stratégie adaptative est suffisante pour supporter la sécheresse estivale dans les bioclimats subhumide et semi-aride supérieur.

Si la déshydratation est prononcée, les stratégies décrites plus haut ne suffisent plus, la plante va mettre au point des adaptations physiologiques. Les stomates qui étaient jusque-là ouverts vont commencer à se fermer pour limiter la déshydratation des tissus. Ces mouvements stomatiques résultent de la différence de potentiel de turgescence entre les cellules stomatiques de garde et les cellules compagnes. Cette stratégie est nécessaire pour les espèces des bioclimats arides [9].

L'application d'un deuxième cycle de sécheresse a provoqué une fermeture stomatique moins importante que celle enregistrée au premier cycle de déshydratation. Après arrosage, nous avons obtenu un sucroît d'ouverture stomatique. Ces faits peuvent traduire une bonne récupération et un endurcissement des feuilles.

La récupération d'un certain nombre de processus foliaires, tels que l'activité photosynthétique et la conductance stomatique, indique que malgré la sévérité du stress, un certain nombre de dispositifs foliaires ont préservé leur intégrité structurale et fonctionnelle, en d'autres termes, que le caroubier est apte à manifester, lorsque les conditions le permettent, un certain degré d'endurcissement à la sécheresse.

Les valeurs de potentiel osmotique à turgescence nulle des différents caroubiers tunisiens sont comprises entre -2,4 et -2,7 MPa [9]. Ces valeurs sont inférieures à celles trouvées par d'autres auteurs sur des caroubiers portugais et italiens, ce qui peut se traduire par le maintien d'une turgescence élevée des feuilles des caroubiers tunisiens, d'un appel d'eau plus fort, donc d'une alimentation hydrique plus poussée et d'une meilleure adaptation à la sécheresse. Le contenu relatif en eau à turgescence nulle est élevé pour toutes les provenances étudiées ; la turgescence s'annule quand le contenu relatif en eau est encore voisin de 90 % pour les témoins, et 87 % pour les plantes déshydratées. Ces résultats supposent une bonne alimentation en eau du caroubier et nous orientent vers une stratégie préférentielle d'évitement de la sécheresse *(Water spenders).*

Conclusions

Le caroubier est une espèce agro-sylvo-pastorale. Les facteurs anthropiques contribuent largement à son élimination du paysage floristique tunisien. Dans les conditions naturelles, on le rencontre à l'état sauvage en association avec l'olivier et le lentisque, et en mélange, avec le Callitris, mais le défrichement de ces associations, à la faveur des

cultures vivrières et des arbres fruitiers, rend cette végétation de plus en plus rare en Tunisie. Les utilisations de cette essence sont pourtant nombreuses et sa valeur fourragère peut contribuer à l'amélioration des potentialités pastorales du pays. L'importance économique des fruits est incontestable et explique la culture en irriguée du caroubier au Portugal, en Espagne et en Crète.

Le caroubier se comporte comme une véritable espèce résistante à la sécheresse en s'adaptant morphologiquement et physiologiquement au manque d'eau.

Les principales adaptations peuvent se résumer comme suit :
- les stomates sont situés sur une seule face,
- le nombre de stomates est assez élevé et ils sont de petites tailles,
- le système racinaire est développé,
- un dépôt de cire important,
- les mouvements stomatiques sont très sensibles au VPD,
- l'assimilation et les échanges gazeux dépendent de l'état hydrique général.

Au terme de cette étude, plusieurs questions restent posées :
- l'étude du système racinaire,
- l'évaluation des réservoirs hydriques du bois,
- les mouvements d'osmorégulation se sont avérés absents au niveau foliaire, et il est souhaitable de vérifier ce résultat au niveau racinaire.

Références

1. Baumgartner S, Genner-Ritzman R, Haas J, Amado R, Neukom H (1986). Isolation and identification of cyclitols in Carob pods *(Ceratonia siliqua L). J Agr Food Chem* 34, 5 : 827-829.
2. Evreinoff VA (1947). Agriculture tropicale Le Caroubier ou *Ceratonia siliqua L. Rev Bot Appl :* 389-401.
3. Lavallée P (1962). Le Caroubier, son utilisation dans l'alimentation du bétail en Algérie et en Tunisie. Alger, 47 p.
4. Lepoutre B, Schoenenberger A (1978). *Guide pratique de forestier au Maroc.* Ch II, 102 p.
5. Ludlow MM (1980). Adaptative signifiance of stomatal reponses to water stress. In : Turner NC, Kramer PJ, eds. *Adaptation of plants to water and high temperature stress.* Inter Science NY : 123-138.
6. Nabli A (1989). Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie tunisienne. I. Éléments de botanique et de phyto-écologie. *MAB-FST-Laboratoire de botanique fondamentale et appliquée.* 70 pl., 247 p.
7. Putod R (1982). Les arbres fourragers. *Forêt méditerranéenne,* IV, 1 : 33-36.
8. Rejeb MN (1989). Mécanismes physiologiques d'adaptation à la sécheresse du Caroubier. *Rev Res Amélior Prod Milieu Aride* 1 : 47-55.
9. Rejeb MN (1992). Étude des mécanismes de résistance à la sécheresse du Caroubier *(Ceratonia siliqua L.)* en Tunisie. Thèse Doc. d'État. Fac. des Sciences de Tunis, 199 p.
10. Schroeder CA (1959). The floral situation of the Carob in California. *Proc Am Soc Hort Sci* 74 : 248-251.
11. Sfakiotakis EM (1978). Germination *in vitro* of Carob *(Ceratonia siliqua L.)* pollen. *Z Pflanzenphysiol* 89 : 443-447.
12. Tichor RJ (1958). Report to the governement of Cyprus on Carob production. Rome FAO. 58/10/7910.
13. Coit (1967).

Contrainte hydrique progressive et prolongée
(Arrêt d'arrosage)

Tolérance particulière des provenances du sub-humide et du semi–aride

Application d'un 2e cycle de sécheresse

Un endurcissement des feuilles de caroubier

Y_0 et RWC peu différents entre témoins et contraints
Les mouvements de synthèse et d'hydrolyse des sucres faibles

Absence d'osmorégulation

Le bois du tronc et des branches

Peuvent constituer des réservoirs d'eau

Contribuent au maintien d'un RWC élevé

Les provenances du sub-humide et semi-aride retardent la déshydratation en l'évitant et en améliorant l'absorption d'eau

***Contrainte sévère* (aride)**

Stratégie basée sur l'économie de l'eau

Les plantes se comportent comme de véritables résistantes à la sécheresse en s'adaptant morphologiquement et physiologiquement au manque d'eau

Les différentes catégories d'adaptation ne sont pas exclusives

Stress

Caroubier peut se comporter de plusieurs manières

Stratégie d'esquive	Stratégie de gaspillage	Régulation osmotique	Tolérance protoplasmique
	Water spenders	*Water savers*	*Water tolerance*
Perte des vieilles feuilles	Système racinaire très développé		

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 87-95.

9

L'artichaut (*Cynara scolymus* L.) : plante récalcitrante

M. E. KCHOUK [1], M. V. GONZALEZ [2], A. MLIKI [1], A. CHATIBI [1],
R. TAVAZZA [2], G. ANCORA [2], A. GHORBEL [1]

1. INRST, Laboratoire de culture in vitro, *BP 95, 2050 Hammam-Lif, Tunisie.*
2. ENEA, Dipartimento Ricerca e Sviluppo Agroindustriale, Divisione Ingegneria Genetica, CP 2400 Roma AD, Italie.

Résumé

L'artichaut (Cynara scolymus *L.) est une plante à multiplication végétative pour laquelle la culture* in vitro *d'apex méristématiques a ouvert de nouveaux horizons. En effet, aujourd'hui il est devenu possible de multiplier rapidement un génotype intéressant et donner ainsi naissance à un cultivar homogène. Il est également devenu possible d'obtenir par cette technique des plants sains indemnes de virus. Toutefois, dans le cas du virus latent de l'artichaut (ALV :* artichoke latent virus*) et très probablement de tous les types de virus de l'artichaut, l'assainissement par vitrothérapie n'est que relatif et ne va pas au-delà de la deuxième année de culture. En outre, la culture* in vitro *s'accompagne d'une perte de conformité variétale plus ou moins marquée selon les zones de culture. Il est donc devenu impératif de trouver une voie d'amélioration génétique ponctuelle, en mesure de conférer la résistance génétique aux virus sans altération aucune de la variété, d'où le recours à la transformation génétique.*

Le système Agrobacterium tumefaciens *est utilisé pour essayer de transférer un matériel génétique défini. Plusieurs souches bactériennes sont employées en fonction de leur virulence.*

De plus, nous nous sommes également intéressés au procédé de bombardement de microprojectiles pour la transformation directe d'explants d'artichaut. Les résultats semblent indiquer que l'artichaut, dans le contexte de la transformation génétique, pourrait être placé dans le groupe des plantes récalcitrantes.

La multiplication végétative de plants d'artichaut par culture *in vitro* de méristèmes a permis l'obtention de plants sains [1, 2, 4, 5] qui eut pour conséquence une augmentation de la production. Toutefois, outre la recontamination virale observée dès la seconde année de culture, on remarque une détérioration plus ou moins marquée des caractéristiques variétales telles que la précocité ou la forme du fruit [4, 13]. La recherche d'une résistance génétique par voie sexuée se heurte, quant à elle, à diverses difficultés liées à la biologie florale de l'espèce [3] et aux inconvénients de la sélection classique. En revanche, la transformation génétique semble être *a priori* une voie assez efficace pour répondre aussi bien aux facteurs de résistances virales qu'à ceux de la production. En effet, il est aujourd'hui établi que la présence de la protéine capsidiale de certains virus chez les plantes leur procurerait une résistance plus ou moins spécifique au virus en question, ou même à une gamme de virus [11]. Ainsi, afin de résoudre certains problèmes phytosanitaires de l'artichaut, Tavazza *et al.* [15] ont séquencé le gène de la protéine capsidiale de l'AMCV *(artichoke mottled crinkle virus).* Parallèlement, Ordas *et al.* [12] ont mis au point une technique de régénération de plants d'artichaut cv. Romanesco à partir de bractées. Il en a été de même pour le cultivar Violet d'Hyères [7].

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés aux possibilités de transformation génétique de divers explants d'artichaut par biolistique et par agroinfection, en utilisant diverses souches d'*Agrobacterium tumefaciens* comportant divers plasmides.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

• ***Cultivars***

Les divers explants appartiennent à trois cultivars et deux clones, à savoir : cv. Romanesco (CR), cv. Violet d'Hyères (VH), cv. Violet de Provence (VP), clone Fb13A et clone C3. Le clone Fb13A est issu du cv. Romanesco par culture de bractées alors que le clone C3 provient d'une sélection classique dans le même cultivar.

• ***Explants***

Mis à part les **bractées,** qui sont collectées au champ le jour même de leur mise en culture, tous les explants utilisés proviennent de matériel néoformé *in vitro* à partir de bractées et entretenu en chambre de culture.

– **Les bractées et cals morphogénétiques :** ce sont les seuls explants qui possèdent des potentialités régénératrices. Toutes les étapes de culture *in vitro* des **bractées** sont celles décrites par Ordas *et al.* [12].

– **Les « disques » :** nous avons donné cette appellation à un explant en forme d'anneau obtenu après une coupe transversale à la base d'une plante *in vitro.* Le disque possède une épaisseur de 3 à 4 mm et représente un entassement d'entre-nœuds au niveau desquels se trouvent les **méristèmes** axillaires. C'est souvent le point de départ d'une micropropagation. Chaque disque est cultivé sur B5/N2 ou N5/B2 (Tableau I), pour donner 3 ou 4 plantes.

– **Les feuilles jeunes :** elles sont prélevées sur les jeunes plantes issues des « disques » précédemment décrits. A leur base se trouvent souvent quelques **méris-**

tèmes axillaires que l'on préserve lorsqu'on détache soigneusement la feuille de la tige. Les tissus avoisinant ces méristèmes constituent souvent le point de départ de nouveaux cals non morphogénétiques.

Tableau I. Composition des milieux de culture

Milieu de culture	**B5/N2**	**N5/B2**	**A-0,5/B-0,5**
	mg. l^{-1}	mg. l^{-1}	mg. l^{-1}
Sels minéraux et vitamines	MS	MS	MS
AIB	–	–	0,5-
ANA	2,0	5,0	
BAP	5,0	2,0	0,5
Saccharose	30 000	30 000	20 000
Agar	8 000	8 000	8 000
pH	5.8	5.8	5.8

MS : Murashige et Skoog basal medium (SIGMA, M 5519). **AIB** = Acide 4-(3-indolyl)-butyrique; **ANA** = Acide 4-naphtyl-acétique; **BAP** = 6-benzyl-amino-purine.

Milieux de culture *in vitro*

Les milieux de culture utilisés sont ceux décrits par Ordas *et al.* [12] (Tableau I). Les bractées, disques et feuilles jeunes sont cultivés indifféremment sur B5/N2 ou N5/B2 jusqu'au développement de nouvelles plantes. Celles-ci sont alors repiquées sur milieu A-0,5/B-0,5 (Tableau I). La température de la chambre de culture est de 18 °C et la photopériode est de 16 heures ; une intensité lumineuse de 12 $W.m^{-2}$ est assurée par des tubes fluorescents.

Agro-infection

Nous avons utilisé la souche C58C1 pGV3850 comprenant le vecteur binaire p35GUS-INT [16] portant la résistance à la kanamycine et le gène reporter GUS modifié (intron).

Après culture d'une nuit sur LB [14] à 28 °C et 250 rpm, la suspension bactérienne est centrifugée à 3000 g puis resuspendue dans une solution de coculture correspondant au milieu de culture de l'explant. Le temps de coculture varie de 3 à 14 minutes.

Dans le cas des bractées seulement, et afin de favoriser l'infection, on pratique sur les cals des blessures au scalpel ou au carborandum. Dans ce dernier cas, les cals sont mis dans des tubes de 50 ml (2098 Falcon) contenant une solution de carborandum 10 %, et les blessures sont opérées par agitation au vortex durant 1 à 3 minutes.

Au bout de 2 jours de coculture, on ajoute au milieu de culture de la vancomycine et du céfotaxime, à raison de 200 $mg.ml^{-1}$, afin d'éliminer les bactéries. La sélection d'explants transformés se fait par addition de la kanamycine à raison de 50 $mg.ml^{-1}$.

Biolistique

Le canon à particules utilisé est un PDS-1000/He, BIORAD (Figure 3). La préparation de l'ADN est effectuée selon la méthode décrite par Sambrook *et al.* [14]. L'ADN est précipité selon Klein *et al.* [8] sur des microparticules d'or de diamètres 0.6, 1.0 et 1.6 mm. La concentration finale d'ADN est d'environ 1,7 mg/mg d'or. Les pressions d'Helium utilisées sont : 450, 650, 900, 1300 et 1500 psi (pounds/square inch). La distance entre l'explant et l'écran d'arrêt des microparticules est de 6,9 ou 12 cm.

Deux tailles de plasmides ont été utilisées : le pBI121.1 (18 kb) qui dérive du pBI121 [6] et le pGEM121 (5 kb) qui dérive lui aussi du pBI121 par délétion de la séquence NPTII et transfert de la cassette 35SCaMV-GUS/NOS Ter dans le vecteur pGEM-11Zf(-), sites HindIII et EcoRI.

Test de l'activité β-glucuronidase

Les tests de l'activité β-glucuronidase sont effectués sur les feuilles d'explants d'artichaut ayant manifesté une résistance à la kanamycine (50 $\mu g.ml^{-1}$) durant 2, voire 3 repiquages. Le contrôle se fait sur des feuilles de *Nicotiana tabacum* préalablement transformées par le même vecteur.

Le substrat de l'enzyme (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-glucuronic acid cyclohexylammonium salt, SIGMA) est préparé selon Jefferson *et al.* [6]. Les explants sont mis dans la solution de substrat à 37 °C pendant 24 heures puis progressivement lavés à l'éthanol. Le dernier lavage se fait à l'éthanol 100 %. Pour les essais de biolistique, les spots bleus sont dénombrés sous la loupe.

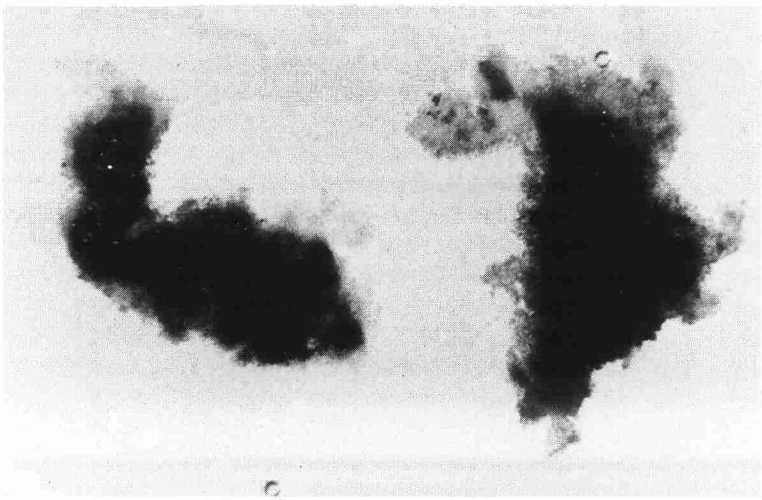


Figure 1. Cals issus de la base des feuilles sur jeunes plants *in vitro* et transformés par agro-infection. La photo montre l'expression de l'activité ß-glucuronidasique du gène GUS (int).

Résultats et discussion

Agro-infection

Il a été jusque-là difficile d'obtenir des plantes transformées. En revanche, nous avons obtenu des cals transformés que nous entretenons depuis maintenant 6 mois (Figure 1). Les cals GUS-positifs (GUS+) ont été obtenus avec les cultivars Romanesco et Violet d'Hyères (Tableau II et III). Pour cela, nous avons constaté que le temps de coculture est de 6 minutes pour les deux cultivars. L'âge de l'explant au moment de la coculture est de 7 jours pour le Romanesco et de 29 jours pour le Violet d'Hyères. Le temps de sélection est de 10 jours après coculture pour Romanesco et de 17 jours pour le Violet d'Hyères.

La concentration idéale de sélection par la kanamycine a été établie séparément durant des essais de toxicité de cet antibiotique en utilisant trois concentrations : 25, 50 et 100 $\mu g.ml^{-1}$. Nous avons constaté qu'à 50 $\mu g.ml^{-1}$ la kanamycine est relativement toxique mais que sa diffusion vers les explants n'est pas régulière. C'est ainsi que, avant de pouvoir conclure sur une éventuelle transformation génétique, il est préférable de prolonger les tests de sélection durant 2 ou 3 repiquages.

A la suite de ces premiers résultats, nous pouvons tirer certaines conclusions très importantes pour la suite de nos travaux :

– le promoteur 35SCaMV fonctionne parfaitement dans les cellules de cals d'artichaut *(Cynara scolymus* L.). Le vecteur binaire p35GUS-int [16] est un bon moyen d'identification des cellules transformées ;

– les cultivars d'artichaut ne répondent pas de la même façon à la coculture avec l'*Agrobacterium tumefaciens.* L'effet génotype a été déjà observé chez la laitue [9] et la pomme de terre [17]. A ce propos, l'état de développement de l'explant pourrait avoir un rôle assez important dans la réaction à l'infection bactérienne ;

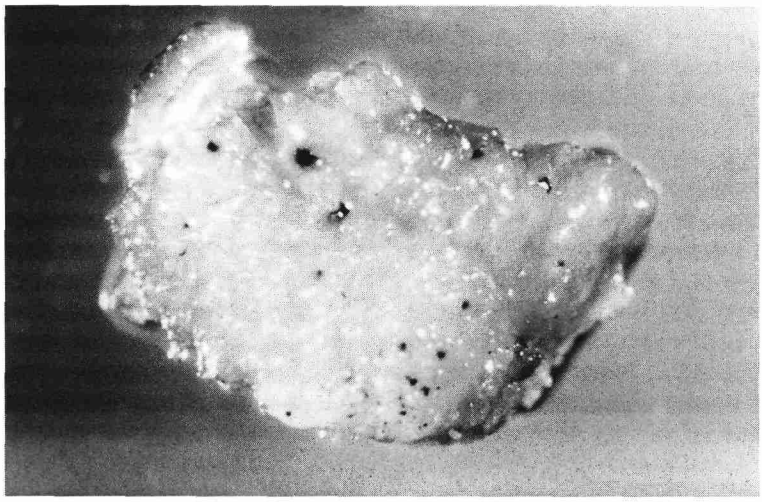


Figure 2. Cal issu de bractée, une semaine après mise en culture. Après bombardement au canon à particules, il est possible de tester l'activité ß-glucuronidasique des cellules. La photo montre quelques cellules de ce type.

Tableau II. Agro-infection sur feuilles jeunes (cv. Romanesco).

Temps de coculture	Age de l'explant (jours)	Sélection Km[1]	Nombre d'explants initial	Activité GUS
3-4	27-28	18-20	163	0
6	**7**	**10**	**11**	**4 cals**[2]
6	14-16	10-12	38	0
6	26	12	34	0
6	35	12	14	0
6	49	10	79	?[3]
10	21	11	72	0
14	13	12	55	0

1 : temps, en jours après coculture, de l'application de kanamycine 50 µg.ml^{-1} dans le milieu. **2 :** cals transformés, entretenus depuis 6 mois. **3 :** tests en cours.

Tableau III. Agro-infection sur feuilles jeunes (cv. Violet d'Hyères).

Temps de coculture	Age de l'explant (jours)	Sélection Km[1]	Nombre d'explants initial	Activité GUS
4	22	12	32	0
6	7	10	30	0
6	21	10	36	?[2]
6	28-**29**	15-**17**	153	**5**[3]
10	20	10	76	0

1 : temps, en jours après coculture, de l'application de kanamycine 50 µg. ml^{-1} dans le milieu. **2 :** tests en cours. **3 :** cals transformés, entretenus depuis 6 mois.

– la kanamycine est efficace à 50 µg.ml^{-1} mais les tests de sélection doivent être prolongés durant deux ou trois repiquages ;

– les délais de sélection par addition de kanamycine pourraient différer également avec le génotype : une semaine pour le Romanesco, 17 jours pour le Violet d'Hyères.

Biolistique

Les expériences de tirs sur des « disques » n'ont rien donné jusqu'à l'heure actuelle (résultats non publiés). Le tir sur des méristèmes s'avère en fait beaucoup plus aléatoire. En revanche, nous avons pu mettre en évidence une expression transitoire du gène GUS en tirant sur des cals organogènes issus de bractées (Figure 2, Tableau IV). Les meilleurs résultats ont été observés avec une pression d'hélium de 650 psi (pounds/square inch), l'explant étant placé à 6 cm de l'écran d'arrêt, support des microparticules d'or enrobées d'ADN, le diamètre de celles-ci étant de 1,6 µm. La taille de

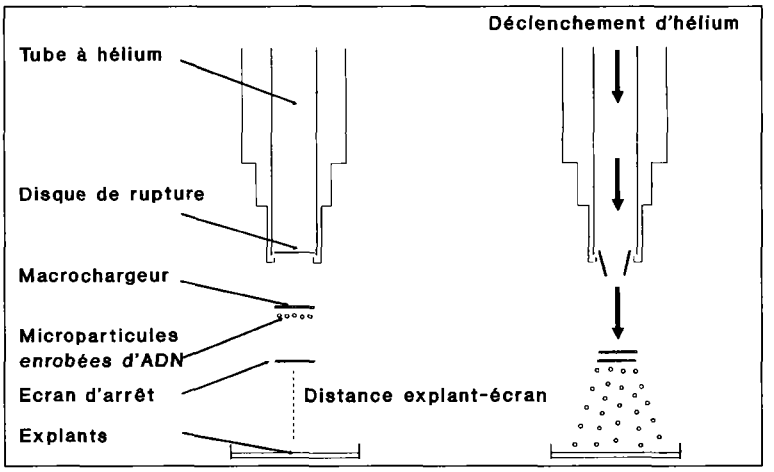


Figure 3. Représentation schématique du PDS-1000/He.

Tableau IV. Biolistique sur bractées (cv. Violet de Provence).

Plasmide	pHe[1] (psi)	Écran[2] (cm)	Bractées cibles[3]	Bractées GUS+[4]	% bractées GUS+	Nombre de spots bleus[5]
pGEM121	650	6	3	1	33	1
pBI121.1	**650**	**6**	3	1	33	1
pBI121.1	**650**	**6**	**5**	**1**	**20**	**57**
pGEM121	900	6	2	1	50	6
pBI121.1	900	6	5	2	40	6
pBI121.1	900	6	5	1	20	1
pBI121.1	900	6	8	1	13	1
pBI121.1	900	6	16	7	58	1 à 6
pGEM121	1 300	6	4	1	25	3

1 : pHe = pression d'hélium en pounds/square inch. **2 : Écran** = distance entre l'écran d'arrêt et l'explant en cm. **3 : bractées cibles** = nombre de bractées visées. **4 : bractées GUS+** = nombre de bractées montrant au moins un spot bleu à la loupe. **5 : nombre de spots bleus** observés sur une même bractée.

l'ADN utilisé ne semble pas influencer cette expression tant que la quantité d'ADN par mg d'or demeure constante (1,7 µg/mg d'or).

Ces premières informations confirment les premiers résultats obtenus par agro-infection, à savoir que le promoteur 35CaMV semble être un bon choix pour d'ultérieures constructions plasmidiques. Toutefois, l'expression transitoire est très irrégulière. En effet, dans un cas on a pu observer jusqu'à 57 spots bleus, alors que dans tous les autres cas nous avons rarement observé plus de 6 spots sur un même cal organogène. Cela pourrait être imputé en grande partie à la quantité impressionnante de compo-

sés polyphénoliques produits par tous les tissus de l'artichaut en général. L'observation de l'expression GUS devient parfois très difficile puisque dans beaucoup de cas, le cal est pratiquement noir.

Les expériences de biolistique sont très prometteuses puisqu'on s'adresse directement aux cals organogènes. Cependant, outre le pourcentage de régénération relativement réduit [7, 12], les chances d'atteindre celles des cellules qui donneront naissance aux plantes demeurent faibles, exception faite du cas où l'on observe 57 spots bleus (Tableau IV). Par ailleurs, les expériences en cours ne nous permettent point de nous avancer quant aux possibilités de transmission des gènes introduits.

Conclusion

L'introduction de gènes étrangers par *Agrobacterium tumefaciens* ou par biolistique est désormais possible chez l'artichaut (*Cynara scolymus* L.). Cependant, la suite de nos travaux est largement conditionnée par la difficulté de disposer régulièrement des explants indiqués. L'artichaut est, en fait, une espèce difficile à étudier. Les bractées, matériel très intéressant pour la régénération, ne sont disponibles qu'à des périodes limitées de l'année. Il serait alors préférable de se pencher sur le développement d'explants organogènes *in vitro*. Nous pensons qu'en matière de transformation génétique, et jusqu'à présent, l'artichaut pourrait être placé parmi les plantes récalcitrantes.

Références

1. Ancora G, Belli-Donini ML, Cuozzo L (1981). Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid *in vitro* micropropagation. *Scientia Horticulturae* 14 : 207-213.
2. Draoui N, Ghorbel A, Kchouk ME (1993). *In vitro* culture of globe artichoke *(Cynara scolymus* L.) in Tunisia : utilization of vitromethods in artichoke improvement. *Agricoltura Mediterranea* 123 : 139-145.
3. Foury C (1967). Étude de la biologie florale de l'artichaut *(Cynara scolymus* L.). Application à la sélection. 1re partie. *Ann Amel Plantes* 17 (4) : 357-373.
4. Ghorbel A, Chabbouh N, Draoui N, Cherif C, Kchouk ME (1993). *In vitro* culture of globe artichoke *(Cynara scolymus* L.) in Tunisia : contribution of the *in vitro* propagation in globe artichoke cleansing. *Agricoltura Mediterranea* 123 : 133-138.
5. Harbaoui Y, Samjin G, Welvaert W, Debergh PC (1982). Assainissement viral de l'artichaut par la culture *in vitro* d'apex méristématiques. *Phytopathol Mediter* 21 : 15-19.
6. Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987). GUS-fusions : β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6 : 3901-3907.
7. Kchouk ME, Ghorbel A, Chabbouh N, Tavazza R, Ancora G (1994). Morphogenèse *in vitro* de l'artichaut *(Cynara scolymus* L.) cv. Violet d'Hyères. *Biologia,* sous presse.
8. Klein TM, Gradziel T, Fromm ME, Sanford JC (1988). Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. *Biotechnology* 6 : 559-563.
9. Michelmore R, Marsh E, Seely S, Landry B (1987). Transformation of lettuce *Lactuca sativa* mediated by *Agrobacterium tumefaciens. Plant Cell Rep* 6 : 439-442.
10. Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
11. Nelson RS, Powell PA, Beachy RN (1990). Coat protein-mediated protection against virus infection. In : Lycett GW, Grierson D, eds. *Genetic Engineering of Crop Plants* : 13-24.

12. Ordas RJ, Tavazza R, Ancora G (1990). *In vitro* morphogenesis in the globe artichoke *(Cynara scolymus* L.). *Plant Sci.* 71 : 233-237.
13. Pécaut P, Martin F (1990). Non-conformity of *in vitro* propagated plants of early Mediterranean varieties of globe artichoke *(Cynara scolymus* L.). *23e Congrès International d'Horticulture.* Florence, Italie. 27 août-1er sept. 1990. Abstracts du Congrès, Poster n° 4059. Vol. 2.
14. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
15. Tavazza M, Lucioli A, Ancora G, Benvenuto E (1989). cDNA cloning of artichoke mottled crinkle virus RNA and localization and sequencing of the coat protein gene. *Plant Mol Biol* 13 : 685-692.
16. Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M (1990). Construction of an intron-containing marker gene : splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* 220 : 245-250.
17. 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 Sci* 63 : 79-85.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1995, pp. 97-107.

10

Faisabilité du semis direct d'arbres à usages multiples

MARIA NICOLA DI MICHELE, LAURENT BRAY,
MOHAMED MOUNIR SAÏD, ALI AHMED DJAMA,
NASSER MOHAMED NASSER

Laboratoire de Lutte contre la Désertification,
Institut Supérieur d'Études et de Recherches Scientifiques et Techniques,
BP 486, Djibouti, République de Djibouti.

Résumé

Les pays de zones arides, comme Djibouti, sont actuellement confrontés à un processus de désertification dû à une surexploitation de la couverture végétale par des populations utilisant traditionnellement les arbres pour des usages multiples (fourrage, bois de chauffe, charbon, bois...). Un reboisement des zones affectées par des espèces locales déjà adaptées à des conditions extrêmes d'aridité est une des solutions à ce problème. Parmi les méthodes employées, on peut citer la mise en place de semis sortant de pépinières ou, encore, dans certains cas bien spécifiques, de plants produits par des biotechnologies. Ces méthodes sont coûteuses en termes de main-d'œuvre et d'investissement. Une solution alternative est le semis direct peu coûteux et rapide à mettre en place. L'objectif de cet article est de présenter les différents essais de semis directs effectués à Djibouti avec des arbres à usages multiples. Les taux de survie des semis directs sont discutés car ceux-ci sont généralement plus faibles qu'en sortie de pépinière. Les résultats obtenus montrent que les semis directs sont faisables à Djibouti. L'optimisation de certaines conditions de culture (protection contre l'insolation et le dessèchement, amendement, prétraitement des semences...) permettront de rendre cette méthode plus performante.

La République de Djibouti, pays à climat aride [1], est actuellement confrontée à un processus de désertification. Cette dégradation du couvert végétal a des conséquences catastrophiques aussi bien écologiques que sociologiques ou économiques. Elle est non seulement due au climat mais elle est liée aussi à une surexploitation des espèces ligneuses. Les populations rurales, traditionnellement nomades et non agricoles, utilisaient de tous temps le bois pour des usages multiples (bois de chauffe, fourrage, charbon, bois d'œuvre, tanins, pharmacopée et pharmacologie). Actuellement, une plus forte pression d'utilisation du couvert végétal, due à une explosion démographique [2] et à une mauvaise gestion des terres de parcours, a eu pour conséquence la rupture d'un fragile équilibre naturel et l'amorce du processus de désertification.

De fait, Djibouti subit une dégradation de la couverture végétale, une érosion des sols et une salinisation des eaux et des terres [2]. Le reboisement des zones affectées peut être une solution. Elle permettrait de résoudre ces problèmes et pourrait se faire avec les ressources génétiques forestières de Djibouti qui sont le résultat d'une sélection effectuée dans des conditions d'aridité extrême [3].

Afin de répondre aux attentes spécifiques de Djibouti en matière de désertification, un laboratoire de lutte contre la désertification a été installé dans le cadre de la coopération franco-djiboutienne. Les objectifs de ce laboratoire sont, entre autres, de définir pour Djibouti les méthodes de reboisement les mieux adaptées et les moins coûteuses possibles.

La méthode généralement employée pour combattre la désertification est la plantation de plants obtenus par semis en pépinière ou par les biotechnologies. Les biotechnologies sont utilisées pour améliorer les espèces d'intérêt agronomique ou pastoral ou pour multiplier celles ne pouvant se propager naturellement de façon massive [4, 6]. Elles sont ainsi utilisées pour la multiplication du palmier à huile [7, 8], du palmier-dattier [9], du *Casuarina* [10] et de l'*Acacia albida* [11].

Cependant, certaines méthodes moins coûteuses existent et peuvent être des solutions alternatives pour les pays en voie de développement qui disposent généralement de peu de personnel qualifié et de peu de moyens financiers. Une de ces solutions est le semis direct qui ne demande aucun investissement lourd et dont les méthodologies sont simples. Cependant à Djibouti, à notre connaissance, aucun travail concernant le semis direct n'a encore été publié à ce jour.

Cet article présente les résultats obtenus sur les semis directs d'arbres à usages multiples à Djibouti. L'influence des trous de plantation est d'abord étudiée pour déterminer s'ils créent une niche écologique favorable au développement des semis (protection contre l'insolation, conservation de l'humidité). Les conséquences du prétraitement des semences sont ensuite présentées. L'objectif de ces études est de disposer de semences aptes à germer rapidement pour profiter des moindres précipitations aléatoires du pays. Les perspectives d'utilisation du semis direct comme méthode de reboisement sont aussi développées.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Origines des semences

Quatre espèces ligneuses fourragères ont été testées : *Acacia nilotica*, *Acacia flava*, *Pithecellobium dulce* et *Ziziphus mauritiana*. Les semences ont toutes été prélevées à

Tableau I. Lieu et date de récolte des semences expérimentées.

Espèces	Récolte des semences	
	Lieu	**Date de récolte**
Acacia nilotica	Magdoul	29/05/90
Acacia flava	Gabode	04/07/90
Pithecellobium dulce	Gabode	03/05/92
Ziziphus mauritiana	Oued Didjan Der	17/04/90

Djibouti (Tableau I). Le potentiel de germination de ces semences a été vérifié en laboratoire afin de s'assurer que les variations éventuellement observées dans les semis sur le terrain ne sont dues qu'aux conditions expérimentales.

Écologie et utilisations traditionnelles

Ces quatre espèces ont été choisies en fonction de l'intérêt que les populations locales nomades leur portaient. Les appellations d'*Acacia flava* et de *Ziziphus mauritiana* sont utilisées car elles sont les plus communément admises.

Acacia nilotica (L.) Willd. ex Del, synonyme *A. nilotica* var. *tomentosa* est de la famille des *Mimosaceae* [12]. A Djibouti, ses aires de peuplement naturel sont des dépressions temporairement inondées [3, 12, 13]. *Acacia nilotica* a de nombreux usages : fourrage, production de tanins, bois de chauffe, charbon de bois, bois d'œuvre et pharmacopée [13, 14].

Selon Lebrun *et al.* [12], *Acacia flava* (Forsk.) Schweinf. var. *seyal* (Del.) est synonyme d'*A. seyal*. Cependant, d'autres auteurs [13, 14] distinguent ces deux espèces. Les aires naturelles de peuplement de cet arbuste de la famille des *Mimosaceae* sont des dépressions à sols argileux ou limoneux ; il supporte des sols modérément salés. Sa résistance aux inondations est moins importante que celle d'*Acacia nilotica*. C'est un arbre à usages multiples : fourrage, bois de chauffe, charbon, bois d'œuvre, production de tanins, clôtures sèches et pharmacopée [14]. De plus, il possède de remarquables qualités de reprise après des coupes.

Pithecellobium dulce (Roxb., Benth) est une mimosacée plantée et utilisée comme arbre d'ombrage, pour la réalisation de haies vives et pour la production de fruits. L'arille charnue des graines fraîches est comestible et les gousses de cet arbre sont vendues sur les marchés de Djibouti [12].

Z. mauritiana, de la famille des *Rhamnaceae*, fait partie des espèces de jujubier les plus communes à Djibouti [13, 14]. De Framont [3] indique que *Z. mauritiana* est synonyme de *Z. mucronata* alors que d'autres auteurs distinguent ces deux genres [12, 14]. Le jujubier se propage par les semences mais aussi par bouturage et marcottage [14]. A Djibouti, les sites de peuplement naturel sont l'oued Didjan Der et ceux des monts Mablas et Godas [3]. Les quelques individus hors d'âge qui restent disparaîtront au fur et à mesure des crues torrentielles des oueds [1]. Cette espèce fait partie avec l'*A. nilotica* de celles définies comme prioritaires pour la République de Djibouti [3]. C'est un arbre particulièrement recherché pour ses fruits consommés à l'état frais et pour son feuillage servant de fourrage aux petits ruminants et aux dromadaires [3, 12, 13]. Les autres usages sont : petit bois d'œuvre, haies vives ou mortes et pharmacopée [14].

Méthodes

Prétraitement des semences

Les semences d'*A. nilotica*, *A. flava* et *P. dulce* sont prétraitées dans l'acide sulfurique concentré de 95 %-97 % (Tableau II) puis rincées à l'eau distillée. La durée du prétraitement varie selon les espèces ; il permet de dissoudre le tégument et d'accélérer la germination [15]. Pour *Z. mauritiana*, les téguments sont cassés (Tableau II).

Tableau II. Conditions de prétraitement selon les espèces. Le prétraitement des semences est soit chimique, bain d'acide sulfurique concentré à 95 %-97 %, soit mécanique, rupture du tégument lignifié.

Espèces	Prétraitement des semences	
	Type	Nombre de graines
Acacia nilotica	H_2SO_4 40 min	90
Acacia flava	H_2SO_4 40 min	90
Pithecellobium dulce	H_2SO_4 10 min	90
Ziziphus mauritiana	rupture mécanique	90

Sites d'expérimentation

Le site d'expérimentation est une plaine inondable sub-désertique appelée Petit-Bara distante de 60 km de la capitale. Aucune précipitation n'est survenue pendant la durée des expériences, de mai à juin 1992. Les températures mensuelles moyennes sont d'environ 30 °C. Les seuls arbres présents naturellement sur la zone d'expérimentation sont des *Acacia nilotica*.

La texture de l'horizon de surface est du type loam-limoneux avec 61 % de limons, 24 % de sable et 13 % d'argile. Les sols se caractérisent par une absence de structure et de très faibles teneurs en éléments organiques.

Méthodes de plantation

La parcelle d'expérimentation étant de très faible superficie (300 m^2), le milieu est homogène. Les plantations en blocs aléatoires ne sont donc pas nécessaires [16] et elles ont été faites en lignes. Les trous de semis sont disposés à distance de 1 m × 1 m et ont des profondeurs de 0,15 et 30 cm pour un diamètre moyen d'environ 10 cm. Ils sont arrosés à saturation au moment du semis puis les semences sont déposées au fond des trous de plantation. Un arrosage hebdomadaire de 2,5 l par trou est ensuite assuré. La zone expérimentale est délimitée par une clôture grillagée, afin de protéger les semis du bétail.

Méthodes analytiques

Pour chacune des quatre espèces, les semences ont été prétraitées ou non, puis semées, trois par poquet, en surface ou au fond de trous d'une profondeur de 15 ou 30 cm. Chacune des six conditions a été répliquée dix fois.

Deux facteurs ont été étudiés : influence de la profondeur des trous et effet du prétraitement. Ils ont été considérés comme indépendants l'un de l'autre. En conséquence, les réplications pour l'étude de l'influence de la profondeur des trous de plantations sont au nombre de vingt puisque les semences prétraitées ou non sont regroupées. Celles pour l'étude de l'influence du prétraitement sont au nombre de trente puisque les trois profondeurs testées sont regroupées.

En conditions contrôlées de laboratoire, les capacités germinatives des semences sont évaluées par la fréquence cumulée de semences ayant germé. En conditions naturelles, ce pourcentage de germination n'est pas aisé à évaluer (enfouissement de semences, mortalité de certaines plantules...) et n'a pas beaucoup de signification. L'indicateur que nous avons donc utilisé n'est plus une fréquence cumulée mais le rapport entre le nombre de poquets où il y a des semis vivants et le nombre initial de poquets. Ce rapport est appelé par la suite pourcentage des semis vivants ou taux de survie. Il intègre pour une part positive la germination des semences et pour une part négative la mortalité des semis. L'évolution de ce pourcentage est considérée pour une période de 21 jours, identique à celle habituellement utilisée pour suivre les pourcentages de germination [17].

Résultats

Influence de la profondeur

Chez *A. nilotica* (Figure 1-a), il n'y a aucune différence entre les courbes des semis de surface et celles de 15 ou 30 cm. Les profondeurs de 15 et de 30 cm n'ont donc pas favorisé le développement des semis.

Chez *A. flava* (Figure 1-b), le taux de survie des semis de surface est plus élevé à 7 jours que ceux de 15 ou 30 cm de profondeur. Cependant, dès le 14^{e} jour et jusqu'au 21^{e}, il n'y a plus de différence entre les taux de survie des semis en surface et ceux à 15 cm ; ils sont dans les deux cas d'une valeur d'environ 10 %. Après 14 jours, aucun des semis à 30 cm n'est vivant alors que la survie de ceux de surface et de 15 cm est de 15 %. En effet, malgré toutes les précautions prises lors des arrosages, on observe à 30 cm un enfouissement des semences dû à l'absence totale de structure du sol.

Chez *P. dulce* (Figure 1-c), à 7 jours, le taux de survie le plus élevé est obtenu pour 15 cm de profondeur (30 %) alors que ceux à 0 et 30 cm sont seulement de 10 % environ. Par la suite, pour 15 cm de profondeur, la mortalité des semis constatée à 14 jours est compensée par de nouvelles germinations de semences entre 14 et 21 jours qui rétablissent un taux de survie de 30 %. Pour les expériences en surface, le taux de semis vivants augmente régulièrement car les germinations continuent et il atteint à 21 jours une valeur d'environ 30 %, égale à celle de 15 cm. Dans les trous de 30 cm, on constate, comme chez l'*A. flava*, un enfouissement des semences se traduisant par un taux de survie nul dès le 14^{e} jour.

Chez *Z. mauritiana* (Figure 1-d), après 7 jours, à 15 cm de profondeur, 15 % des semences ont germé alors qu'il n'y a encore eu aucune germination dans les autres conditions. A 14 jours, aucun semis vivant à 15 ou 30 cm n'est observé alors que le taux de survie des semis de surface est de 10 %. Entre 14 et 21 jours, d'autres germinations ont lieu pour les semis de surface dont le taux de survie est de 15 % à 21 jours.

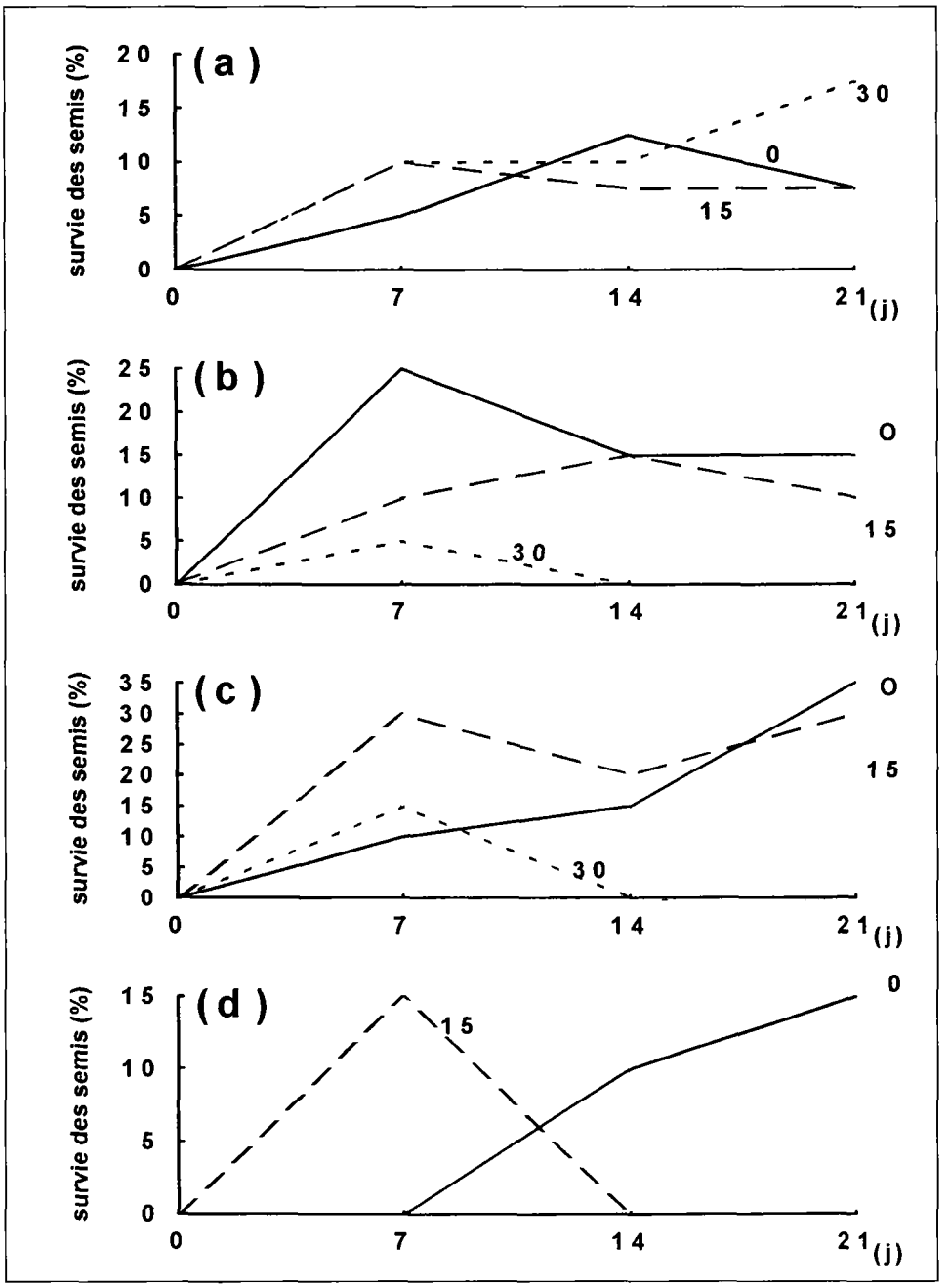


Figure 1. Comparaison de l'évolution de la survie des semis (%) d'*Acacia nilotica* (a), d'*Acacia flava* (b), de *Pithecellobium dulce* (c) et de *Ziziphus mauritiana* (d) selon la profondeur des trous (0, 15 ou 30 cm). Chaque condition a fait l'objet de 20 répétitions.

Influence du prétraitement

Chez *A. nilotica* (Figure 2-a), à 7 jours, le pourcentage de semis vivants est de seulement 3 % pour les semences non prétraitées alors qu'il est de 13 % pour celles prétraitées. Entre 7 et 21 jours, les pourcentages de semis vivants n'augmentent presque plus, respectivement, de 3 % et de 2 % seulement. La germination se fait donc chez cette espèce dès la 1re semaine quel que soit le prétraitement.

Chez *A. flava* (Figure 2-b), le pourcentage de semis vivants, après 7 jours, est de 7 % pour les semences non prétraitées et de 20 % pour les semences prétraitées. Après 21 jours, les taux de survie diminuent légèrement, du fait de l'enfouissement de certaines semences, et sont respectivement de 3 % et de 15 %.

De même que chez *A. nilotica*, les germinations des semences d'*A. flava* se font donc dès la 1re semaine à un taux beaucoup plus élevé chez les semences prétraitées.

Chez *P. dulce* (Figure 2-c), aucune plantule n'est observée chez les prétraités alors que les semis non prétraités ont un taux de survie de 43 % après 21 jours. Le bain d'acide sulfurique pendant 10 min a été trop drastique et a supprimé les capacités germinatives des semences.

Chez *Z. mauritiana* (Figure 2-d), les seules plantules observées sur la période d'expérimentation sont celles issues des semences dégumentées. A 7 jours, le taux maximal de survie est atteint (10 %). A 21 jours, il a la même valeur. Les premières germinations chez les semences non prétraitées seront très tardives, hors de la période d'étude (2 mois après le début de l'expérience). La rupture du tégument permet donc une germination plus rapide que chez les semences avec tégument.

Discussion et conclusion

Djibouti se caractérise par une évapotranspiration des eaux de précipitations très importante, entre 70 % et 100 % [18]. Les trous de plantation creusés pour cette expérience avaient un diamètre faible (10 cm) afin de créer une niche écologique favorable à la germination : protection contre l'ensoleillement et limitation de l'évaporation. Ainsi, la terre au fond des trous de 15 et de 30 cm de profondeur était encore humide 7 jours après le début de l'expérience. Cependant, les arrosages des semis au fond des trous de 15 et 30 cm ont eu pour conséquence un enfouissement des semences. Du fait que le sol n'a pas de structure et que la texture est loam-limoneuse, un couche battante, très dure, se forme après le séchage empêchant le développement des semis. De fréquentes germinations avortées ont été observées. Cela explique sans doute que le taux de survie des semis à 30 cm est très faible sauf chez *A. nilotica*, espèce endémique des zones inondables à sols limoneux. Cependant, à 7 jours, la profondeur intermédiaire de 15 cm semble favoriser la germination des semences de certaines espèces, en particulier *P. dulce* et *Z. mauritiana*.

De même, le prétraitement des semences favorise une implantation plus rapide des espèces ligneuses testées. Le prétraitement chimique ou mécanique supprime les inhibitions tégumentaires et rend les semences aptes à germer immédiatement. Ainsi, elles peuvent profiter de l'eau apportée au moment du semis avant son évaporation. Chez *P. dulce*, le traitement de 10 min par l'acide sulfurique a été trop drastique et a compromis la viabilité de l'embryon. Cela est sans doute dû à la fraîcheur des semences qui venaient d'être récoltées.

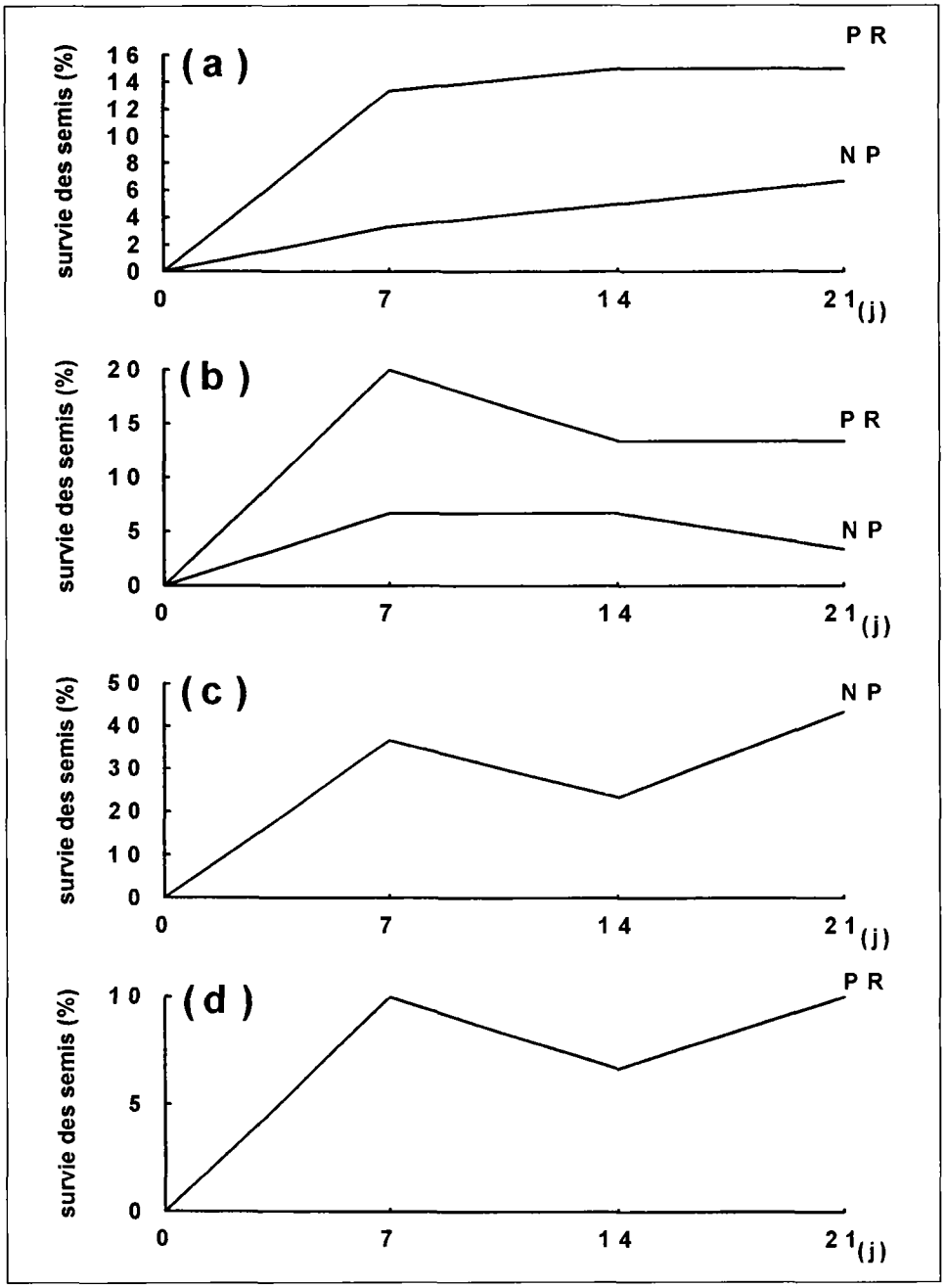


Figure 2. Comparaison de l'évolution de la survie des semis (%) d'*Acacia nilotica* (a), d'*Acacia flava* (b), de *Pithecellobium dulce* (c) et de *Ziziphus mauritiana* (d) pour des semences prétraitées (PR) ou non (NP). Chaque condition a fait l'objet de 30 répétitions.

Plus généralement, il convient de déterminer pour chacune des espèces qui sera nouvellement testée le prétraitement permettant la meilleure germination en semis direct. Ces données devront être obtenues par d'autres expériences sur le terrain et non pas en laboratoire. En effet, les pourcentages de germination pour une même espèce et selon des conditions de prétraitement identiques sont nettement plus faibles en pépinière qu'en laboratoire [19]. On peut donc penser que ces taux sont encore plus faibles en semis direct. Cependant, le pourcentage de survie obtenu dans certaines conditions est élevé, jusqu'à 35 % pour les semis de *P. dulce*. Cela indique que des recherches définissant les paramètres (prétraitement, création d'une niche écologique, amendements) adaptés à chaque espèce et à chaque site concerné permettraient sans doute de rendre cette méthode beaucoup plus efficace. Ces paramètres dépendent de plusieurs facteurs : caractéristiques physico-chimiques du sol, régime des précipitations, inondations éventuelles, ensoleillement et températures.

Ces premiers résultats obtenus sur les semis directs d'arbres à usages multiples montrent que cette méthode est techniquement faisable par rapport à celles traditionnellement utilisées. La comparaison des coûts est plus difficile. Le semis direct est cependant moins coûteux en main-d'œuvre car il est immédiat. En effet, les plants obtenus par semis en pépinières ne sont plantés qu'à l'âge de 2 ou 3 mois. On peut aussi considérer les charges supplémentaires que génèrent les méthodes traditionnelles par rapport au semis direct. Pour réaliser des semis directs, l'investissement est limité au matériel roulant et à la mise en défense. Pour les semis sortant de pépinières, les charges supplémentaires comprennent : l'investissement d'une serre ou d'une ombrière et l'entretien afférent, le transport et la distribution des plantules, un système d'irrigation ou un camion-citerne pour l'arrosage après le repiquage. Un cas particulier est celui d'*A. nilotica* qui peut être planté en sortie de pépinière durant le retrait d'inondations [20]. Dans ce cas, l'arrosage n'est pas nécessaire mais ce type de plantation nécessite des espèces résistantes aux inondations.

Selon Delwaulle [21], malgré une croissance légèrement retardée et un pourcentage de survie plus faible, les semis directs ont l'avantage de coûter bien moins cher et de réduire les problèmes de transport et de distribution. De plus, les plants issus de semis direct sont par la suite plus résistants aux contraintes climatiques de Djibouti que ceux issus de pépinières qui nécessitent un arrosage régulier pour survivre [22].

Le semis direct est aussi une méthode facilement vulgarisable ne nécessitant pas de personnel spécialisé. En effet, il convient de ne surtout pas négliger l'aspect sociologique et de sensibilisation des populations rurales. La curiosité de nombreux nomades fut éveillée par ces expériences car les espèces utilisées leur étaient familières. Les objectifs et les techniques du semis direct furent expliqués. Ainsi, ces expériences ont une importante valeur pédagogique car elles sont techniquement simples. Elles permettent de faire prendre conscience aux nomades de l'importance de la sauvegarde du couvert forestier généralement exploité de façon anarchique. Le pâturage des troupeaux et la coupe du bois sont libres sans qu'une politique à long terme de gestion des ressources naturelles des terres de parcours soit mise en place. Dans tous les cas, le déboisement s'accélérant, cette population commence à réaliser la destruction de son cadre naturel de vie. Il est donc primordial de proposer des méthodes simples de reboisement qu'elle pourrait éventuellement mettre elle-même en pratique.

Ainsi, bien que le semis direct soit plus aléatoire que la transplantation de plants provenant de pépinières, la méthode a l'avantage d'être très économique et de nécessiter une logistique réduite mieux adaptée aux pays en voie de développement. Cette méthode mériterait donc d'être considérée dans les politiques de lutte contre la désertification.

Références

1. UNESCO (1977). *Carte de répartition mondiale des régions arides.* UNESCO.
2. Comité National pour l'Environnement (1991). *Rapport National Environnement.* Djibouti : ONTA/SPSE : 105.
3. De Framont H (1990). Valorisation des ressources génétiques forestières en République de Djibouti. *Revue de l'ISERTS* 4 : 13-18.
4. Diallo N, Duhoux E (1984). Organogenesis and multiplication *in vitro* of *Eucalyptus camaldulensis. J Plant Physiol* 115 : 177-182.
5. Sasson A (1986). *Quelles biotechnologies pour les pays en voie de développement ?* Paris : Biofutur/UNESCO, 200 p.
6. Di Michele MN, Bray L (1993). La culture *in vitro* : un outil de la lutte contre la désertification. *Rivista di Agricoltura Subtropicale e Tropicale* (sous presse).
7. Pannetier C, Arthuis P, Lievoux D (1981). Néoformation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur des fragments foliaires cultivés *in vitro. Oléagineux* 36 : 119-122.
8. Hanower J, Pannetier C (1982). *In vitro* vegetative propagation of the oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq. In : Fujiwara A, éd. *Plant tissue culture.* Proc. 5th Int. Cong. on Plant Tissue and Cell Culture. Tokyo : Maruzen Co Ltd : 745-746.
9. Falcone AM, Marcheschi J (1988). Embriogenesi somatica *in vitro* da tessuti di palma da dattero *(Phoenix dactylifera* L.) : risultati preliminari. *Rivista di Agricoltura Subtropicale e Tropicale* 1 : 379-389.
10. Duhoux E, Sougoufara B, Dommergues Y (1986). Propagation of *Casuarina equisetifolia* through axillary buds of immature female inflorescences cultures *in vitro. Plant Cell Reports* 3 : 161-164.
11. Duhoux E, Davies D (1985). Caulogenèse à partir de bourgeons cotylédonnaires d'*Acacia albida* et influence du saccharose sur la rhizogenèse. *J Plant Physiol* 121 : 175-180.
12. Lebrun JP, Audru J, César J (1989). *Catalogue des plantes vasculaires de la République de Djibouti.* Maisons-Alfort : IEMVT : 277.
13. Audru J, César J, Forgiarini G, Lebrun JP (1987). *La végétation et les potentialités pastorales de la République de Djibouti.* Maisons-Alfort : IEMVT : 384.
14. Programme de participation de la population au reboisement et à l'aménagement rural (1987). *Environnement africain. Plantes et Arbres Utiles. Fiches techniques.* Dakar : CCE/ENDA.
15. Nabil M (1991). Etudes comparatives du développement de 6 provenances d'*A. nilotica* cultivés en conditions hydriques limitantes et non limitantes. DEA Université Nancy I.
16. Huxley PA (1989). Field trials – Some general Considerations. In : Huxley PA, ed. *Methodology for the exploration and assessment of multipurpose trees.* Section 3, part 3c. Nairobi : ICRAF : 7-15.
17. Wood PJ, Huxley PA (1989). Seed for species and provenance research. In : Huxley PA, ed. *Methodology for the exploration and assessment of multipurpose trees.* Section 3, part 3d. Nairobi : ICRAF : 7-15.
18. Coopération hydrogéologique allemande (1982). *Inventaire et mise en valeur des ressources en eau de la République de Djibouti.* Volume II : Eaux de surface. Hannovre : BGR.
19. Stewart J (1988). *International trial of Central American dry zone hardwood species.* Oxford : OFI : 81.
20. Audru J, Labonne M, Planchenault D (1990). *Desertification : a reversible trend.* Paris : ministère de la Coopération et du Développement : 8.
21. Delwaulle JC (1978). *Plantations forestières en Afrique tropicale sèche. Techniques et espèces à utiliser.* Nogent-sur-Marne : CTFT.
22. Laventure C (1992). *Projet Élevage intensif dans les jardins. Rapport de fin de contrat (opération n° 88075).* Djibouti : AFVP : 20.

Genre	Explant	Organogenèse	Sels minéraux	pH	Vitamines	Sucre	Hormones	Référence
Acacia albida	racine	culture de racines et régénération	MS/2	?	—	S(30)	KIN (0,05) ou BAP (10) ou spermine (2)	Gassama et Duhoux (1992)
Acacia albida	bourgeons cotylédonnaires	caulogenèse	MS	5,5	N&N (5)	S (15)	ANA (0,5) BAP(3)	Duhoux, Davies (1985)
Acacia albida	vitroplant	sevrage (1mois)	Knop 1/2					Duhoux, Davies (1985)
Acacia albida	rameaux néoformés sur bourgeons cotylédonnaires	rhizogenèse	LS	5,5	N&N (5)	S (100)	—	Duhoux, Davies (1985)
Acacia auriculiformis	hypocotyle (5-10 mm)	cal (65 %) + tige (40 %) ou cal (96 %) + tige (30 %)	MS 1/2	?	—	S (30)	BAP (1) ou NAA(0,5) + BAP(1)	Ranga Rao, Prasad (1991)
Acacia auriculiformis	hypocotyle (5-10 mm)	caulogenèse	MS 1/2	?	Glutamine (150)	S (30)	NAA (0,5) + BAP (1)	Ranga Rao, Prasad (1991)
Acacia nilotica	bouture	caulogenèse et rhizogenèse	MS	5,8	—	?	IAA (0,5)	Mathur et Chandra (1983)
Acacia senegal	plante axénique ou âgée de 4-5 ans en serre	caulogenèse	macroMS 1/2 microMS	5,8	—	S (20)	Zéatine (0,1)	Badji *et al* (1992)
Acacia senegal	plante axénique ou âgée de 4-5 ans en serre	induction de la rhizogenèse (12 j)	JOR/2	5,8	—	S (20)	ANA (9,3)	Badji *et al.* (1992)
Acacia senegal	plante axénique ou âgée de 4-5 ans en serre	expression de la rhizogenèse	JOR/2	5,8	—	S (20)	—	Badji *et al.* (1992)
Prosopis tamarugo	bouture uninodale	callogenèse puis caulogenèse et rhizogenèse	MS	5,7	—	?	NAA (3) K (0,01) GA3 (0,01) ou NAA (5)	Jordan *et al* (1985)
Prosopis chilensis	bouture uninodale	callogenèse et rhizogenèse	MS	5.7	—	?	NAA (3) K (0,01) GA3 (0,01) ou NAA (5)	Jodan *et al* (1985)
Prosopis chilensis, P alba	culture d'apex	rhizogenèse	Jordan *et al* (1982)	5,7	—	?	NAA (0,3) K (0,1) GA3 (0,01)	Jordan *et al* (1985)
Prosopis chilensis	culture d'apex	rhizogenèse puis caulogenèse	MS	5,7	—	?	IBA (1) puis BA (>à,5)	Jordan (1987)
Prosopis tamarugo, P. chilensis	cals	caulogenèse et rhizogenèse	MS	5.7	cystèine (15)	?	NAA (5)	Jordan (1987)

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1995, pp. 109-110.

11

Un modèle de structure prairiale, de cultivar et de plante dans l'amélioration de la luzerne

P. ROTILI, G. GNOCCHI, C. SCOTTI

Istituto Sperimentale per le Colture Foraggere, Lodi, Italie.

Une luzernière est une « société végétale » où les individus interfèrent entre eux. Nous représentons la luzernière comme un système qui se renouvelle d'une coupe à l'autre. Les plantes sont les éléments du système ; la structure du système est le résultat, au niveau morphologique, du réseau de relations qui s'installent entre les plantes. Le but du sélectionneur est d'améliorer le système et donc ses deux composants : la structure et les plantes. Les nombreuses expériences réalisées à Lodi ont permis de comprendre que les effets d'interférence entre les individus se manifestent sous la forme de domination. Les situations de domination expliquent bien pourquoi : (a) la luzernière possède une structure polystratifiée ; (b) la mortalité est en corrélation négative avec le degré d'homogénéité génétique du cultivar, tandis que la production fourragère est en corrélation positive. Pour améliorer la structure, il faut modifier les relations entre les plantes en minimisant la domination (+, −) vers des situations qui correspondent au neutralisme (0, 0). Nous aurons alors une structure idéale (structure monostratifiée). La luzernière caractérisée par cette structure devrait avoir les propriétés suivantes : (1) synchronisme total des plantes pour : temps de repousse, vitesse d'élongation des internœuds, temps d'émission du bouton vert ; (2) la plus grande homogénéité des plantes pour : tolérance aux coupes précoces (bouton vert), nombre et hauteur des tiges, réponse à la température et à l'eau.

Pour mettre en place une luzernière ayant une structure qui s'approche le plus possible du modèle monostratifié, il faut utiliser une variété suffisamment homogène. Le modèle variétal le mieux adapté à une agriculture très poussée et bien organisée est

représenté par un cultivar à base génétique étroite. Il semble que l'hybride libre à 8 parents S2 (ayant subi 2 autofécondations) est supérieur à la synthétique correspondante à la fois pour la production de fourrage et pour celle de la graine.

Une luzernière est très productive si elle est à la fois persistante et vigoureuse. La persistance est liée surtout à la structure ; la vigueur, au contraire, surtout à la plante. Un modèle de plante idéale concerne : 1 : le temps de dormance ; 2 : la réponse aux hautes températures et à l'irrigation ; 3 : la vitesse d'émission des feuilles après chaque coupe ; 4 : la tolérance absolue à la coupe au bouton vert ; 5 : la hauteur, la grosseur et le nombre des tiges.

Dans le procédé de fabrication variétale, une phase d'autofécondation permet : (1) d'homogénéiser le plus possible les caractères physiologiques et de voir conservée cette homogénéité ; (2) de concentrer les structures génétiques (gènes et linkats) favorables à la vigueur. Dans la luzerne, en tant que plante autotétraploïde, la sélection n'est pas efficace si on ne réduit pas le niveau d'hétérozygotie. Le démasquage, au moyen de l'autofécondation, nous permet d'améliorer la valeur génétique (aptitude générale à la combinaison) des plantes parentales.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 111-121.

12

Ressources génétiques et résistance aux maladies des arbres fruitiers : résultats et perspectives

M. LATEUR, C. POPULER

Station de Phytopathologie de l'État, CRA Gembloux, Belgique.

Résumé

Le programme de recherches mené par la Station de Phytopathologie depuis 1975, au sujet des ressources génétiques fruitières et de la résistance aux maladies, a permis de rassembler plus de 2 400 introductions d'arbres fruitiers originaires soit de Belgique soit de pays limitrophes (pommier, poirier, prunier, cerisier, pêcher). L'évaluation systématique de ce matériel dans nos vergers expérimentaux, au point de vue de la résistance aux maladies et des principaux caractères agronomiques, a, jusqu'à présent, conduit à la sélection de variétés intéressantes et à leur valorisation directe. En 1985, la station a diffusé les trois premières variétés ; actuellement 14 sélections de variétés recommandées par la station sont multipliées par les principales pépinières belges sous le sigle RGF (Ressources Génétiques Fruitières). Parmi celles-ci, 4 variétés de pommiers seront essayées en lutte intégrée par un groupement d'arboriculteurs professionnels. Les variétés RGF de pommiers ainsi que d'autres sélections spécifiques sont également expérimentées dans un verger pilote d'une importante cidrerie du pays. Ce matériel trouve, en plus, de nombreuses autres valorisations, notamment culturelles. Depuis 1988, des croisements et des semis clonaux de pommier sont réalisés avec l'objectif de créer de nouvelles variétés résistantes aux maladies faisant intervenir une

résistance polygénique aux maladies. Des résultats préliminaires concernant la résistance à la tavelure (Venturia inaequalis) *et à l'oïdium* (Podosphaera leucotricha) *sont discutés.*

Depuis 1975, la Station de Phytopathologie a rassemblé progressivement une vaste collection de variétés d'arbres fruitiers anciennement cultivés en Belgique ou y ayant leur origine [15]. Chaque introduction est plantée dans un verger d'évaluation ne subissant aucun traitement fongicide ou insecticide, dans le but d'évaluer sa résistance aux principales maladies ainsi que ses caractéristiques agronomiques (Tableau I).

La plupart des variétés commerciales de pommiers et poiriers cultivées actuellement

Tableau I. Évaluations des variétés rassemblées dans nos vergers expérimentaux ; ( ) = nombre d'introductions observées annuellement.

A. Évaluation de la résistance aux maladies et accidents physiologiques

1. **Pommier (900)**
   - 1.1. *Venturia inaequalis*
   - 1.2. *Erwinia amylovora*
   - 1.3. *Podosphaera leucotricha*
   - 1.4. *Nectria galligena*
   - 1.5. *Monilinia fructigena*
   - 1.6. Maladie des points ligneux (bitter pit)
2. **Poirier (616)**
   - 2.1. *Erwinia amylovora*
   - 2.2. *Venturia pyrina*
3. **Prunier (145)**
   - 3.1. *Monilia fructigena*
   - 3.2. *Tranzschelia pruni-spinosae*
   - 3.3. *Coryneum beyerinckii*
   - 3.4. Crevassement des fruits
   - 3.5. *Taphrina pruni*

B. Évaluation des caractères agronomiques

1. Reprise au greffage et mesure de la croissance du scion d'un an (incompatibilité)
2. Floraison
   - 2.1. Phénologie florale
   - 2.2. Sensibilité aux gelées printanières
   - 2.3. Étude *in vivo* de la qualité du pollen (pommier et prunier)
   - 2.4. Étude de l'autofertilité (prunier)
3. Période de maturité
4. Qualité gustative
5. Rendement
6. Poids moyen des fruits
7. Durée de conservation
8. Détermination pomologique de l'authenticité variétale
9. Aptitude à la transformation industrielle

en Europe occidentale sont très sensibles aux principales maladies [4, 17]. En Belgique, cette forte sensibilité entraîne l'obligation, de la part des arboriculteurs, d'appliquer, en culture de pommier, entre 18 et 24 traitements fongicides par saison [18].

L'objectif de nos travaux est de sélectionner des variétés peu sensibles aux maladies et qui possèdent des caractéristiques agronomiques intéressantes. Au terme de 5 à 8 années d'observation en verger, une présélection peut être faite.

Depuis 1985, 9 variétés de pommes, 4 de prunes et une de pêches ont été diffusées par la station sous le sigle « RGF » (Ressources Génétiques Fruitières). Ces variétés se caractérisent toutes par une faible sensibilité aux maladies. Elles sont commercialisées par la plupart des pépiniéristes professionnels belges, avec lesquels nous sommes liés par un contrat de diffusion [14].

L'inéluctable intensification agricole entraîne une érosion accélérée des ressources génétiques fruitières [10]. Ce patrimoine régional ou local représente une richesse à évaluer et à exploiter en tant que réserve de variabilité pour de nombreux caractères de résistance et de rusticité, mais également de qualité gustative, de capacité à la conservation naturelle, d'aptitudes à la transformation industrielle, etc. Le projet de sauvegarde et de conservation de ces ressources génétiques s'est ajouté au projet initial de sélection de variétés résistantes. Actuellement, la banque de gènes de la Station de Phytopathologie comporte 1 150 introductions de pommier, 850 de poiriers, 310 de pommiers, 56 de cerisiers et 29 de pêchers. Cette banque de gènes est maintenue sous forme d'arbres dans des vergers conservatoires.

Les programmes mondiaux d'amélioration du pommier visant à obtenir des variétés nouvelles résistantes à la tavelure (*Venturia inaequalis* (Cooke) Wint.) ont abouti à la diffusion de 34 variétés connues à l'heure actuelle, dont 2 contiennent le gène *Vm*, qui est contourné par la race 5 de la tavelure, et 30 possèdent le gène *Vf,* qui provient du *Malus floribunda* Siebold ex Van Houtte clone 821, et qui a conféré une résistance totale à la tavelure durant près de 50 ans [3]. Cette dernière résistance a été contournée, au moins partiellement, par une nouvelle race de tavelure trouvée à Ahrensburg (Allemagne) ; la découverte de cette nouvelle race oblige les améliorateurs à adapter leurs stratégies et à explorer d'autres voies pour l'obtention de variétés possédant une résistance durable à la tavelure [12]. Notre programme d'amélioration du pommier a débuté modestement en 1988 [7]. Il a pour objectif l'obtention de variétés résistantes à la tavelure (*Venturia inaequalis),* possédant une faible sensibilité à l'oïdium (*Podosphaera leucotricha*), et de qualités agronomiques suffisantes pour la culture en production intégrée (IP). Depuis 1989, au total 4590 et 24 700 pépins ont été semés, ceux-ci provenant respectivement de croisements dirigés et de pollinisations libres. Dans le but d'obtenir des sélections possédant une résistance durable à la tavelure, les géniteurs utilisés sont des sélections de variétés anciennes possédant une résistance polygénique à la tavelure et à l'oïdium. Elles sont soit croisées entre elles ou avec des variétés plus modernes, possédant dans certains cas le gène *Vf* de résistance à la tavelure, soit utilisées en pollinisation ouverte. Les résultats partiels présentés ci-dessous proviennent de semis clonaux des variétés La Paix et Radoux.

Matériel et méthodes

Matériel

Les trois quarts du matériel rassemblé à la station proviennent de prospections dans les campagnes, il s'agit soit de « variétés paysannes » régionales ou locales, soit de variétés non nommées, plus rarement de variétés d'obtenteurs nommées. L'autre quart provient de collections fruitières belges ; ces variétés retrouvées dans les collections sont presque toutes des variétés dites « d'obtenteurs » dûment nommées [16].

Méthodes

• ***Vergers expérimentaux d'évaluations***

Pour le pommier, nous utilisons le porte-greffe M9 à une densité de 1200 arbres/ha et pour le prunier, le St-Julien A et le St-Julien 655-2 à une densité de 300 arbres/ha. Les vergers ne subissent aucun traitement fongicide ni insecticide. Les méthodes d'évaluation de la résistance aux maladies ainsi que des caractères agronomiques des variétés ont été décrites antérieurement [1, 15].

• ***Semis et évaluation des plantules***

Les semis clonaux sont issus de pollinisations libres d'une sélection de variétés anciennes provenant des vergers expérimentaux composés à 99,7 % de variétés qui ne possèdent pas de gènes majeurs de résistance aux maladies. Après une stratification humide de 90 jours à 5 °C, les pépins sont semés dans du terreau en serre à 20 °C.

Les plantules issues des semis clonaux de La Paix ont été inoculées avec une solution conidienne de tavelure (2×10^5 conidies/ml) au stade 3 feuilles déployées. Dans ce cas, les feuilles sont maintenues humectées durant 48 heures après l'inoculation, à une température de 20 °C.

La résistance à la tavelure des plantules inoculées artificiellement en serre est évaluée suivant l'échelle reprise au Tableau II. Les plantules des classes 0, 1 et 2 ont été plantées en champ sans aucune protection fongicide afin de contrôler leur sensibilité à la tavelure et d'évaluer leur sensibilité à l'oïdium.

L'évaluation en champ de la sensibilité des semis à la tavelure et à l'oïdium est effectuée à l'aide d'échelles allant de 0 à 5 [1] qui peuvent être aisément converties en cotes allant de 1 à 9 [13] suivant le système recommandé par l'IBPGR pour des raisons de facilité d'encodage [20].

Résultats et discussions

Réintroduction d'une sélection de variétés peu sensibles aux maladies dans le commerce des pépinières sous le signe « RGF » (Ressources Génétiques Fruitières)

Depuis 1985, 9 variétés de pommes, 4 de prunes et une de pêche sont commercialisées par la plupart des pépiniéristes belges multiplicateurs et sont essentiellement proposées au large public d'amateurs [15]. Ces variétés ont été sélectionnées pour leur faible sen-

Tableau II. Échelle de sensibilité à la tavelure *(Venturia inaequalis)*, utilisée après inoculation artificielle en serre, sur semis issus du croisement de géniteurs possédant une résistance de type polygénique.

Échelle d'observation	Observation
0	Aucun symptôme de tavelure
1	Quelques lésions avec sporulation très restreinte ne dépassant pas 10% de la surface foliaire ; parfois zones restreintes légèrement chlorotiques
2	Même type de réaction qu'à la classe 1 mais la surface sporulée peut atteindre 25 % de la surface foliaire ; aucune défoliation
3	Nombreuses lésions sporulées et étendues pouvant couvrir jusqu'à 75 % de la surface foliaire ; défoliation
4	Même symptôme qu'à la classe 3 mais la surface sporulée couvre de 75% à l'entièreté de la surface foliaire ; défoliation très importante

Les plantules des classes 0, 1 et 2 sont sélectionnées pour une évaluation au champ.

sibilité aux maladies, pour leur bonne fertilité, leur rusticité ainsi que la qualité et l'originalité de leurs fruits.

Sélection de variétés de pommes pour la transformation industrielle

A la demande d'une importante fabrique wallonne de cidre et de jus (Stassen) et en collaboration étroite avec elle, nous sélectionnons des variétés de pommes peu sensibles aux maladies, de bonne productivité et répondant aux normes technologiques de transformation (teneur en jus, en sucres, en acidité, en tanins, etc.). Ces sélections de variétés ont été multipliées dans nos pépinières et livrées à la firme qui a développé un verger expérimental de plus de un hectare. Ce verger permettra d'évaluer leurs caractéristiques phytotechniques en comparaison avec d'autres sélections étrangères. L'objectif est de développer, dans la région, la culture de variétés cidricoles, à jus ou mixtes, afin de répondre à un marché en expansion de produits de hautes qualités organoleptiques obtenus à partir de fruits ne nécessitant pas ou peu de traitements phytosanitaires.

Expérimentation de variétés de pommes pouvant convenir pour la production intégrée

Les variétés fruitières diffusées par la station ne sont qu'au stade « présélection » pour ce qui concerne la culture commerciale. Des essais complémentaires à plus grande échelle doivent être mis en place afin de caractériser et adapter la phytotechnie de ces variétés (choix du porte-greffe, distance de plantation, méthode de taille et d'éclaircissage, protection phytosanitaire, etc.), et d'éprouver les possibilités de commercialisation de ces variétés. Actuellement, un groupement d'arboriculteurs professionnels pratiquant la lutte intégrée en Wallonie (GAWI), associé au Centre Régional de Ressources Génétiques Nord-Pas-de-Calais (CRRG) dans un pacte transfrontalier, développe un

projet de plantation de 10 ha de pommiers de variétés de table, dont moitié en France et moitié en Belgique, et installés chez des arboriculteurs professionnels [9]. Ces vergers expérimentaux, gérés conjointement par les arboriculteurs et un technicien du pacte, seront composés pour plus de 70 % par 5 variétés RGF pour le côté belge.

Un essai comparatif d'une sélection de variétés RGF a été installé au printemps 1993 par notre station dans le but d'étudier leur phytotechnie dans une parcelle non traitée.

Essais multilocaux et implantations diverses de vergers

Dès 1987, des essais multilocaux ont été mis en place dans diverses régions pédo-climatiques du pays (Tableau III) afin de mettre en expérimentation des présélections de pommiers sur les porte-greffe M9, M26 et MM106. Ces essais visaient à évaluer le comportement de ces variétés en interaction avec le porte-greffe, le sol et le climat, et également à les observer sous une pression d'inoculum plus faible que dans les vergers d'évaluation de la station.

Tableau III. Essais de présélections de variétés de pommiers (Po), pruniers (Pr) et cerisiers (Ce) multilocaux (M), de démonstration (D) et à titre récréatif (R) ou historique (H).

Lieu	Administration responsable	Altitude (m)	Nombre de variétés	Porte-greffe	Surface (ha)
Ciney (M)	Administration Provinciale	300	24 (Po)	MM106 M26 M9	0,22
Gembloux (M)	École Technique Horticole	150	30 (Po)	MM106 M26 M9	0,24
Izel (M)	École Technique Horticole	300	33 (Po)	MM106	0,16
La Reid (M)	École Technique Horticole	350	23 (Po)	MM106	0,13
Liège (M)	École Technique Horticole	200	26 (Po)	MM106 M26 M9	0,23
Malines (M)	École Technique Horticole	10	24 (Po)	MM106 M26 M9	0,22
Tournai (M)	École Technique Horticole	50	14 (Po)	MM106	0,1
Neufchâteau (D et M)	Association de Naturalistes	500	31 (Po) 7 (Pr)	Semis MM111 MM106 St-Julien GF655/2	1,6
Jemelle (R et H)	Administration Régionale	360	12 (Po) 3 (Pr) 5 (Ce)	Semis St-Julien GF655/2 F12-1	± 0,5

Les données provenant de tels essais ne sont pas toujours exploitables à cause du manque de suivi de certains vergers. L'étude du comportement de ces variétés sur différents porte-greffes, notamment leur croissance et leur fertilité, pourra néanmoins nous donner de précieuses indications quant à l'adaptation aux porte-greffes et quant aux distances de plantation et au mode de conduite à adopter. D'éventuelles différences de sensibilité aux maladies dues aux conditions pédo-climatiques parfois marginales pourraient permettre de compléter nos propres observations à Gembloux. Et enfin, la rusticité des variétés vis-à-vis de climats plus rudes (par exemple, à 500 m d'altitude) peut être mise en évidence par ces essais.

Des études de création de vergers de types démonstratifs ou récréatifs nous ont également été demandées (Tableau III). Deux projets de création de vergers historico-culturels sont en cours, l'un dans le cadre de « Malagne La Gallo-Romaine », qui est un projet de reconstitution d'une villa gallo-romaine à Jemelle et l'autre au Musée de la Vie Rurale à St-Hubert. Ce dernier projet vise à implanter des variétés locales ou régionales dans un musée de plein air de l'habitat rural.

Amélioration du pommier : tests précoces de sélection des plantules résistantes à l'oïdium et à la tavelure

• *Oïdium*

La Figure 1 illustre l'évolution de l'effectif des classes de sensibilité à l'oïdium dans une même population de plantules issues de pollinisation libre de la variété Radoux (R1), observée durant quatre années en pépinière. La variation de sensibilité de cette population semble suivre partiellement celle de l'épidémiologie de la maladie. Celle-ci est illustrée par la moyenne des cotes d'intensité de l'oïdium de variétés témoin cultivées dans nos vergers d'évaluation durant la même période d'observation. Il semble important d'observer les populations de semis plusieurs années de suite afin d'effectuer la présélection sur base de la cote de sensibilité la plus élevée. Aucun semis ne se retrouve dans les classes 1-2 après ces quatre années d'observation.

Visser *et al.* [19] signalent que les semis rangés dans les classes de faible sensibilité peuvent être tolérés dans le cas d'une présélection. Nous présélectionnons les plantules qui appartiennent aux classes allant de 1 à 4 ; la classe 4 se caractérisant par la seule présence de symptômes d'infections secondaires et une très faible infection primaire sur les pousses feuillées.

Prenant la cote de sensibilité la plus élevée des quatre années d'observation comme base de référence, à peine 7,4 % des plantules R1 peuvent être présélectionnées pour ce critère.

Le Tableau IV donne la répartition entre les différentes classes de sensibilité à l'oïdum, de deux populations issues de pollinisation ouverte des variétés La Paix (LP) et Radoux (R2). La population LP et, dans une moindre mesure, la population R2 semblent donner une plus forte proportion de semis peu sensibles qu'en R1 (respectivement 31,4 %, 22,7 % et 7,4 %). Ces résultats sont préliminaires et devront être confirmés après quelques années d'observation supplémentaires.

Cette répartition semble correspondre à celle d'un caractère à hérédité quantitative [2].

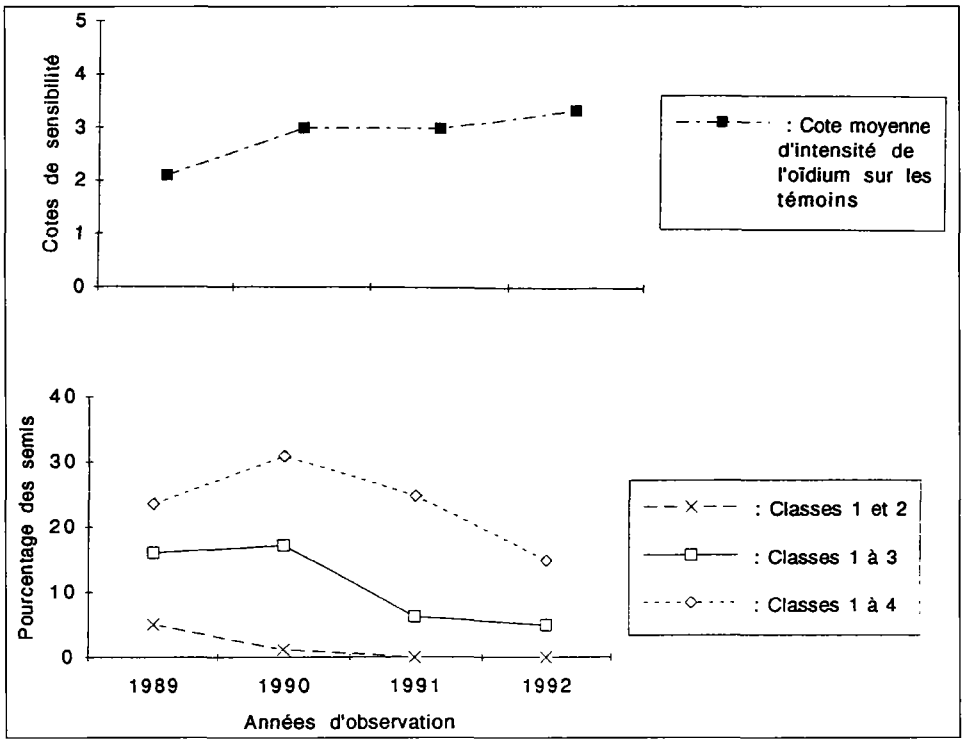


Figure 1. Évolution au champ de l'effectif des classes de sensibilité à l'oïdium *(Podosphaera leucotricha)* dans une population de semis issue de pollinisation libre de la variété Radoux durant la période 1989-1992. Comparaison avec l'évolution d'intensité moyenne de l'oïdium sur 20 variétés témoins du verger d'évaluation durant la même période d'observation. Nombre de plantules : 81.
Échelle de sensibilité : 1 = pas d'infection ; 9 = infection maximale.

Tableau IV. Répartition des plants de deux populations de semis issues de la pollinisation ouverte des variétés La Paix (LP) et Radoux (R2) en fonction de la sensibilité à l'oïdium *(Podosphaera leucotricha)* (années 1991 et 1992). Échelle de sensibilité : 1 = pas d'infection ; 9 = infection maximale ; n = nombre de plants de semis ; % = pourcentage de plants ; ( ) = nombre d'années d'observation.

Classes de sensibilité		1	2	3	4	5	6	7	8	9	Total
La Paix (LP) (1)	n	2	0	29	55	95	31	48	13	1	274
	%	0,7	0	10,6	20,1	34,7	11,3	17,5	4,7	0,4	100
Radoux (R2) (2)	n	2	1	12	45	73	45	45	39	2	264
	%	0,8	0,4	4,5	17	27,6	17	17	14,8	0,8	100

• ***Tavelure***

Ces mêmes populations évaluées pour leur sensibilité à l'oïdium ont également fait l'objet d'une sélection pour la résistance à la tavelure. Le Tableau V reprend la répartition des classes de sensibilité de ces populations concernant ce caractère. La population issue de la variété La Paix a subi un test d'inoculation artificielle en serre et a été ensuite observée au champ durant une année de croissance. Les deux populations issues de la variété Radoux (R1, R2) ont été directement évaluées au champ en condition d'inoculation naturelle durant respectivement 4 et 2 années de croissance. Seule la cote la plus élevée atteinte par un individu a été retenue pour l'élaboration de ce tableau.

La répartition des classes de sensibilité est conforme à celle d'un caractère sous contrôle polygénique, où une gradation continue suivant les classes de sensibilité est observée [19].

Les proportions de semis rangés dans les classes 1 et 2 pour les populations LP, R1 et R2 sont respectivement de 1,2 %, 1,2 % et 3,4 %. Une sensibilité à la tavelure pourrait être tolérée jusqu'à la classe 3, nous amenant à présélectionner les plantules rangées dans les classes 1, 2 et 3, ce qui porterait les pourcentages ci-dessus à 16,8 %, 6,1 % et 17,8 %.

Les résultats obtenus à partir des observations des populations LP et R2 devront être confirmés par des observations complémentaires.

• ***Sélection de plantules résistantes à la fois à la tavelure et à l'oïdium***

La Tableau VI donne le pourcentage de plantules obtenu pour différentes combinaisons de résistance en champs aux deux maladies.

Le pourcentage de semis rangés dans les classes 1 et 2 simultanément pour les deux maladies est quasi nul. Si on tolère une certaine sensibilité (classes 3 et 4) à l'oïdium en maintenant l'exigence de résistance à la tavelure (S1), on se rapproche des valeurs obtenues avec des progénitures de la variété Antonovka [19], qui sont très basses : 0,45 %, 0,77 % et 0,12 %, respectivement pour R1, R2 et LP. La variété Antonovka confère également une résistance à la tavelure à contrôle polygénique mais s'accompagne d'une faible qualité organoleptique [19, 21]. Tolérer les semis pouvant atteindre les cotes 3 ou 4 de sensibilité à la tavelure (S2) est une approche à débattre.

En utilisant des gènes majeurs de résistance à la tavelure, comme le gène *Vf,* et à l'oïdium, comme les gènes Pl_1 et Pl_2, les pourcentages de semis résistants aux deux maladies peuvent s'approcher de 16 % à 20 % [5, 6, 8], ce qui est au minimum trente fois supérieur à ceux obtenus à partir de la résistance polygénique. La voie monogénique offre néanmoins le désavantage, partant de géniteurs sauvages ou botaniques, de nécessiter plusieurs rétrocroisements afin d'améliorer les caractères agronomiques [11]. Plus important encore est le fait que la stabilité dans le temps de ce type de résistance n'est pas toujours assurée [12]. La combinaison d'une résistance polygénique et d'une ou plusieurs résistances mono ou oligogéniques semble par contre être une voie prometteuse [8, 11].

Ces résultats préliminaires ne peuvent servir que de valeur indicative pour une orientation dans le choix de géniteurs car ils sont basés sur des pollinisations ouvertes. Nos résultats futurs à partir des croisements dirigés pourront nous donner des indications plus précises sur cette question.

Tableau V. Répartition des plants de trois populations de semis issus de la pollinisation ouverte des variétés La Paix (LP) et Radoux (R1 et R2) en fonction de la sensibilité à la tavelure *(Venturia inaequalis).* Échelle de sensibilité : 1 = pas d'infection ; 9 = infection maximale ; n = nombre de plants de semis ; % = pourcentage de plants ; ( ) = nombre d'années d'observation.

Classes de sensibilité		1	2	3	4	5	6	7	8	9	Total
La Paix (LP) (2)	n	2	1	42	53	80	54	29	8	0	269
	%	0,7	0,4	15,6	19,7	29,7	20,1	10,8	3	0	100
Radoux (R1) (4)	n	0	1	4	22	35	17	2	0	0	81
	%	0	1,2	4,9	27,2	43,2	21	2,5	0	0	100
Radoux (R2) (2)	n	0	9	38	81	69	49	18	0	0	264
	%	0	3,4	14,4	30,7	26,1	18,6	6,8	0	0	100

Tableau VI. Pourcentage de semis combinant différents niveaux de résistances à la tavelure et à l'oïdium. Échelle de sensibilité : 1 = pas d'infection ; 9 = infection maximale ; ( ) : nombre d'années d'observations ; S : somme.

Classes de sensibilité	Tavelure / Oïdium	1-2		S 1	3		S 2	Total
		1-2	3-4		1-2	3-4		S 1 + S 2
Radoux (R1) (4)		0,00	0,45	0,45	0,00	2,01	2,01	2,46
Radoux (R2) (2)		0,04	0,73	0,77	1,73	3,10	4,83	5,60
La Paix (LP) (2)		0,01	0,11	0,12	0,11	4,79	4,9	5,02

Conclusions

Les sélections de variétés peu sensibles aux principales maladies, réalisées à partir de nos ressources génétiques fruitières, ouvrent des perspectives dans des domaines très variés et connaissent déjà dans la pratique des applications très encourageantes.

Outre la valorisation directe de ces variétés anciennes, l'étude de la descendance de certaines variétés sélectionnées pour leur faible sensibilité aux maladies peut offrir la possibilité de les utiliser comme géniteurs dans un programme d'amélioration basé sur la résistance à la tavelure et à l'oïdium sous contrôle polygénique.

Références

1. Bauvin JP, Lateur M, Populer C (1987). La résistance aux maladies chez les anciennes variétés d'arbres fruitiers : évaluation et valorisation commerciale. *Meded Fac Landbouwwet Rijksuniv Gent* 52 : 763-769.
2. Brown AG (1959). The inheritance of mildew resistance in progenies of the cultivated apple. *Euphytica* 8 : 81-88.
3. Crosby JA, Jannick J, Pecknold PC, Korban SS, O' Connors PA, Ries SM, Goffreda J, Voordeckers A (1992). Breeding Apples for Scab resistance : 1945-1990. *Fruit Varieties J* 46 : 145-166.
4. Goddrie PD (1992). Gangbare rassen vatbare voor schimmelziekten. *Fruitteelt* 53 : 20, 21.
5. Knight RL, Alston FH (1972). Progress at East Malling in breeding for resistance to apple mildew, *Podosphaera leucotricha. Jugoslav Vocarstvo* 5 (17-18) : 317-324 (Traduction anglaise).
6. Krüger J (1983). Sources of resistance to apple scab *(Venturia inaequalis)* used at the Federal Research Centre for Horticultural Plant Breeding at Ahrensburg. La résistance aux maladies, composante de la lutte intégrée en vergers. *OILB-WPRS Bull* VI/4 : 123-128.
7. Lateur M, Populer C (1994). Fruit tree genetic resources in Belgium : screening for disease resistance and other desirable characteristics. *Euphytica* (sous presse).
8. Lespinasse Y (1989). Breeding pome fruits with resistance to diseases. Genes, résistance mechanisms, present work and prospects. In : *OILB Working Group Integrated Control of Pome Fruit Diseases.* WPRS Bull/XII/6, vol. 11 : 100-115.
9. Marc Ph (1993). Développement de la lutte intégrée en verger de pommiers résistants aux maladies cryptogamiques – Coopération Transfrontalière Wallonie/Nord-Pas-de-Calais. *Le Fruit Belge* 443 : 82-83.
10. Moore JN, Ballington JR (1990). *Genetic resources of temperate fruit and nut crops.* Tome 1. ISHS, Wageningen.
11. Olivier JM, Lespinasse Y (1982). Résistance du pommier à la tavelure *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. : sources de résistance, comportement du parasite, programme de sélection. *Cryptog Mycol* 3 : 361-375.
12. Parisi L, Lespinasse Y, Guillaume J, Krüger J (1993). A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the *Vf* gene. *Phytopathology* 83 : 533-537.
13. Populer C, Delmotte C, Bauvin JP (1985). Évaluation de la résistance aux maladies chez les anciennes variétés fruitières en Belgique. ACFEV & BRG *J Agricul Trad Botan Appli :* 131-137. Paris.
14. Populer C, Bauvin JP, Lateur M (1989). La réintroduction de variétés anciennes d'arbres fruitiers dans le commerce des pépinières. *Rev Agric* 42 : 113-124.
15. Populer C, Lateur M (1990). Variétés fruitières anciennes et résistance aux maladies : comportement des variétés de pommiers et de pruniers RGF recommandées aux pépiniéristes. *Meded Fac Landbouwwet Rijksuniv Gent* 55 (3a) : 851-858.
16. Populer C, Lateur M (1993). Sauvegarde et valorisation des ressources génétiques fruitières. *Annales de Gembloux* 99 : 97-107.
17. Van der Scheer HATh (1988). Susceptibility of apple cultivars ans selections to scab and powdery mildew in The Netherlands. In : *OILB Working Group Integrated Control of Pome Fruit Diseases.* WPRS Bull/XII/6, vol. II : 205-211.
18. Van Melckebeke J (1990). La lutte intégrée permet-elle de limiter l'utilisation de produits phytopharmaceutiques ? *Agricontact* 23 : (IIa) 1-5.
19. Visser T, Verhaegh JJ, De Vries DP (1974). Resistance to scab *(Venturia inaequalis)* and mildew *(Podosphaera leucotricha)* and fruiting properties of the offspring of the apple cultivar Antonovka. *Euphytica* 23 : 353-364.
20. Watkins R, Smith RA (1982). *Descriptor list for apple (Malus).* CEC Secretariat, Brussels & IBPGR Secretariat, Rome.
21. Kellerhals M (1989). Breeding of some fruits with stable resistance to diseases. Development of desease resistant some fruit varieties. In : OILB Working Group Integrated Control of some Fruit Diseases. WPRS Bull/XII/6, vol. 11 : 116-129.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1995, pp. 123-129.

13

Ressources génétiques et amélioration des plantes

M. EL GAZZAH, N. CHALBI

Laboratoire de Génétique et Biométrie, Faculté des Sciences Tunis, Tunisie.

Résumé

Bien que posé depuis déjà une vingtaine d'années, le problème de la gestion des ressources génétiques préoccupe encore de nombreux pays. Peu de stratégies ont réellement abouti à des solutions définitives. Cela est généralement lié à une mauvaise adaptation des solutions appliquées aux conditions locales des pays considérés (manque de formation dans le domaine des sciences de la nature ou/et moyens technologiques très limités ou souvent inexistants). Pour les pays en voie de développement comme la Tunisie, toute stratégie de gestion des ressources génétiques se doit d'être liée aux impératifs d'un développement durable, favorable à une évolution équilibrée des écosystèmes. Ainsi, après l'analyse de la situation relative aux ressources génétiques, nous proposons une approche de gestion et d'exploitation de ces ressources, en tenant compte des besoins d'un développement intégré et en rapport avec les moyens technobiologiques dont peuvent disposer des pays comme la Tunisie.

Il est maintenant bien établi que les ressources génétiques végétales s'amenuisent çà et là et que la situation actuelle est remarquablement inquiétante pour de nombreux pays. Une action importante est indispensable, surtout au niveau des régions supposées à haut risque où l'appauvrissement génétique est aujourd'hui une réalité, entraînant dans un bon nombre de situations la disparition de plusieurs espèces végétales, certaines encore peu connues.

Toute stratégie de lutte contre une telle érosion génétique, surtout dans les régions cibles, devrait reposer sur une bonne définition de la structure floristique de ces

régions, mais aussi sur l'analyse des interactions qui existent dans un écosystème, entre les différentes composantes, tels les ressources génétiques, les facteurs abiotiques et les effets de l'action anthropique.

Il s'agit donc de parvenir à la mise au point d'un programme efficace de gestion et d'exploitation du « patrimoine génétique », sur les plans local, régional, voire international, compte tenu des exigences réelles et le plus souvent contradictoires des éléments en présence, classés selon les deux catégories suivantes :

– exigences humaines : croissance démographique et développement socio-économique ;

– exigences écologiques : protection et accroissement de la biodiversité et équilibre multidimensionnel de l'écosystème.

Il est évident de signaler que l'importance de l'antagonisme entre ces deux catégories d'exigences est à la mesure du degré de développement socio-économique des populations humaines concernées.

Dans ce qui suit, nous allons d'abord indiquer les causes de l'érosion des ressources phytogénétiques en Tunisie. Nous présenterons ensuite une nouvelle approche quant à « la protection et la gestion de ces ressources ». Nous réserverons la dernière partie de ce texte à la discussion d'une stratégie d'exploitation « équilibrée » de ces ressources, en relation avec la préservation de la biodiversité en rapport avec les exigences socio-économiques de la population humaine, dans le contexte de la Tunisie.

Érosion des ressources phytogénétiques en Tunisie

Diversité des systèmes écologiques

D'une superficie limitée (162 154 km^2) dont 37 % à vocation agricole, la Tunisie est caractérisée par une variation écogéographique remarquable. L'examen de la carte bioclimatique [9] montre, en effet, la diversité des zones bioclimatiques. Les zones semi-aride, aride et saharienne couvrent environ 93 % de la superficie du pays (respectivement 42 %, 33 % et 18 %), alors que les zones subhumide et humide sont limitées seulement à 4 % et 3 %.

Les ressources phytogénétiques présentent une distribution liée aux conditions bioclimatiques [10, 11]. Ainsi, la flore tunisienne est représentée par 2 103 espèces végétales environ, dont 400 espèces rares ou très rares. Les familles des composées, papilionacées, graminées et crucifères représentent 66 % des espèces (respectivement 22 %, 18 %, 17 % et 9 %). Ces ressources sont concentrées surtout dans la moitié nord du pays, à cause de conditions écologiques plus favorables. Cependant, le Sud tunisien reste d'un intérêt évident, quant à la valeur génétique des espèces végétales caractéristiques, remarquablement bien adaptées aux zones arides et particulièrement celles qui sont adaptées aux milieux spécifiques que sont les oasis dans le sud du pays.

Désertification

La désertification est un phénomène qui progresse à partir du sud et menace le nord du pays. En réalité, même dans le nord, il existe des foyers de désertification ayant un effet direct sur l'amenuisement des ressources phytogénétiques. Les causes sont multiples et agissent conjointement :

Pression démographique et augmentation de la demande

La population tunisienne est de 8,5 millions d'habitants environ dont 58 % sont concentrés dans les grandes villes. Cette population atteindra les 12 millions d'habitants vers l'an 2010, dont 70 % seront dans les villes. Bien que le taux d'accroissement est maintenant de l'ordre de 2 %, il reste évident que la pression démographique entraîne une augmentation des besoins nutritionnels. Ces exigences nécessitent d'envisager, parmi les solutions, une augmentation de la production agricole, en relation avec l'objectif primordial que s'est fixé le pays, celui de l'autosuffisance alimentaire.

Dégradation et essai de développement de la nappe forestière

La nappe forestière joue un rôle remarquable dans la protection de la biodiversité. Avec trois millions d'hectares de forêts à l'époque romaine, mais seulement un tiers de million d'hectares en 1956 (soit 4 % des terres non désertiques), la situation de la nappe verte était devenue à l'époque inquiétante. Toutefois, une trentaine d'années après l'indépendance, la forêt tunisienne couvre environ deux tiers de million d'hectares. Cependant, avec la poursuite des efforts de reforestation entrepris depuis, l'objectif reste celui d'atteindre vers l'an 2000 un couvert forestier de l'ordre de 1,5 million d'hectares.

Érosion des sols

Les sols sont soumis en Tunisie à une forte érosion sous l'effet de facteurs divers (déforestation, ruissellement, vent, etc.). Il est important de signaler la disparition chaque année de 10 000 ha environ de terres agricoles qui donne à ce problème une dimension particulière (trois millions d'hectares sont réellement exposés à ce risque).

Introduction d'espèces végétales à « haut rendement »

Il est bien établi que les introductions de variétés améliorées entraînent souvent, à court ou à long terme, une érosion génétique des ressources locales, particulièrement au niveau des plantes allogames. Ainsi donc, un grand problème se pose pour les populations humaines installées dans des régions historiquement connues pour leurs ressources génétiques traditionnelles. Dans ces régions, une érosion massive et accélérée entraîne la disparition de nombreuses espèces végétales bien adaptées aux conditions locales du milieu, généralement peu favorables aux génotypes introduits en Tunisie pour leur haut rendement.

Gestion des ressources phytogénétiques : une nouvelle approche

Après l'indépendance, le pays a été l'objet d'un grand nombre d'introductions de semences, aussi bien au niveau de la production céréalière qu'au niveau des plantes vivrières et sylvo-pastorales. De nombreux essais de comportement ont été entrepris en vue de valoriser les végétaux introduits. Cela a eu pour effet d'entraîner une érosion génétique importante qui s'est déjà manifestée par la disparition d'écotypes locaux et de cultivars traditionnels dont l'intérêt est considérable (blé, orge, luzerne, etc.).

Ainsi donc, le problème de la gestion des ressources phytogénétiques reste posé. Les tentatives entreprises jusqu'alors ne semblent pas cadrer d'une manière générale avec les conditions locales des pays concernés comme dans le cas de la Tunisie

(manque de formation dans le domaine des sciences de la nature, moyens technologiques très limités ou souvent inexistants). En Tunisie, une prise de conscience se fait sentir depuis déjà quelques années. En effet, les problèmes de l'environnement préoccupent de plus en plus l'ensemble de la population, à différents niveaux. Pour des pays en voie de développement, une stratégie de gestion des ressources phytogénétiques devrait être liée aux impératifs d'un développement durable. Aussi, une approche nouvelle de gestion de ces ressources tenant compte des besoins d'un développement intégré s'impose-t-elle [6]. Une telle approche devrait reposer sur les deux composantes stratégiques essentielles :

Protection des ressources phytogénétiques dans leurs milieux naturels, au niveau des écosystèmes

Il s'agit de définir une politique d'information et de formation à court, moyen et long terme. Elle aura pour objectif de montrer l'importance des ressources phytogénétiques locales et les méthodes de préservation et de conservation. Elle permettrait de réaliser un comportement socio-écologique responsable, fondé sur l'amour de la nature et la protection des richesses génétiques.

Approche écotechnologique d'appui

Parallèlement à cet aspect « socio-écologique » fondamental, une approche écotechnologique complémentaire est nécessaire et intégrera les éléments suivants :

– zones protégées écogéographiquement spécialisées et bien intégrées dans les régions bioclimatiques du pays ;

– jardins botaniques dans toutes les zones bioclimatiques ;

– espaces verts et développement de la végétation forestière ;

– contrôle des introductions génétiques ;

– recherche et protection des cultivars traditionnels ;

– recherche analytique et valorisation des « savoir-faire » populaires dans les domaines de la protection et de l'utilisation des ressources génétiques locales ;

– création de variétés améliorées locales, bien adaptées mais présentant une identité génétique certaine ;

– maîtrise réelle des biotechnologies pour une meilleure analyse des flux géniques en relation avec l'équilibre écogéographique.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?

Civilisation agricole et civilisation du gène

La révolution néolithique a installé, sur plusieurs milliers d'années, une civilisation agricole. Ainsi, de nombreuses espèces végétales furent domestiquées, améliorées et mises au service de l'Homme. Aujourd'hui, on peut dire qu'une civilisation du gène est née, utilisant des biotechnologies de plus en plus précises. Cette nouvelle situation pourrait être appelée à modifier complètement les facettes de la civilisation agricole et dans un temps relativement court. Les banques de gènes et les enceintes climatisées de multiplication des souches tissulaires et cellulaires remplaceront-elles les écosystèmes,

les grandes superficies de multiplication et de production des semences et les méthodes de sélection classique ?

Qu'en sera-t-il pour les ressources phytogénétiques ?

Une approche intégrée « socio-écotechnologique » est nécessaire pour lutter contre l'appauvrissement génétique et contribuer efficacement à une gestion équilibrée des ressources végétales. En effet, l'utilisation des biotechnologies ne peut se concevoir à elle seule en dehors d'une stratégie efficace de gestion équilibrée de ces ressources, dans leurs milieux naturels. Ainsi donc, des programmes de recherches visant à identifier ces phyto-ressources et à définir les meilleures méthodes de leur protection nous paraissent indispensables avant toute tentative d'utilisation de ces ressources par voie biotechnologique.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?

L'amélioration des plantes a toujours eu pour objectif essentiel la création de variétés à haut rendement ou ayant une caractérisation spécifique comme la résistance à une maladie, au stress hydrique, salin, etc. L'utilisation de ces variétés a entraîné dans beaucoup de cas la disparition de cultivars traditionnels maintenus jusqu'alors en culture. L'introduction de ces variétés dans des régions écogéographiquement défavorables a le plus souvent montré leur faible valeur adaptative, en relation avec leur forte homogénéité génotypique. Dans une autre mesure, l'amélioration des plantes devrait à l'avenir viser l'obtention de variétés présentant une bonne souplesse adaptative, localement performantes et fortement intégrées dans l'écosystème (conservation de la biodiversité). Pour cela, l'intervention d'équipes pluridisciplinaires reste indispensable (généticiens, écologues, physiologistes, botanistes, biochimistes, biométriciens, etc.). Dans une telle approche, tout programme d'amélioration des plantes reposerait sur la stratégie suivante :

Identification des ressources phytogénétiques locales

De nombreuses espèces végétales autochtones ont déjà disparu ou sont très menacées. Dans ce domaine, les statistiques peuvent être trompeuses. En effet, seules sont indiquées les espèces ayant fait l'objet d'une étude particulière. Très nombreuses sont les espèces disparues ou en train de le devenir, mais non recensées dans les prospections déjà entreprises, parce que sans intérêt dans les objectifs immédiats. Par ailleurs, des cultivars traditionnels remarquablement adaptés aux conditions locales de l'environnement [1] ont été abandonnés par les paysans et remplacés par des variétés supposées à haut rendement. L'identification des ressources locales repose essentiellement sur :

– l'étude de la répartition écogéographique des populations naturelles [3] : il s'agit de l'analyse de la variabilité inter et intra-populations, à travers des critères morphologiques ou/et biochimiques. L'utilisation des marqueurs moléculaires est d'un apport considérable [7, 8] mais reste liée aux moyens technobiologiques, quelquefois difficiles à réunir dans des pays comme la Tunisie ;

– la définition des flux géniques par l'examen des caractéristiques du système de reproduction sexuée, dans les conditions naturelles de pollinisation [2, 5], par les méthodes de l'analyse génétique classique, moins onéreuses ;

– l'examen des conséquences de l'amélioration « traditionnelle » des plantes par la prospection et la collecte des cultivars encore disponibles ;

– l'élargissement de la variabilité génétique par l'acquisition de nouvelles ressources et l'enrichissement des collections existantes.

Définition d'une stratégie appropriée d'amélioration des plantes

Certes, l'accès aux biotechnologies a modifié de façon évidente les méthodes de la création variétale. En effet, des marqueurs moléculaires s'ajoutent aux marqueurs classiques et permettent de réaliser des contrôles et des identifications rapides et précis des génotypes. Cependant, les équipements, comme on le sait déjà, sont onéreux et exigent une technicité particulière qui n'est pas encore à la portée d'un bon nombre de laboratoires des pays en voie de développement. Il demeure donc indispensable, là même où ces moyens ne sont pas encore disponibles, de continuer à progresser à l'aide des méthodes classiques de l'amélioration des plantes. C'est à ce titre-là que différents programmes d'analyse de la diversité génétique aux niveaux de populations naturelles, tout comme pour des cultivars, continuent à progresser par l'utilisation des voies de l'exploration génétique classique, comme c'est le cas dans les programmes suivants, dans notre laboratoire :

– l'étude du système de reproduction sexuée de populations naturelles et de cultivars chez *Hedysarum coronarium* L. Deux marqueurs sont utilisés : le port « prostré-érigé » des plantes et la « présence-absence » d'anthocyanes [5] ;

– l'analyse du polymorphisme génétique chez *Vicia faba* L. par l'utilisation de marqueurs simples comme la couleur du hile, la couleur des graines, la « présence-absence » d'anthocyanes sur les tiges [2] ;

– l'étude de la diversité génétique par l'analyse de la répartition géographique et des adaptations au niveau du genre *Atriplex* L. en Tunisie [3].

Conclusion

Ainsi donc, une stratégie d'amélioration des plantes appropriée reposera sur :

– une bonne connaissance biologique des ressources phytogénétiques considérées (populations autochtones, cultivars, collections diverses). Dans ce domaine, les méthodes biotechnologiques très variées [4] sont d'un apport considérable et peuvent être utilisées, compte tenu des moyens disponibles ;

– une définition précise des objectifs de la sélection (caractéristiques génétiques des biotypes, souplesse adaptative), en relation avec les moyens techniques disponibles ;

– les conséquences de cette opération de sélection sur la biodiversité (relations « biotopes-cultivars-populations »).

Les efforts pour mener à bien une telle stratégie dans les pays en voie de développement, comme c'est le cas de la Tunisie, devront considérer les deux axes essentiels suivants :

• ***protection des ressources génétiques dans leurs milieux naturels :*** définir une politique de formation à court, moyen et long terme, pour montrer l'importance des ressources génétiques locales et bien asseoir les méthodes de préservation et de conservation et mener une recherche d'analyse et de valorisation des « savoir-faire » populaires dans les domaines de la protection et de l'utilisation de ces ressources,

• ***approche écotechnologique d'appui,*** en vue d'intégrer les éléments suivants :

– recherche et préservation des cultivars traditionnels ;

– définition des systèmes de reproduction des espèces à améliorer, dans les conditions naturelles ;

– analyse de la diversité génétique au niveau des complexes d'espèces et enrichissement des collections ;

– maîtrise réelle des biotechnologies pour une exploration approfondie du polymorphisme génétique dans ces collections.

Références

1. Beninga M (1992). Évaluation et utilisation des ressources génétiques des mils et des sorghos. Collecte et valorisation des formes sauvages. In : *Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes.* Éd Lavoisier-Technique et Documentation : 73-86.
2. Ben Fadhl-Haffani ZY (1993). Le polymorphisme génétique chez *Vicia faba* L. ; définition et exploitation. DEA, Fac. Sc. Tunis, 87 p.
3. Bezzaouia A (1993). Diversité génétique, répartition et adaptations au niveau du genre *Atriplex* L. ; cas d'espèces de Tunisie. DEA, Fac. Sc. Tunis, 98 p.
4. Demarly Y, Sibi M (1989). Amélioration des plantes et biotechnologies. John Libbey Eurotexte, Science en marche, 152 p.
5. El Gazzah M (1992). Contribution à l'étude du système de reproduction sexuée de populations de Sulla *(Hedysarum coronarium)* ; conséquences sur la structure génétique. Thèse de Doctorat d'État, Fac. Sc. Tunis, 284 p.
6. El Gazzah M (1992). Ressources génétiques et développement : une nouvelle approche. *The North African environnement at risk : environment sustainability and economic development.* Tanger, Morocco, American Legation Museum, 21-26 June.
7. Friar E, Kochert G (1991). Bamboo germplasm screening with nuclear restriction fragment polymorphism. *Theor Appl Genet* 82 : 697-703.
8. Leonardi A, Damerval C, Hebert Y, Gallais A, de Vienne D (1991). Association of protein amount polymorphisms (PAP) among maize lines with performances of their hybrids. *Theor Appl Genet* 82 : 552-560.
9. Le Floc'h E, Carrière A, Nabli MA (1986). Carte bioclimatique de la Tunisie (Échelle : 1/1 000 000).
10. Nabli MA (1991). Diversité floristique en Tunisie. In : *Conservation des ressources végétales, Actes Éditions :* 51-52.
11. Nabli MA (1991). Ressources végétales en Tunisie : évaluation, valorisation et conservation. In : *Conservation des ressources végétales.* Actes Éditions : 53-58.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1995, pp. 131-137.

14

Amélioration de la tomate pour la résistance au flétrissement bactérien provoqué par *Pseudomonas solanacearum*

E. NSIKA-MIKOKO

Département de Biologie et Physiologie végétales, Faculté des Sciences, Brazzaville, Congo.

Résumé

L'amélioration de la tomate pour la résistance aux maladies, et particulièrement le flétrissement bactérien provoqué par Pseudomonas solanacearum *par la voie classique des hybridations, permet d'obtenir des résultats qui satisfont aux exigences de la culture en sols contaminés pendant au moins deux cycles de culture.*

Du fait de la ségrégation de l'hybride, les caractères parentaux réapparaissent et le nombre d'individus présentant la résistance se réduit au cours des générations.

Après avoir fait le point sur l'un des systèmes de culture qui permet, dans les conditions de culture paysannes, d'atténuer les effets du flétrissement, il a été envisagé l'utilisation de la voie biotechnologique, en espérant obtenir des variants somaclonaux présentant une tolérance qui pourrait se conserver à travers le passage par la méiose.

Sur des cals obtenus par mise en culture des cotylédons excisés des jeunes plants de tomate, des bactéries appartenant à une souche de Pseudomonas solanacearum *ont été inoculées avant la formation des racines ; des tests effectués sur les plantes régénérées et sur le terrain montrent une conservation du caractère tolérance obtenue.*

Depuis qu'il s'est organisé en communautés sédentaires pratiquant l'agriculture, l'homme, de manière empirique d'abord, puis en utilisant les données scientifiques ensuite, a toujours œuvré pour l'augmentation de la productivité des agroécosystèmes :

– en choisissant dans les populations naturelles les plantes les plus productrices et surtout aptes à produire dans différentes conditions de culture ;

– en protégeant les semences en les conservant dans des silos clos ou des greniers enfumés ;

– en utilisant des plantes à cycles courts qui arrivent à maturité avant la période de grande multiplication du parasite.

Avec la naissance de la lutte chimique, suite aux expériences de l'abbé Pluchet [6], les plantes ont été traitées en période végétative, pour prévenir les maladies, pour arrêter la progression d'une épidémie ou en retarder l'évolution à partir des molécules qui bloquent la croissance ou qui tuent les ennemis de culture. Mais malgré l'abondance des molécules actives que la chimie des pesticides a pu mettre sur le marché, il reste des agents pathogènes pour lesquels aucun produit ne permet une éradication efficace. C'est le cas de certaines bactérioses et en particulier celle provoquée sur la tomate par *Pseudomonas solanacearum.*

Bien que, dans les conditions de culture paysannes, il existe des techniques culturales permettant d'obtenir des productions appréciables, et que les progrès en génétique mettent de temps en temps au point des variétés hybrides, il serait préférable de disposer des variétés présentant une tolérance durable à ce fléau, pour produire la tomate dans toutes les conditions de culture en sols contaminés.

Depuis une dizaine d'années, un recours constant est fait aux biotechnologies dans la résolution des problèmes qui se posent en phytopathologie et en amélioration des plantes [8, 9].

Dans la recherche de la variété tolérante (voire résistante), la culture *in vitro* a été pratiquée en référence aux travaux de Sibi [19], Nsika-Mikoko [14], Chagvardieff [5], Demarly [8], Aaouine [1], Chlyah [7] et Nsika-Mikoko [17].

Pour rendre sélective cette variabilité, il a été procédé à des inoculations des bactéries sur les cals avant la formation des racines sur le milieu artificiel.

Symptômes et distribution de la bactériose au Congo

Symptômes

L'apparition des symptômes se fait par étapes progressives. Dans un premier temps, il y a ramollissement puis recourbement vers le bas de certaines feuilles ou moitiés de feuilles vertes aux heures les plus chaudes de la journée, puis le flétrissement gagne l'ensemble des feuilles ; la plante continue à végéter mais avec une croissance fortement freinée [4]. Ce flétrissement se poursuit jusqu'à ce que les feuilles jaunissent puis sèchent.

L'élimination de l'écorce de la tige laisse entrevoir un brunissement des tissus. Au niveau du collet, apparaissent des protubérances qui sont des ébauches de racines avortées d'environ 1 mm de diamètre [11]. L'apparition de ces protubérances correspond à une réaction de défense, mais tardive, de l'hôte, par suite de l'obturation des faisceaux.

Distribution de la maladie au Congo

En pratique, toutes les régions congolaises sont touchées par les dégâts causés par le flétrissement bactérien dû au *Pseudomonas solanacearum ;* on le rencontre dans les régions :

– des Plateaux, sur la pomme de terre, le tabac et la tomate ;

– de la Bouenza, sur la totalité des solanacées et sur l'arachide [15] ;

– du Niari, du Pool, de la Lékoumou et de Brazzaville, sur toutes les solanacées en général [21].

Les données sur la distribution du flétrissement sont résumées dans la Figure 1.

Une technique culturale permettant de contourner efficacement les dégâts du flétrissement bactérien

Pendant la préparation du terrain qui commence très tôt au mois de juillet pour les prochains semis d'octobre, l'herbe coupée à la houe ou à la pelle est mise à sécher, placée suivant la forme d'un grand matelas de 2 à 3 mètres de longueur, 1 à 1,50 m de largeur et 50 à 70 cm de hauteur, sur lequel on étale tous les débris d'herbe.

A la fin, autour des planches rectangulaires décrites précédemment, on creuse la terre pour en déposer une couche de 10 à 15 cm répartie régulièrement sur tout le matelas des débris herbacés. On y met le feu qui brûle à l'étouffée pendant longtemps, permettant une pénétration de la chaleur jusqu'à une certaine profondeur dans le sol.

Avec l'arrivée de la saison des pluies d'octobre ou même de novembre, les planches sont retournées en vue de mélanger les cendres et le sol et, à ce stade, elles sont prêtes à recevoir les semis. Cette méthode permet, en sols reconnus infestés, de réussir la culture sans qu'il y ait manifestation des symptômes de flétrissement bactérien ; mais elle présente l'inconvénient majeur de laisser pendant longtemps le terrain en jachère : le temps que l'herbe repousse.

Or, dans la pratique des cultures intensives, les mêmes planches doivent être retournées plusieurs fois dans l'année, et l'herbe à brûler manque souvent après la première défriche. C'est une des raisons qui conduit à la recherche d'une tolérance, voire d'une résistance durable, comme une solution pour les cultures à venir.

Données expérimentales et résultats

Matériel et méthodes

Sur les jeunes plants de trois variétés de tomate dont les caractéristiques ont été décrites [16], des cotylédons ont été excisés et mis en culture *in vitro* sur un milieu de culture synthétique [12]. Des cals ont pu être obtenus dans des conditions axéniques, les repiquages se faisant tous les 15 jours, d'une part ; d'autre part, nous avons, à partir d'une tige de plante infectée par la bactérie *Pseudomonas solanacearum,* isolé la bactérie qui a été caractérisée de la manière suivante : c'est une bactérie dont le métabolisme respiratoire est oxydatif, elle possède une catalase, ne produit pas de levane et n'hydrolyse pas l'amidon. La réaction d'hypersensibilité sur le tabac donne une réponse positive au bout de 24 heures [3, 16]. L'isolat a été conservé dans des conditions permettant le maintien du pouvoir pathogène.

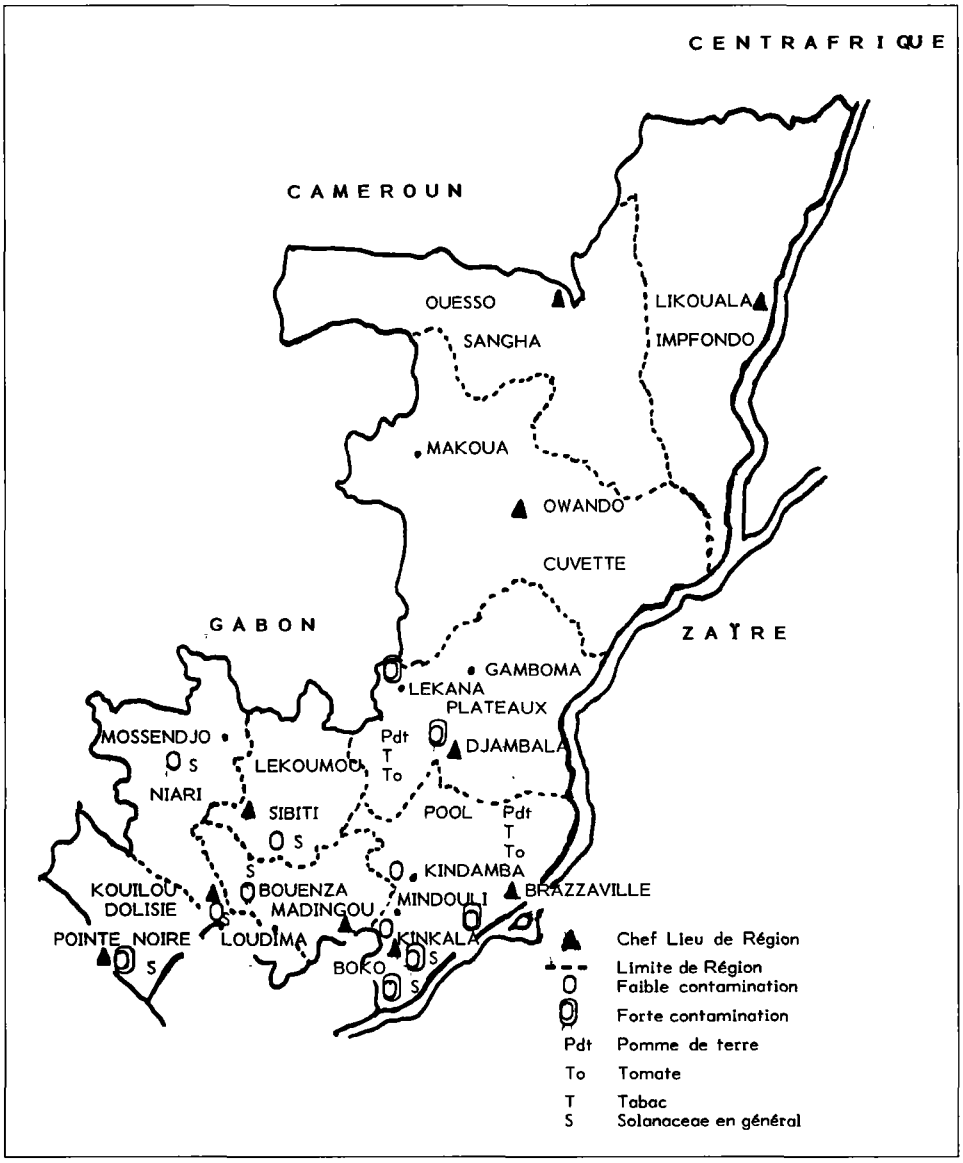


Figure 1. Zones où le flétrissement bactérien a été recensé au Congo.

Préparation de la dilution bactérienne et inoculations

Les bactéries cultivées en boîtes de Pétri sont prélevées avec une anse de platine et diluées dans de l'eau distillée stérile ; la solution est titrée de manière à obtenir une concentration de plus de 5 000 bactéries au ml [2, 13].

Pour les inoculations des cals, 1 ml de la solution décrite plus haut est prélevé dans une seringue et injecté dans le cal qui a déjà initié des bourgeons.

Pour l'inoculation des plantes en terre, la même quantité de la suspension bactérienne est déposée à 2 endroits diamétralement opposés, au niveau des premières racines sous le collet ; ce, après avoir réalisé une entaille dans l'écorce de la plante à inoculer.

Résultats

Plusieurs plantes ont pu être régénérées à partir des milieux ne contenant pas de bactéries ; la variation qui se produit s'exprime surtout sur les caractères morphologiques, à savoir : opposition des feuilles 3 et 4, se traduisant par l'absence d'un entrenœud et qui conduit à des plantes plus courtes par rapport au phénotype normal, cela pour la variété TM103. En présence des bactéries, sept plantes seulement ont été régénérées, à partir des cals de la variété locale (5) et la variété PT778 (2).

Ces plantes régénérées ont été mises en terre puis multipliées par bouturage avant leur mise à fleurs. Le Tableau I indique les principaux résultats obtenus sur la régénération.

Tableau I. Résultats des régénérations après inoculation des bactéries.

Variétés	TC103	PT778	Local My 104
Nombre des repiquages	1 5 8	1 5 8	1 5 8
Nombre de plantes régénérées (témoins)	36 43 21	28 35 17	19 15 23
Nombre de plantes régénérées en présence des bactéries	– – –	– 2 –	– – 5

Après la mise à fruits, les graines ont été prélevées et mises en terre dans les conditions naturelles de culture. Au stade 7 feuilles, des inoculations artificielles ont été réalisées. Sur les descendances par autofécondation des plantes régénérées en présence des bactéries, et jusqu'au stade premier bouquet floral (qui est en général le stade d'apparition des symptômes du flétrissement bactérien), nous n'avons noté aucun signe de flétrissement, ce qui traduit une certaine mémorisation du caractère « Tolérance au flétrissement bactérien ».

Si, au cours des autofécondations suivantes, le phénomène pouvait se maintenir, la culture *in vitro* pourrait donc apparaître comme une source par laquelle on pourrait induire une tolérance au flétrissement bactérien provoqué par *Pseudomonas solanacearum.* Pilowsky et Zutra [18] sont arrivés à des résultats similaires en travaillant sur tomate avec une souche de *Pseudomonas syringae* p.v. tomato. Signalons que dans notre cas, ne sont présentés ici que les résultats préliminaires ; il nous faudra par la suite examiner, au niveau des descendances après autofécondations, s'il s'agit des mutations qui ont conduit à la manifestation de cette tolérance ou alors si c'est le phénomène variation somaclonale qui s'est réellement manifesté.

Nsika-Mikoko [14] montrait qu'il pouvait se produire des mutations après une certaine durée de vie du matériel sur milieu en culture synthétique. Dans tous les cas, qu'il s'agisse d'une mutation ou de l'expression d'une variation somaclonale après passage en culture *in vitro,* cela témoigne de la souplesse de l'expression des gènes sur le chromosome, dans le noyau de la cellule entière [8, 20]. En effet, l'existence des introns,

des exons, des éléments d'insertion, des transposons, ainsi qu'une coopération des pseudogènes dans une séquence, peut faire apparaître des séries d'adaptations à des situations données.

Ce travail, qui doit être complété par une étude histologique quant à l'impossibilité de pénétration ou de multiplication de la bactérie, devrait conduire à la mise au point d'une variété résistante susceptible de passer dans le processus de culture dans les régions aux sols contaminés.

Cette technique de contamination artificielle de cals avant la régénération des plantes présente plusieurs avantages.

C'est un modèle simple, reproductible et rapide, ne présentant aucun danger pour la dissémination du pathogène, mais permettant aussi de travailler sur un espace réduit avec une grande quantité de matériel.

Conclusion

L'apparition des clones variants mis en évidence par les praticiens de la culture *in vitro* sont d'un apport important en amélioration des plantes ; plusieurs questions (surtout en ce qui concerne la maîtrise de la production de la variabilité) doivent trouver une solution pour une bonne réussite sur le terrain de la confrontation entre la qualité des clones variants et les pratiques agricoles.

Références

1. Aaouine M (1990). Les biotechnologies et leurs applications. Cours sur les cultures *in vitro IAVH* II, 17 mai-15 juin, Agadir, Maroc.
2. Boher B (1987). Les bactéries des plantes cultivées en République du Congo. Communication au séminaire sur la plante et l'homme. Brazzaville, 4-6 mars, 6 p.
3. Bounkoulou A (1987). Comportement de quelques variétés de tomate vis-à-vis d'un ennemi tellurique *Pseudomonas solanacearum.* Mémoire de Diplôme d'Ingénieur de Développement Rural. IDR Université Marien Ngouabi, Brazzaville, 42 p.
4. Buyckx EJE (1962). Précis des maladies et des insectes nuisibles rencontrés sur les plantes cultivées au Congo, Rwanda et Burundi. *Phytopathologie et entomologie agricole.* INEAC : 195-196.
5. Chagvardieff P (1985). L'utilisation de la variabilité exprimée spontanément en culture, en vue de l'amélioration des plantes. *Bull Soc Bot Fr* 132, *Actual Bot* 3/4 : 37-103.
6. Chevaugeon J (1979). Méthodes de lutte contre les maladies des plantes. Cours de Phytopathologie (DEA Amélioration des plantes). Université Paris-XI, Orsay.
7. Chlyah H (1990). Culture de Protoplastes et variation somaclonale. Cours sur les cultures *in vitro IAVH* II, 7 mai-15 juin, Agadir, Maroc.
8. Demarly Y (1989). Technical aspects of plant biotechnologies. In : *Plant biotechnologies for Developing countries.* Proceedings of an International Symposium organized by CTA and FAO. 26-30 June. Luxembourg, p. 47-58.
9. Inzé D (1992). Plant defence systems against invading pathogens. Interactions plantes-microorganismes. Séminaire IFS, 267.
10. Larkin PJ, Scowcroft WR (1981). Somaclonal variation : a novel source of variability from cell cultures for plant improvment. *Theor Appl Genet* 60 : 197-214.
11. Messiaen CM (1975). Le potager tropical. Tome 2. PUF. Paris : 197-230.

12. Murashige R, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioessays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* Vol. 15 : 473-497.
13. N'dir Sy M, Bâ AT (1992). La stemphyliose de *Solanum aethiopicum* L, GR Kumba causée par *Stemphylum solani* Weber. Comptes rendus du séminaire FIS sur les interactions Plantes-micro-organismes. Dakar, Sénégal : 277-283.
14. Nsika-Mikoko E (1982). Analyse de la variabilité dans la descendance des plantes obtenues par culture *in vitro* de tissus somatiques de tomate *(Lycopersicon esculentum* Mill.). Thèse de Doctorat 3e Cycle. Université Paris XI, Orsay, 118.
15. Nsika-Mikoko E (1987). La bactériose de la tomate en République du Congo. Communication présentée lors du séminaire sur la Plante et l'homme. Brazzaville 4-6 mars, 9 p.
16. Nsika-Mikoko E (1989). Le flétrissement bactérien : un handicap à la culture de la tomate au Congo. Annales de l'Université du Bénin. Série Sciences Tome IX : 36-48.
17. Nsika-Mikoko E (1992). Induction de la tolérance au *Pseudomonas solanacearum* par l'utilisation de la variation somaclonale en culture *in vitro.* Comptes rendus du séminaire FIS sur les interactions plantes-micro-organismes. Dakar, Sénégal : 397-400.
18. Pilowsky M, Zutra D (1986). Reaction of different tomato genotypes to the bacterial speck pathogen *(Pseudomonas syringae* p.v. tomato). *Phytoparasitica* 14 (1) : 39-42.
19. Sibi M (1976). La notion de Programme génétique chez les végétaux supérieurs. II. Aspect expérimental : obtention des variants par culture de tissus *in vitro* sur *Lactuca sativa.* L., apparition de vigueur chez les croisements. *Ann Amelior Pl* 26 (4) : 523-547.
20. Sibi M (1979). Expression of cryptic genetic factors *in vivo* and *in vitro.* In : Zeven Ac, Van Harten AM, eds. *Proc. Conf. Broadening Genet Base Crops* 1978. Wageningen Pudoc, Wageningen : 339-340.
21. Zenzéké AH (1984). Contribution à l'étude d'un ennemi tellurique des Solanacées : *P. solanacearum.* Mémoire. Université M. Ngouabi. IDR, 66 p.

PARTIE II

La plante et la sélection

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1995, pp. 141-148.

15

Implication de l'acide abscissique dans la résistance du blé à la sécheresse

SAMIR EL JAAFARI[1], PHILIPPE LEPOIVRE[2], JEAN SEMAL[2]

1. Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université My Ismail, Meknès, Maroc.
2. Laboratoire de Pathologie Végétale, FSAGx, 5030 Gembloux, Belgique.

Résumé

La sélection des plantes pour leur résistance vis-à-vis de la sécheresse doit être envisagée selon une démarche synthétique, tenant compte des interactions qui existent entre organes et fonctions au sein de l'organisme. L'acide abscissique, synthétisé et accumulé par les plantes en conditions de sécheresse, est impliqué dans un grand nombre de réponses au stress hydrique. La réactivité vis-à-vis de l'ABA, ou l'aptitude à accumuler cette hormone en réponse au stress hydrique, pourraient être utilisées comme critères de sélection pour la résistance à la sécheresse.

La sélection des céréales dans des régions à forte contrainte hydrique implique une identification des mécanismes de résistance à la sécheresse, une analyse de leurs interactions et une évaluation de leurs effets sur le rendement.

Nous discuterons de l'amélioration de la productivité en conditions de déficit hydrique et nous analyserons les implications possibles de l'acide abscissique (ABA) dans la sélection des plantes pour la résistance à la sécheresse.

La sélection pour la résistance à la sécheresse

La difficulté d'identifier et de caractériser les paramètres de la résistance au stress hydrique chez les plantes, à travers l'observation d'un caractère phénotypique complexe et de faible héritabilité, comme le rendement en conditions de déficit hydrique, a conduit à s'intéresser à des critères morpho-physiologiques de la résistance à la sécheresse. Des approches analytiques, consistant à isoler et à étudier individuellement un mécanisme de résistance donné, *via* l'observation d'un paramètre particulier (critère de sélection) ont été proposées. Plusieurs critères physiologiques et biochimiques ont été ainsi identifiés dans le but de distinguer les variétés sensibles des variétés résistantes au stress hydrique : accumulation de proline, induction de protéines spécifiques, résistance stomatique, fluorescence chlorophyllienne. Ces recherches ont généré une connaissance approfondie des processus physiologiques liés à la réponse de la plante au stress hydrique, mais pourraient conduire à une vue partielle et réductionniste du comportement de la plante entière, en séparant artificiellement l'organe de l'organisme et en dissociant les mécanismes biochimiques des fonctions globales du végétal. Cela montre que le problème de la résistance à la sécheresse doit être abordé *via* une démarche synthétique, tenant compte des relations fonctionnelles, des liens de causalité et des interactions entre les mécanismes impliqués [24].

La sélection pour la résistance à la sécheresse repose sur l'identification et la création de génotypes capables de produire un maximum de biomasse ou de grains en conditions de déficit hydrique. Il existe en la matière une large gamme de mécanismes, que Turner [36] a classés en mécanismes d'évitement, d'esquive ou de tolérance vis-à-vis de la sécheresse.

Les mécanismes d'esquive permettent à la plante de conserver un potentiel hydrique faiblement négatif en conditions de stress, évitant ainsi la déshydratation des tissus. Cela peut être réalisé par une absorption efficace de l'eau du sol, grâce à un système racinaire très développé [19], ou par une grande conductivité hydraulique des tissus [21]. La limitation des pertes d'eau peut également résulter de la réduction de la surface transpirante (feuilles de petite taille ou abscission, [4]) ou encore de la diminution de la radiation interceptée (couche épicuticulaire cireuse ou lipidique, [3]). Chez le blé, l'enroulement foliaire observé chez certaines variétés résistantes relève de ces mécanismes d'économie en eau [8]. Enfin, la fermeture stomatique constitue également un mécanisme réversible contribuant à réduire les pertes en eau.

Les mécanismes de tolérance favorisent quant à eux le maintien de la turgescence de la plante alors que son potentiel hydrique est très négatif. L'ajustement osmotique constitue le processus majeur permettant à la cellule de maintenir sa turgescence sous contrainte hydrique [36], grâce à l'accumulation active de molécules particulières : alcools (comme le glycérol), polyols, généralement dérivés de l'inositol, sels de potassium [16] et sucres solubles [1, 2]. Cependant, les substances qui ont retenu le plus l'attention des physiologistes et des sélectionneurs sont des composés contenant un azote quaternaire, comme la bétaine ou la proline [15, 23, 35].

D'autres mécanismes encore peuvent intervenir dans le maintien de la turgescence cellulaire, comme l'élasticité membranaire, la réduction de la taille des cellules [37] et la résistance protoplasmique. Cette dernière dépend de la capacité des cellules à résister à un dommage mécanique et à la dénaturation des protéines au niveau membranaire ou cytoplasmique [17].

L'ensemble de ces mécanismes montre que la sélection de plantes possédant une résistance à la sécheresse peut s'opérer à différents niveaux d'organisation du génotype

sans omettre les interactions multiples qui peuvent exister entre organes et fonctions du système plante.

En fonction de ces considérations, la recherche d'une résistance vis-à-vis de la sécheresse peut se concevoir en essayant d'assembler des mécanismes de résistance dans un même génotype, présentant par ailleurs des caractéristiques agronomiques intéressantes. Ces mécanismes sont dans la plupart des cas contrôlés par plusieurs gènes dont il faut maximiser les effets pour obtenir un rendement optimal en conditions de déficit hydrique (Figure 1.1).

Une seconde approche de la sélection pour la résistance à la sécheresse pourrait viser à éliminer des facteurs limitant le rendement en conditions de déficit hydrique (Figure 1.2). A cet égard, la forte accumulation de l'acide abscissique ou la réactivité élevée vis-à-vis de cette hormone en présence de stress hydrique semblent affecter négativement la croissance et l'activité photosynthétique de la plante en conditons de sécheresse. En effet, l'ABA joue un rôle de médiateur dans les réponses au stress hydrique, principalement dans les mouvements stomatiques [33]. Des travaux effectués au niveau moléculaire sur les effets de l'ABA et du stress hydrique confortent l'hypothèse selon laquelle cette hormone joue un rôle clé dans la réponse au stress hydrique [7, 34]. C'est ainsi que, chez le maïs, la famille des gènes rab présente une régulation similaire en conditions de stress hydrique ou sous l'effet de l'ABA [25, 26].

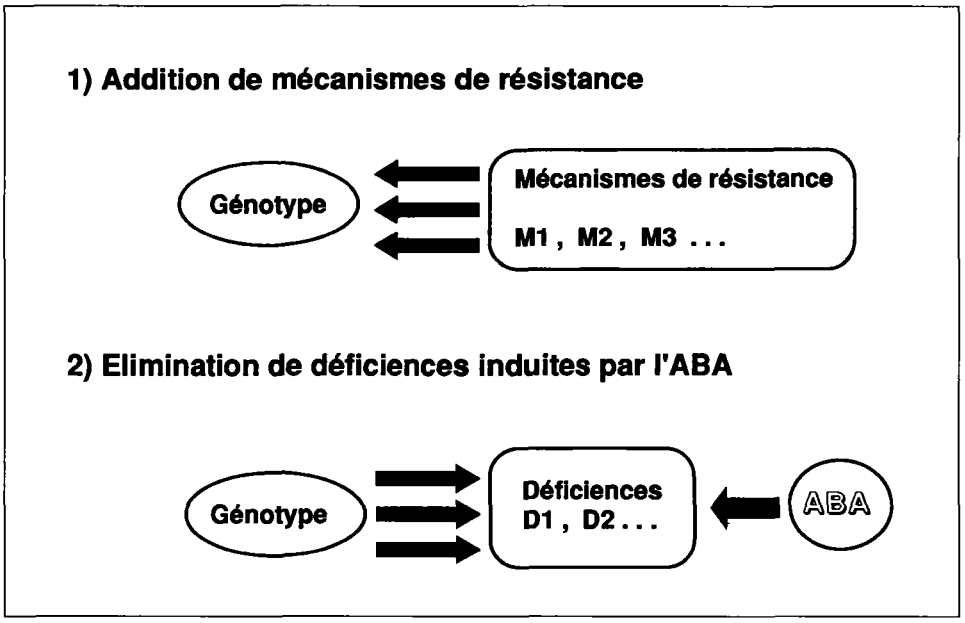


Figure 1. Amélioration du rendement en conditions de sécheresse.

Implications de l'ABA dans la sélection pour la résistance à la sécheresse

L'étude des implications de l'ABA dans les réponses des plantes au stress hyrique [12], montre que des mécanismes d'esquive réduisant la photosynthèse sont induits tant par une forte accumulation de cette hormone que par une réactivité élevée de la plante à son égard (Figure 2). Citons, entre autres, la stimulation de la croissance racinaire [5], la réduction de la surface foliaire [4], la diminution de la radiation absorbée [3], l'abscission des feuilles [29] et la fermeture stomatique [18].

Ces mécanismes d'esquive ont des effets bénéfiques sur le plan de l'économie en eau, mais accélèrent la sénescence et inhibent la photosynthèse et la croissance, ce qui contribue à réduire le rendement. La diminution de la surface transpirante se traduit par une réduction de la surface photosynthétisante. L'abaissement de la conductance stomatique par l'ABA limite la disponibilité en CO_2 à l'intérieur de la feuille et inhibe

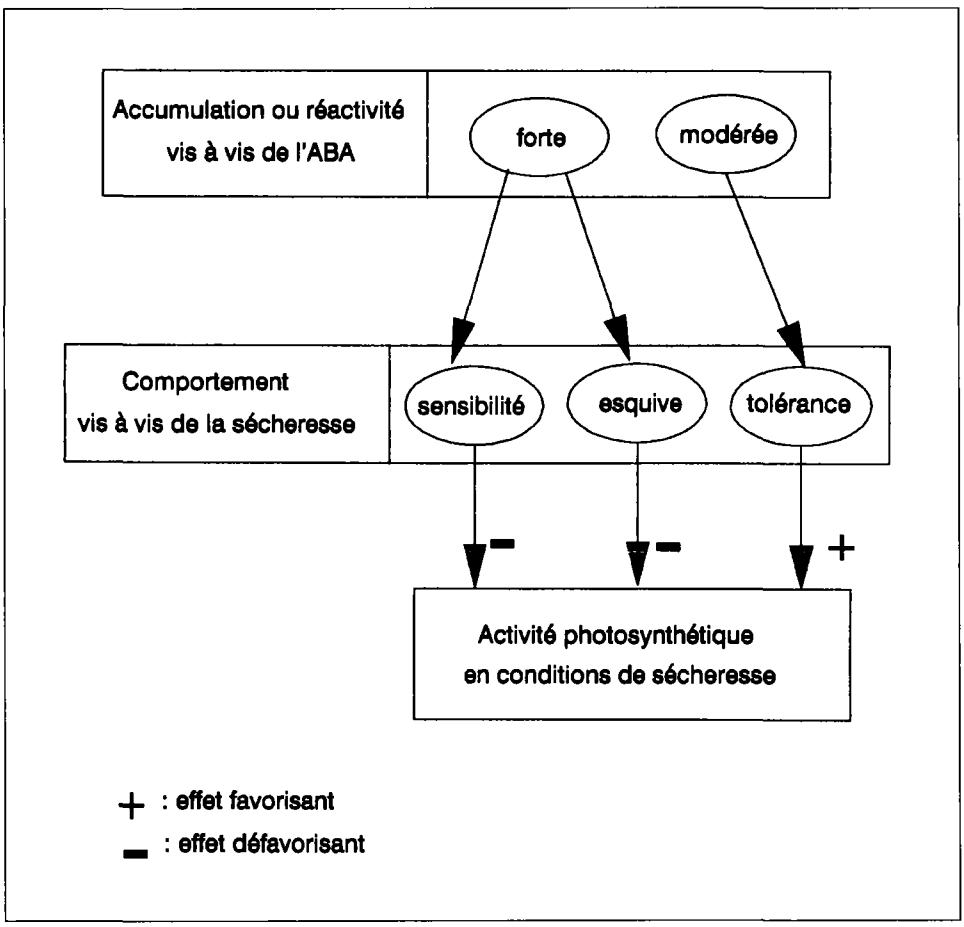


Figure 2. Hypothèses concernant les implications de l'ABA dans les mécanismes de résistance à la sécheresse et conséquences sur l'activité photosynthétique.

ainsi la photosynthèse [9, 11, 20]. D'autres travaux ont également rapporté des inhibitions non stomatiques de la photosynthèse sous l'effet de l'ABA [6, 10, 31].

L'identification de génotypes capables de maintenir une photosynthèse active sous contrainte hydrique repose sur une réduction des mécanismes d'esquive induits par l'ABA. Cet objectif pourrait être atteint en sélectionnant des plantes qui accumulent moins d'ABA en conditions de déficit hydrique ou qui présentent une moindre réactivité vis-à-vis de l'ABA [14].

Les progrès dans les connaissances des bases génétiques de la synthèse et de l'accumulation de l'ABA suggèrent la possibilité de modifier des caractères comme le niveau de base de cette hormone, l'aptitude à accumuler l'ABA en conditions de stress hydrique ou encore la réactivité des plantes à son égard. Le succès de telles approches repose sur la compréhension du métabolisme de l'ABA et sur l'analyse de son action au niveau de la plante entière, car les interactions entre les différentes fonctions du végétal et les effets compensatoires qui peuvent exister entre elles sont succeptibles de modifier l'expression biochimique de l'accumulation (ou de la synthèse) de cette hormone au niveau de l'organisme.

La prédiction des effets au champ est encore plus difficile, d'où un besoin pressant de comprendre le rôle de l'ABA dans la croissance, le développement et la réponse au déficit hydrique *in situ*.

Jusqu'à présent, les seuls travaux d'amélioration de la résistance à la sécheresse conduits en utilisant comme critère de sélection la teneur en ABA endogène de feuilles excisées au champ et déshydratées au laboratoire ont été réalisés par Quarrie [27, 28, 30]. Des lignées à haute teneur (HS) ou à faible teneur (LS) en ABA ont été développées à partir d'un croisement entre deux parents qui diffèrent par leur aptitude à produire cette hormone. La caractérisation des lignées sélectionnées a été basée sur le rendement et les composantes du rendement en conditions de déficit hydrique. Les rendements, en conditions de stress hydrique, des lignées à haute teneur en ABA se sont révélés supérieurs aux lignées à faible teneur en ABA. Par contre, Read *et al.* [32] ont obtenu des résultats opposés sur ces mêmes lignées.

Plusieurs propriétés physiologiques de l'ABA ont été identifiées sans pour autant avoir été exploitées en matière de sélection ou d'études de corrélation avec la résistance à la sécheresse. Les comparaisons effectuées jusqu'à présent entre aptitude à accumuler l'ABA et résistance à la sécheresse ont utilisé le rendement en conditions de déficit hydrique comme critère pour évaluer la résistance. Or, il s'agit en l'occurrence d'un caractère polygénique, à faible héritabilité et qui, de surcroît, présente des problèmes de stabilité d'expression dans différents environnements.

Ces comparaisons ont toutefois été effectuées sans que soit décrit le statut hydrique des plantes. Or, il est nécessaire de distinguer, dans les différences de teneur en ABA endogène, la part due à une synthèse accrue de cette hormone et la part résultant des changements de statut hydrique (accumulation passive par perte de turgescence).

Nous avons montré chez trois variétés de blé (Sabine, 1723 et Siete Cerros respectivement, sensible, tolérante et esquivante vis-à-vis de la sécheresse) que la réactivité vis-à-vis de l'ABA n'est pas liée directement à un niveau de résistance au stress hydrique [13]. En effet, une forte réactivité variétale vis-à-vis de cette hormone (mesurée *in vivo* par les effets d'applications exogènes d'ABA sur les réponses stomatiques, les échanges gazeux et le statut hydrique) peut se traduire par une sensibilité de la variété au stress hydrique (Sabine) ou par une aptitude à esquiver le stress hydrique en limitant les pertes en eau (Siete Cerros).

Chez ces mêmes variétés, nous avons analysé l'accumulation foliaire d'ABA endo-

gène en réponse à un stress hydrique de - 2 MPa, induit par déshydratation de feuilles excisées ou par conduite à sec de plantes entières (Tableau I). Nous avons noté de fortes accumulations d'ABA en réponse à la contrainte hydrique nettement plus élevées lorsque celle-ci résulte d'une conduite à sec de plantes entières que lorsqu'elle est obtenue par déshydratation de feuilles excisées. Ces résultats confortent l'hypothèse d'une synthèse racinaire de l'ABA et qui serait accumulé au niveau des feuilles [38]. Les différences significatives du niveau d'accumulation d'ABA observées entre les trois variétés semblent être liées au niveau de résistance à la sécheresse. La variété sensible Sabine accumule le plus d'ABA, ce qui suggère qu'une forte accumulation de cette hormone révèle un symptôme de stress plutôt qu'une réponse adaptative.

Tableau I. L'hydratation foliaire (H) et la teneur en ABA endogène sous l'effet d'un stress hydrique (*) chez les variétés de blé Sabine, 1723 et Siete Cerros.

		Variétés		
		Sabine	**1723**	**Siete Cerros**
Déshydratation de feuilles excisées	Hydratation H (%)	59.3 (1.2)	64.3 (3.5)	60.7 (2.1)
	[ABA] ng/g PS	1492	1218	941
Conduite à sec de plantes	Hydratation H (%)	69.7 (2.1)	77.3 (2.1)	68.3 (3.5)
	[ABA] ng/g PS	5495	3815	3691

entre parenthèses = erreur standard
(*) : Le stress hydrique est instauré par déshydratation de feuilles excisées ou par conduite à sec de plantes entières jusqu'à un potentiel hydrique de - 2 MPa.

Conclusion

La sélection de la résitance à la sécheresse devrait se concevoir selon une approche synthétique reliant un ensemble de mécanismes dont l'intégration pourrait améliorer le rendement en conditions de déficit hydrique.

L'ABA étant impliqué dans une gamme étendue de réponses de la plante au stress hydrique, son utilisation dans un programme de sélection permettrait la liaison entre un critère de sélection analytique (réactivité vis-à-vis de l'ABA ou aptitude à accumuler l'ABA) et des processus physiologiques globaux, comme les régulations stomatiques, le statut hydrique et l'activité photosynthétique.

Toutefois, il faut prendre en compte que, si cette hormone a des effets bénéfiques sur le statut hydrique *via* la limitation des pertes d'eau, elle affecte négativement la photosynthèse *via* des effets stomatiques et non stomatiques.

Références

1. Acevedo E, Fereres E, Hsiao TC, Henderson DW (1979). Diurnal growth trends, water potential, and osmotic adjustment of maize and sorghum leaves in the field. *Plant Physiol* 64 : 476-480.
2. Ackerson RC (1981). Osmoregulation in cotton in response to water stress. II. Leaf carbohydrate status in relation to osmotic adjustement. *Plant Physiol* 67 : 489-493.
3. Anderson WH, Gellerman JL, Schlenk H (1984). Effect of drought on Phytyl wax esters in Phaseolus leaves. *Phytochemistry* 23 : 2695-2696.
4. Begg JE, Turner NC (1976). Crop water deficits. *Adv Agron* 28 : 161-217.
5. Biddington NL, Dearman AS (1982). The effect of abscisic acid on root and shoot growth of cauliflower plants. *Plant Growth Regul* 1 : 15-24.
6. Bunce JA (1987). Species-specific responses to water stress of gas exchange parameters mimicked by applied abscisic acid. *Can J Bot* 65 : 103-106.
7. Cattivelli, Crosatti C, Grosi M, Portesi A, Rizza F, Stanca AM (1995). Relationship among the modifications of gene expression induced by ABA, drought and gold stress in barley. In : « Reproductive Biology and Plant Breeding » *XIIIth EUCARPIA Congress 6-11 juillet 1992,* Angers, France.
8. Clarke JM (1986). Effect of leaf rolling in leaf water loss in Triticum spp. *Can J Plant Sci* 66 : 885-891.
9. Cornic G, Briantais JM (1991). Partitioning of photosynthetic electron flow between CO_2 and O_2 in a C3 leaf *(Phaseolus vulgaris* L.) at different CO_2 concentrations and during drought stress. *Planta* 183 : 178-184.
10. Cornic G, Miginilac E (1983). Non stomatal inhibition of net CO_2 uptake by abscisic acid in Pharbitis mil. *Plant Physiol* 73 : 529-33.
11. Downton WJS, Loveys BR, Grant WJR (1988). Non uniform stomatal closure induced by water stress causes putative non-stomatal inhibition of photosynthesis. *New Phytol* 110 : 503-509.
12. El Jaafari S (1992). ABA et sélection de la résistance à la sécheresse. *Annales de Gembloux* 98 : 259-275.
13. El Jaafari S (1993). Contribution à l'étude des mécanismes biophysiques et biochimiques de résistance à la sécheresse chez le blé *(Triticum aestiivum* L.) Thèse de Doctorat es Sciences Agronomiques, Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux, 214 p.
14. El Jaafari S, Paul R (1993). Accumulation foliaire de proline et résistance à la sécheresse chez le blé *(Triticum aestivum* L). *Arch Int Physiol Biochem Biophys* 101 : B8.
15. El Jaafari S, Paul R, Lepoivre P, Semal J, Laitat E (1993). Résistance à la sécheresse et réponses à l'acide abscissique : analyse d'une approche synthétique. *Cahiers Agricultures* 2, 256-263.
16. Ford CW, Wilson JR (1984). Changes in levels of solutes during osmotic adjustment to water stress in leaves of four tropical pasture species. *J Plant Physiol* 8 : 79-91.
17. Gaff DF (1980). Protoplasmic tolerance of extreme water stress. In : Turner NC, Kramer PJ eds. *Adaptation of plants to water and high temperature stress.* Wiley, NY, 207-230.
18. Hartung W, Radin JW, Hendrix DL (1988). Abscisic acid movement into the apoplastic solution of water stress cotton leaves. Role of apoplastic pH. *Plant Physiol* 86 : 908-913.
19. Hsiao TC, Acevedo E (1974). Plant responses to water deficits, water use efficiency and drought resistance. *Agric Meteorol* 14 : 59-84.
20. Lauer MJ, Boyer JS (1992). Internal CO_2 measured directly in leaves. Abscisic acid and leaf water potential cause opposing effects. *Plant Physiol* 98 : 1310-1316.
21 Levitt J (1982). Water stress. In : « Responses of plant to environmental stress, water radiation, salt and other stress ». New York Academic Press : 25-282.
22. Lichtenthaler HK 1988. Application of Chlorophyll Fluorescence. Dordrecht, Kluer, 366p.
23. McCue KF, Hanson AD (1990). Drought and salt tolerance : towards understanding and application. *Tibtech* 8 : 358-62.

24. Monneveux Ph (1991). Quelles stratégies pour l'amélioration génétique de la tolérance au déficit hydrique des céréales d'hiver ? In : AUPELF-UREF ed. *L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides*, John Libbey Eurotext, Paris 165-186.
25. Pages M, Pla M, Jensen AB, Freire MA, Arenas C, Poca E, Goday A (1992). Regulation of ABA and water stress responsive genes in maize embryos. In : Datte Y, Dumas C, Gallais A eds. *Reproductive Biology and Plant Breeding, Springer Verlag*, Berlin : 275-283.
26. Pla M, Vilardell J, Guiltinan MJ, Marcotte WR, Niogret MF, Quatrano RS, Pages M (1986). The cis-regulatory element CCACGTGG is involved in ABA and water stress responses of the maize gene rab23. *Plant Molecular Biology* 21 : 259-266.
27. Quarrie SA (1981). Genetic variability and heritability of drought induced abscisic acid accumulation in spring wheat. *Plant Cell Environ* 4 : 147-151.
28. Quarrie SA, Lister PG (1983). Characterization of spring wheat genotypes differing in drought-induced abscisic acid accumulation. *J Exp Bot* 34 : 1260-1270.
29. Quarrie SA (1985). Genetic differences in abscisic acid physiology and their potential uses in agriculture. In : Addicot FT ed. *Abscisic Acid*, Praeger Publischer, NY.
30. Quarrie SA (1991). Implications of genetic differences in ABA accumulation for crop production. In : Davies WJ, Jones HG eds. *Abscisic Acid physiology and biochemistry*. Bios Scientific Publishers, Cambridge, UK : 227-244.
31. Raschike K, Hedrich R (1985). Simultanous and independent effects of abscisic acid on stomata and the photosynthetic apparatus in whole leaves. *Planta* 193 : 105-18.
32. Read JJ, Johnson BC, Carver BF, Quarrie SA (1991). Carbon isotope discrimination, gas exhange and yield of spring wheat selected for abscisic acid content. *Crop Sci* 31 : 139-146.
33. Sarda X, Vansuyt G, Tousch D, Casse-Delbart F, Lamaze T (1992). Les signaux racinaires de la régulation stomatique. In : « Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditéranéenne : diversité génétique et amélioration variétale ». Colloques INRA n° 64, 75-79.
34. Skiver K, Mundy J (1990). Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2 : 503-512.
35. Stewart CR (1981). Proline accumulation : Biochemical aspects. In : Paleg LG, Aspinall D eds. *The physiology and biochemistry of Drought Resistance in Plants. Academic Press*, Sydney : 629-635.
36. Turner NC (1986). Adaptation to water deficits ; a changing perspective. *Aust J Plant Physiol* 13 : 175-190.
37. Tyree MT, Jarvis PG (1982). Water in tissues and cells. In : Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H, eds. *Encyclopedia of plant physiology*. New Series, Vol. 12B Physiological plant ecology II., Water relations and carbon assimilation. Springer-Verlag, Berlin : 36-77.
38. Zhang J, Davies WJ (1989). Sequential response of whole plant water relations to prolonged soil drying and the involvement of xylem sap ABA in the regulation of stomatal behaviour of sunflower plants. *New Phytol* 113 : 167-174.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1995, pp. 149-163.

16

Intégration des approches physiologiques, génétiques et moléculaires pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse chez les céréales

P. MONNEVEUX, D. DEPIGNY-THIS
UFR Génétique et Amélioration des Plantes, ENSA-INRA, Montpellier, France.

Résumé

Après quelques réflexions critiques concernant les stratégies empiriques d'amélioration génétique des rendements utilisées dans les milieux à fortes contraintes, une stratégie globale est proposée, associant des études conduites à différents niveaux d'intégration (génome, plante, peuplement) et intégrant divers outils physiologiques, génétiques, et moléculaires. Les programmes conduits dans notre laboratoire et quelques résultats obtenus dans ces études sont donnés à titre d'exemples. Le problème de l'utilisation de ressources génétiques à base large est enfin abordé.

Quelques réflexions critiques concernant l'approche empirique

La productivité comme objectif

Dans les zones favorables ou à faibles contraintes environnementales, le choix du rendement potentiel (ou aptitude génétique au rendement), à la fois comme objectif et critère de sélection, s'avère relativement justifié dans la mesure où les conditions de milieu (sol, climat, techniques culturales) permettent l'expression de cette aptitude génétique [36] ; dans les régions à contraintes environnementales fortes et erratiques, la

productivité ne peut être retenue, ni comme objectif de sélection (des niveaux de rendement proches du rendement potentiel ayant de très faibles probabilités d'être atteints), ni, *a fortiori*, comme critère de sélection. La définition des objectifs passe en effet dans ces zones par une analyse de variabilité des rendements intégrant l'analyse de la variabilité environnementale (spatiale et interannuelle), en d'autres termes par une analyse des interactions génotype x milieu ; dans le cas contraire, le risque est grand pour le sélectionneur de tomber dans ce piège que Reitz [43] appelait la *one-year miracle variety*...

Les interactions génotype x milieu

Dès 1974, Reitz regroupe les variétés d'espèces cultivées en trois catégories :

– les variétés maintenant des rendements élevés dans une large gamme d'environnements ;

– les variétés assurant une production de grains relativement élevée dans les environnements à fortes contraintes (ces variétés sont souvent qualifiées de rustiques) ;

– les variétés ne donnant de bons rendements qu'en conditions très favorables (on rejoint ici la notion de variété à haute productivité, évoquée plus haut).

Différents modèles ont été proposés pour analyser les interactions génotype x milieu. Ils reposent tous sur un suivi du comportement d'un même groupe de variétés, dans une large gamme de situations différentes ; la stabilité du rendement d'une variété est évaluée dans la plupart de ces modèles (Figure 1 et Tableau I) :

– à partir des valeurs du coefficient de régression, du rendement moyen obtenu en prenant en compte l'ensemble des « situations » et du carré moyen de la déviation Sd2 [18] ;

– à partir du coefficient de détermination r^2 [42].

Ces modèles linéaires d'analyse ont fait l'objet de nombreuses critiques [12] ; on leur reproche en particulier [41, 46] :

– de confondre les effets principaux et les effets d'interaction ;

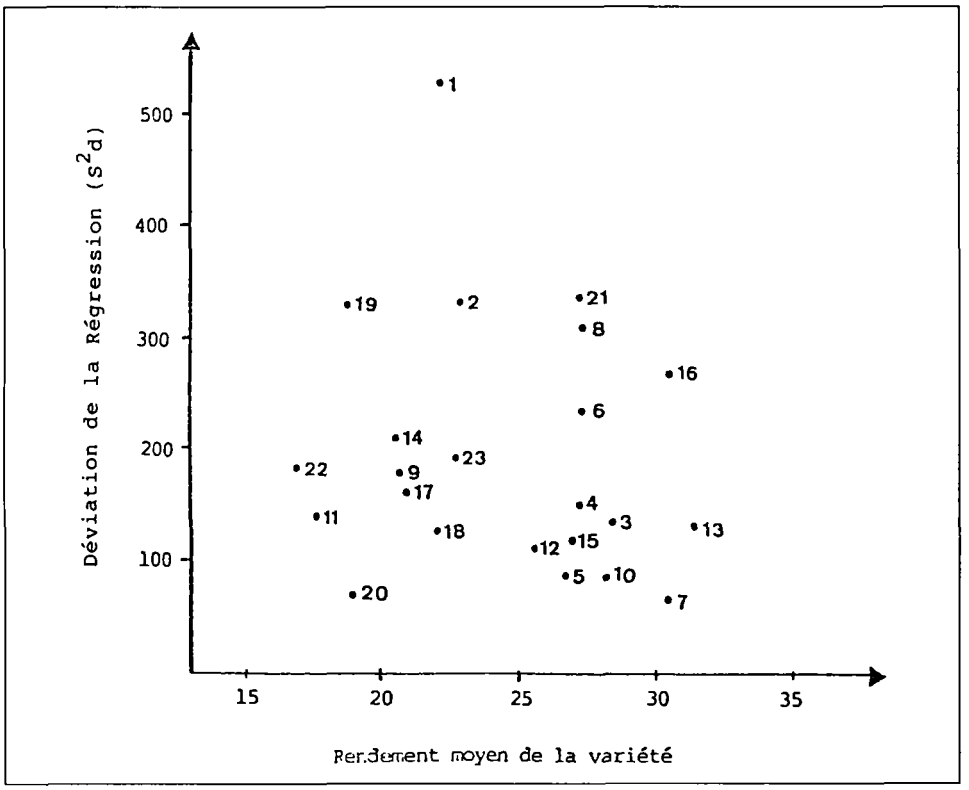
– de ne pas prendre en compte la non-linéarité évidente des réponses des génotypes aux variations des conditions environnementales.

Des modèles multivariés ont été plus récemment proposés [25, 31, 47] ; le programme AMMI *(additive main effects and multiplicative interactions)* est un exemple d'application de ces modèles pour l'analyse du comportement ; il a été utilisé pour comparer le comportement de différentes variétés de blé dur dans le Bassin méditerranéen [41]. En tout état de cause, les modèles d'étude d'interactions génotype x milieu (tant linéaires que multivariés) doivent être considérés :

– comme des modèles purement descriptifs du comportement : ils relèvent d'une approche biométrique qui ne cherche pas à définir ni à expliquer le rôle des facteurs de l'environnement ou le fonctionnement biologique de la plante ;

– comme fortement dépendants de l'échantillon génétique testé, c'est-à-dire de la nature des génotypes inclus dans les essais [14].

Les revues bibliographiques de Hardwick et Wood [26], Freeman [21], Hewstone [27], et Fox et Rosielle [20] mettent bien en évidence les limitations de ces modèles en même temps que leur intérêt en vue d'une description succinte des comportements variétaux.



1 = Kabir 1
2 = M 1086
3 = Heider (Marjawi)
4 = Quadalete
5 = Jordan coll. 86 n° 42
6 = Korifla
7 = Mrb 17
8 = Daki (Ceyhan)
9 = Gezira 17
10 = Jordan coll. 86 n° 21
11 = Baladia Hamra
12 = Furat 1
13 = Mrb 5
14 = Oued Zenati 368
15 = Belikh 2
16 = Sham 1
17 = Haurani
18 = Ain Arous
19 = Akbash
20 = Mavragani Iraklion
21 = Gr/Boy
22 = Cannizzara
23 = Hedba 3

Figure 1. Relation entre le rendement moyen de la variété et déviation de la régression chez 23 génotypes de blé dur. (L'analyse, qui reprend les résultats du Tableau I, permet d'identifier quelques génotypes « à large adaptation », tels que : Om Rabi 17, Om Rabi 5, Jordan n° 21, Jordan n° 42, Heider, Belikh 2, Furat 1 et Quadalete.)

Tableau I. Analyse de la stabilité de rendement de 23 variétés de blé dur.

Génotypes	X	b	a	S^2d	r^2
Kabir 1	22,02	1,107*	– 4,080	529,85	0,882
M 1086	22,75	0,810*	3,156	330,52	0,865
Heider/Marjawi	28,35	1,312**	– 2,576	137,61	0,966
Quadalete	27,15	1,323**	– 4,042	150,60	0,950
Jordan N° 42	26,82	1,182**	– 1,030	86,40	0,930
Korifla	27,38	1,196**	– 0,814	234,65	0,950
Mrb 17	30,39	1,311**	– 0,524	67,21	0,988
Daki/Ceyhan	27,44	1,078**	2,330	310,00	0,920
Gezira 17	20,71	0,900*	– 0,518	179,73	0,890
Jordan N° 21	28,25	1,300**	– 2,372	86,94	0,980
Baladia Hamra	17,61	0,733**	0,303	137,65	0,890
Furat 1	25,49	1,137**	– 1,316	111,80	0,974
Mrb 5	31,42	1,233**	2,362	134,72	0,973
Oued Zenati 368	20,61	0,820*	1,230	210,04	0,910
Belikh 2	27,03	1,123**	0,558	121,60	0,970
Sham 1	30,44	1,307**	– 0,377	270,07	0,950
Haurani	20,94	0,852**	0,866	163,89	0,930
Aïn Arous	21,95	0,850**	1,966	128,99	0,950
Akbash	18,76	0,760*	0,843	328,46	0,850
Mav. Iraklion	19,03	0,714**	2,183	69,00	0,900
Gr/Boy	27,30	1,317**	– 3,740	339,70	0,940
Cannizzara	16,83	0,830**	– 2,703	179,73	0,926
Hedba 3	23,66	1,230**	– 6,250	194,55	0,870
Moyenne	24,40	1,061		195,80	0,928
	± 1,28	± 0,217			± 0,040
PPDS (0,05)	8,73				

X = rendement moyen (X) ; b = coefficient de régression ; (a) = pente de la régression entre rendement de l'essai et rendement de la variété ; S^2d = carré moyen de la déviation ; r^2 = coefficient de détermination.
L'analyse a été effectuée sur 12 sites environnementaux en Syrie (Tell-Hadya, Breda) et en France (Montpellier).
(D'après Ali Dib, 1992)

Le rendement comme critère

De nombreux travaux, parmi lesquels ceux de Frey [22] et Daday *et al.* [16], aboutissent à la conclusion que la sélection pour le rendement (et ses composantes) est peu efficace en conditions environnementales défavorables, la variance génétique et l'héritabilité de ce caractère étant, dans ces conditions, peu élevées.

L'opportunité, pour obtenir des génotypes tolérants au stress, d'effectuer la sélection en conditions favorables, ou défavorables, a été discutée par Ceccarelli [15] ; ce débat apparaît toutefois relever quelque peu de la casuistique : en effet, la distinction entre « milieux favorables » et « milieux défavorables » implique une caractérisation précise de ces milieux, une quantification des stress subis, et des pressions de sélection appliquées ; par ailleurs, la capacité d'un génotype à produire une quantité de grains élevée dans un milieu caractérisé par des contraintes données peut dépendre, comme nous le verrons plus loin, de caractères aussi différents que :

– des adaptations spécifiques liées à une grande rusticité (production de biomasse végétative importante, faible indice de récolte), qui interviendront surtout dans des milieux à très fortes contraintes ;

– des adaptations « inductibles », à faible coût énergétique cumulé, compatibles avec une productivité élevée (comme cela semble être le cas pour l'ajustement osmotique par exemple) ;

– des « adaptations » recouvrant en fait des « effets résiduels » de potentiels élevés de rendement, qui s'expriment surtout dans des milieux favorables ou à contraintes modérées.

Il convient, bien entendu, d'éviter que les milieux (sol, climat, techniques) dans lesquels est pratiquée la sélection présentent une trop grande disparité d'avec les milieux où les futures variétés doivent être cultivées.

L'incapacité du rendement à être utilisé comme seul critère en conditions environnementales difficiles conduit à définir et à mettre en œuvre une véritable « stratégie de sélection » permettant une identification, une description, et une validation des caractères de tolérance, une étude génétique de ces caractères, et la recherche de marqueurs moléculaires leur étant associés. C'est cette stratégie, qui amène à mettre en œuvre à la fois des outils physiologiques, génétiques, et moléculaires, que nous cherchons à développer au sein de notre laboratoire, au bénéfice de l'amélioration de l'orge et du blé dur.

Identification et hiérarchisation des caractères phénologiques et morphologiques de tolérance (Figure 2)

Face à la multiplicité des caractères d'adaptation [36], il convient d'effectuer parmi eux un « tri » ; le choix des caractères à sélectionner peut relever en fait de deux types de démarches :

– **une première démarche, de type théorique,** consiste à se baser sur les connaissances physiologiques acquises sur ces mécanismes pour en déduire leur pertinence. Une telle démarche doit avoir en particulier pour objectif d'écarter (ou de prendre en compte avec circonspection) les caractères susceptibles de conduire à contre-sélectionner pour la productivité, et de privilégier au contraire les caractères inductibles, ayant sur l'ensemble du cycle de la plante un faible coût énergétique, et susceptibles d'inter-

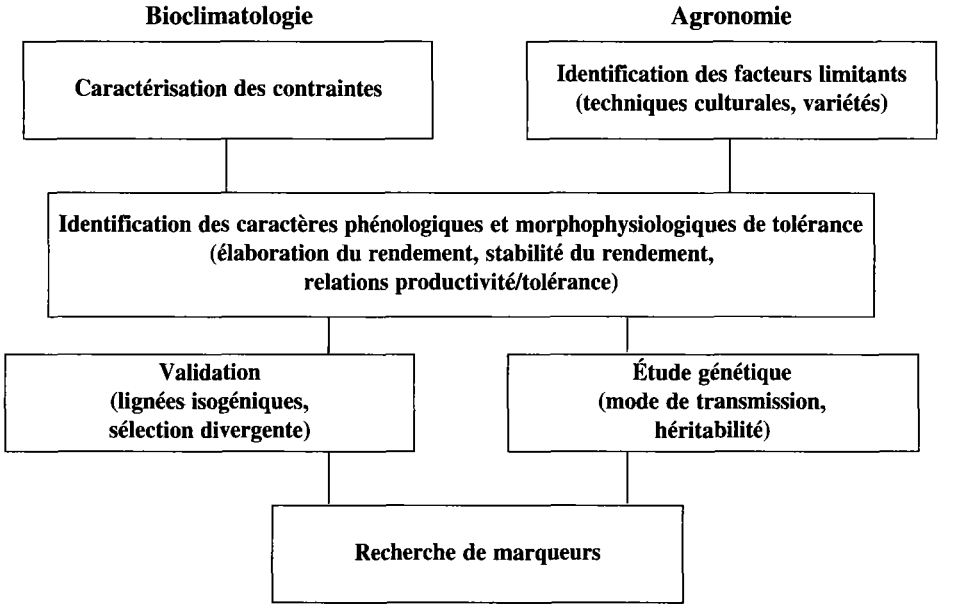


Figure 2. Schéma général d'amélioration génétique de la tolérance à la sécheresse.

venir dans une large gamme d'intensités de stress, voire face à différents types de stress. Une telle démarche (qui se doit de prendre en compte également l'héritabilité du caractère, si celle-ci a déjà été évaluée) conduira par exemple à accorder une grande importance à un mécanisme tel que l'ajustement osmotique (Tableau II).

– **une deuxième démarche, de type expérimental,** consiste à rechercher, dans le cadre d'essais effectués dans différentes conditions environnementales, les relations existant entre le rendement, ou certains indices exprimant la tolérance du génotype, et l'expression de certains caractères morphophysiologiques ou phénologiques ; cette approche, décrite en détail par Acevedo [48], a été reprise depuis par de nombreux sélectionneurs et a permis d'identifier les principaux caractères associés à différents types de sécheresse (Tableau III). Elle présente toutefois de sérieuses limitations :

– plusieurs « indices de tolérance » ont été proposés (Tableau IV), faisant tous intervenir le rendement sous stress et le rendement potentiel ; or, le fait de prendre en compte l'un quelconque de ces indices, ou au contraire le rendement comme base de calcul des corrélations, conduit à des interprétations très diverses : le mode de calcul de la plupart de ces indices « pénalisant » en effet très fortement les génotypes à rendement potentiel élevé, des valeurs très fortes caractérisent plutôt des génotypes rustiques à faible productivité que des génotypes à rendement stable et élevé ; par ailleurs certains modèles font intervenir la précocité, faisant ainsi abstraction de la capacité d'évitement ;

– seuls les caractères facilement mesurables au champ (caractères phénologiques, composantes du rendement, caractères morphologiques, et certains caractères physiologiques) peuvent entrer dans ce type d'analyse ;

Tableau II. Intérêt des mesures de capacité d'ajustement osmotique en tant que critère d'évaluation de la tolérance au stress hydrique.

Type d'adaptation	**Inductible**
Facteurs d'induction	– teneur en eau du sol
Rôles	– maintien de la turgescence – maintien de la croissance [13] – retardement de l'enroulement et de la sénescence foliaires [29] – maintien de l'ouverture stomatique [35]
Facilité de mesure	– implique des mesures conjointes de potentiels hydrique, osmotique et de turgescence et des mesures de teneur en eau relative. – les dosages d'osmolytes sont difficiles à relier aux capacités d'ajustement.
Relations avec le comportement au champ	– relations entre capacité d'ajustement et rendement en grains sous stress [10, 38]
Variabilité génétique	– élevée [11, 38]
Déterminisme génétique	– caractère monogénique récessif ? [38]

Tableau III. Quelques exemples de caractères morphophysiologiques et phénologiques liés au rendement dans différentes situations de sécheresse.

Espèce	**Région**	**Caractères**	**Référence**
Orge	Moyen-Orient	Indice de récolte élevé, gros grains, tallage-épis et fertilité de l'épi élevés, précocité, tolérance au froid.	[2]
Orge	Sud Espagne	Tallage-épis élevé, forte biomasse à l'anthèse	[23]
Orge	Nord-Est Espagne, Sud France	Bonne capacité de maintien de la teneur en eau relative, gros grain.	[37]
Orge	Maroc	Précocité d'épiaison, longueur des racines séminales, enroulement des feuilles.	[7]
Blé dur	Moyen-Orient	Indice de récolte élevé, tallage-épis et fertilité de l'épi élevés, précocité, cols d'épis longs.	[2]
Blé dur	Maroc	Précocité d'épiaison, enroulement des feuilles, tallage, longueur du col de l'épi, fertilité de l'épi.	[40]

Tableau IV. Présentation de différents modes de calcul des « indices de sensibilité à la sécheresse ».

Indice de sensibilité à la sécheresse *(Drought Susceptibility Index)* de Fischer et Maureer [19] : $S = Yd/Yp$ Yd = rendement en grains en conditions de sécheresse Yp = rendement en conditions « optimales » (irriguées)
Utilisation des indices de stabilité [10]
Indice de résistance à la sécheresse *(Drought Resistance Index)* de Bidinger *et al.* [8] : $I = (Ya - Ys)/SEs$ Ya = rendement en conditions de stress Ys est obtenu par ajustement, en utilisant l'équation : $Ys = a + b1\ (Yc) + b2\ (b1) + b3\ (b1^2)$, avec Yc = rendement en conditions irriguées, et b1 = nombre de jours entre semis et floraison
Indice de sensibilité à la sécheresse *(Drought Susceptibility Index)* de Acevedo [2] : $S = (1 - Yd/Yp)/D$ avec : Yd = rendement en conditions de sécheresse Yp = rendement en conditions favorables (irriguées) D = « intensité de la sécheresse » = $1 - Ydm/Ypm$ Ydm = moyenne de rendement de l'essai, en conditions de sécheresse Ypm = moyenne de rendement de l'essai, en conditions favorables (irriguées)

Comme dans le cas des études d'interactions génotype x milieu, ces analyses doivent prendre en compte plusieurs lieux et plusieurs années pour intégrer au mieux la variabilité environnementale (spatiale et interannuelle), ce qui induit des dispositifs expérimentaux relativement lourds.

Les deux démarches décrites ci-dessus, loin de s'opposer, doivent au contraire être utilisées de manière complémentaire. Un exemple de « convergence » de ces deux démarches peut, par exemple, être trouvé dans la mise en évidence du rôle de l'épi et des barbes dans la tolérance au stress hydrique terminal chez le blé, mise en évidence qui relève aussi bien de la « logique physiologique » (importance de l'épi dans la photosynthèse et de la transpiration après l'anthèse) que de mises en évidence expérimentales (corrélations entre caractères de l'épi et indices de sensibilité). Au cours de la phase de remplissage du grain, l'épi assurerait au minimum, et en conditions favorables, 13 % de la photosynthèse [9] ; en conditions de déficit hydrique, le rôle de l'épi devient plus important que celui des dernières feuilles [30], du fait de la sénescence de ces dernières ; cela est particulièrement vrai chez le blé dur [24].

Validation des caractères morphophysiologiques de tolérance au déficit hydrique (sélection divergente, lignées isogéniques)

Les paramètres morphophysiologiques retenus ne peuvent, en toute rigueur, être utilisés en sélection qu'après que leur rôle effectif dans la tolérance ait été vérifié, et que leur héritabilité soit suffisante pour donner prise à la sélection. La validation du rôle de ces caractères peut être effectuée, soit en créant des lignées isogéniques, soit en appliquant

un schéma de sélection divergente. La création de lignées isogéniques n'est en fait, en l'état actuel des recherches, réalisable que pour des caractères morphologiques simples : des lignées isogéniques pour la glaucescence ont par exemple permis à Nachit *et al.* [41] de démontrer le rôle de ce caractère dans l'utilisation de l'eau par la plante. Dans le cas de caractères physiologiques (à déterminisme génétique plus complexe), il est plus réaliste d'envisager la création de lignées issues de sélections divergentes. Un exemple de schéma de sélection divergente est présenté par Acevedo et Ceccarelli [1] ; un poster présenté au cours de ce colloque (Al Hakimi et Monneveux) donne également un exemple de sélection divergente pour divers caractères morpho-physiologiques, conduite sur des populations issues de croisements interspécifiques.

Étude génétique des caractères morphophysiologiques de tolérance au déficit hydrique

L'étude génétique des caractères de tolérance au déficit hydrique implique d'étudier ces caractères sur des populations ségrégantes F2, F3, et éventuellement BC1. La principale difficulté, sur le plan expérimental, réside alors dans le fait que les mesures physiologiques souvent lourdes et parfois longues doivent être conduites sur un grand nombre d'individus hétérozygotes différents, ce qui interdit par ailleurs toute répétition des mesures. Il n'est dès lors pas étonnant que les études de transmission ou d'héritabilité des caractères physiologiques soient peu nombreuses.

La création d'haploïdes doublés permet de surmonter partiellement cette difficulté (en permettant de travailler sur des groupes d'individus homozygotes), sans résoudre toutefois le problème du nombre d'individus à tester ; cette technique reste par ailleurs mal maîtrisée chez certaines espèces (blé tendre et surtout blé dur).

Le développement des techniques de biologie moléculaire nous fournit en revanche de nouveaux outils pour l'analyse génétique de la tolérance.

Recherche de marqueurs moléculaires des caractères morphophysiologiques d'adaptation

Face aux difficultés d'utilisation de « critères physiologiques de prédiction » en sélection, le développement des outils de marquage moléculaire est susceptible d'apporter d'importants éléments de réponse, l'idée de base étant de rechercher des relations entre la présence de certains marqueurs et certains mécanismes physiologiques liés à la tolérance. La mise en œuvre de cette démarche passe donc par une analyse du polymorphisme, soit au niveau des protéines, soit au niveau de l'ADN.

L'étude du polymorphisme protéique peut concerner soit des protéines de réserve, soit des protéines enzymatiques. L'analyse des protéines de réserve et isoenzymes s'intéresse à un nombre limité de protéines de fonction connues analysables après une séparation selon la charge ou la masse moléculaire (électrophorèse monodimensionnelle). L'électrophorèse bidimensionnelle permet, en rajoutant une dimension de séparation selon le point isoélectrique, l'analyse de l'ensemble des protéines d'un organe donné ; elle est cependant plus lourde à mettre en œuvre. Ces techniques sont intéressantes et sont également relativement peu coûteuses et rapides, mais le nombre de sys-

tèmes utilisables est limité : dans les deux cas, les marqueurs sont dépendants des conditions environnementales qui modifient l'expression du génome.

L'analyse du polymorphisme de l'ADN est menée actuellement sur la base de trois techniques : RFLP *(restriction fragment lenght polymorphism)*, RAPD *(random amplified polymorphic DNA)*, ADN satellites [44]. Ces techniques permettent de révéler un polymorphisme de taille entre fragments d'ADN révélés par une sonde homologue ou amplifiés à partir d'amorces données. Les stratégies d'utilisation de marqueurs en vue de l'amélioration génétique de la tolérance à la sécheresse peuvent quant à elles être regroupées autour de trois axes : l'étude des mécanismes moléculaires de réponse au stress, la localisation de marqueurs de tolérance inductibles par le stress hydrique, et la recherche de QTL *(quantitative trait loci,* locus contrôlant des caractères quantitatifs).

Étude des mécanismes moléculaires de réponse au stress

Celle-ci consiste à induire un stress sur une plante entière, puis à suivre les modifications induites par ce stress au niveau des protéines ou des ARN messagers ; on peut ensuite « remonter » aux gènes correspondants en utilisant les protéines ou ARNm spécifiques du stress comme sonde pour cribler des « banques de gènes » constituées par l'ADN d'une plante, fragmenté et isolé par morceaux dans des vecteurs de clonage qui permettent leur amplification par une bactérie. Des résultats intéressants ont été également obtenus par des suivis de l'expression génique au cours du développement, et en particulier, au cours de la phase de déshydratation du grain, qui représente une situation de stress hydrique naturelle. Un ensemble de gènes régulés au cours du stress hydrique ont ainsi pu être mis en évidence [17, 32]. De la séquence des gènes, on a pu déduire la séquence des protéines correspondantes ; la plupart de ces protéines (déhydrines, *late embryogenesis abundant proteins, responsive to abscicic acid proteins,* germines, *prolin rich proteins, hydroxyprolin rich proteins)* présentent des similitudes de structure, et d'abondance en certains acides aminés (proline, glycine, sérine). Il est possible d'utiliser les gènes identifiés pour transformer des plantes et étudier ainsi le rôle du gène dans la plante transgénique obtenue ; l'étude des séquences régulatrices présentes en amont de ces gènes et des éléments régulateurs agissant en « trans » (c'est-à-dire codés en un autre endroit du génome) doit par ailleurs permettre d'aborder le problème de la régulation génique [39].

Ce premier axe de travail amène toutefois à se poser une série de questions :

– Les gènes induits par le stress ont-ils un rôle effectif dans l'acquisition de la tolérance, ou bien ne font-ils que marquer un état de stress ?

– Comment relier ces gènes aux mécanismes et critères physiologiques préalablement définis, et comment les utiliser dans un schéma de sélection ?

Notre laboratoire est impliqué dans la recherche et la localisation de marqueurs de tolérance inductibles par le stress hydrique. La démarche consiste à comparer des profils protéiques, des cinétiques d'accumulation d'ARN messagers ou de leurs produits de traduction dans un système acellulaire chez des génotypes à comportement « contrasté ». Ce type d'étude a déjà été réalisé sur la tolérance au froid [28], et sur la résistance aux hautes températures [45]. Nous avons entamé cette étude sur plusieurs génotypes d'orge à comportement contrasté vis-à-vis de la sécheresse, avec l'espoir de trouver des marqueurs protéiques de tolérance.

Étude du polymorphisme RFLP de marqueurs moléculaires et relation avec la tolérance au stress

Un polymorphisme de type RFLP peut être recherché sur un grand nombre de génotypes à comportement contrasté, en vue de repérer des corrélations entre le polymorphisme observé et les différences de comportement vis-à-vis du stress ; si des corrélations statistiques fortes peuvent être notées entre la présence d'allèles donnés au locus de certains marqueurs et un caractère donné de tolérance, ces relations marqueurs / caractères doivent être alors validées par l'étude de populations en ségrégation. On utilisera de préférence comme sondes, des séquences ADNc ou génomiques correspondant à des gènes impliqués dans la réponse au stress hydrique ; un tel travail a été engagé par Weng et Nguyen [45] et Nachit *et al.* [41]. Les allèles statistiquement corrélés à un caractère de tolérance pourraient correspondre à une séquence codant pour un gène plus « efficace » dans la réponse au stress. En utilisant des marqueurs anonymes de type RAPD, il pourrait être possible d'associer un fragment donné à une tolérance et définir ainsi de nouveaux marqueurs « candidats » pour la tolérance au stress hydrique.

Recherche de marqueurs liés à la sécheresse, par l'approche QTL et gènes candidats

Le sens de la démarche est ici de localiser des zones du génome impliquées dans les variations de caractères quantitatifs, donc de type multigénique [33]. Pour ce faire, on mesure les valeurs du caractère sur une « descendance en ségrégation » (BC, F2, haploïdes doublés) sur laquelle a été préalablement établie une carte génétique sommaire ; on suit alors la coségrégation de marqueurs et de caractères physiologiques ou agronomiques intéressants. S'il existe des QTL intervenant dans la tolérance à la sécheresse, chacun d'eux sera entouré de marqueurs qui n'en sont pas trop distants : on pourra donc exploiter les fréquences de recombinaison entre les QTL et leurs « marqueurs bordants » dans des populations en ségrégation. Parallèlement, le positionnement des gènes candidats sur cette même cartographie à proximité des QTL permettrait une validation concomittante de ces deux types de marqueurs. Ce type de démarche fait actuellement l'objet de recherche sur maïs (GIS Moulon) et sur orge (ENSA-INRA Montpellier). A terme, et ayant défini des marqueurs moléculaires liés aux caractères de tolérance, il devrait être possible de suivre plus facilement leur évolution dans un programme de sélection assistée par marqueurs. Le type le plus simple de sélection assistée par marqueurs pour améliorer la tolérance à la sécheresse est sans doute l'introgression de caractères apportés par des ressources génétiques issues d'espèces voisines, d'où l'intérêt de leur étude.

Problème de l'utilisation de ressources génétiques « à base large »

Dans la plupart des programmes de sélection (et en particulier dans ceux animés par l'espérance d'une rentabilité à court terme), les croisements sont souvent limités à du matériel « amélioré ». En fait, il faut bien reconnaître que l'intérêt du sélectionneur pour les variétés locales (et *a fortiori* pour les espèces sauvages apparentées) a été freiné par plusieurs constatations :

– les variétés connues comme très tolérantes à la sécheresse (Oued Zenati, Haurani chez le blé dur, Tichedrett, Saïda, Albacete chez l'orge, pour n'en citer que quelques-unes) n'expriment cette tolérance que dans des milieux (= combinaisons de stress) très particuliers, très spécifiques ; des études comparatives de variétés « à adaptation locale » et de variétés plus productives et à « adaptation large » ont permis de montrer que le comportement de ces premières s'expliquait surtout par des caractères morphologiques (faible indice de récolte, enracinement profond) ou par des caractères physiologiques très précis conduisant à une adaptation très stricte à un milieu donné [5, 6] ; ces mêmes variétés locales semblent d'ailleurs jouir d'une moindre capacité d'ajustement osmotique que les variétés à large adaptation [6, 34, 37]. Dans le cas d'espèces sauvages voisines apparentées, la variabilité intraspécifique souvent considérable des caractères morphophysiologiques d'adaptation oblige à des opérations de tri et de criblage beaucoup plus lourdes. Enfin, le niveau très faible de productivité de ce type de matériel encourage peu les sélectionneurs à l'utiliser ;

– des résultats encourageants quant à la création de matériel génétique combinant une productivité élevée et un niveau satisfaisant de tolérance à la sécheresse ont, à l'inverse, été obtenus. La variété d'orge Zaïda, obtenue en 1987 par Molina-Cano, et qui présente une bonne adaptation à diverses zones semi-arides de l'Espagne, provient d'un croisement entre les variétés Union et Adora, originaires d'Europe centrale, et très productives ; des variétés de blé dur telles que Cham 1, Om Rabi 5, ou Om Rabi 17, obtenues par l'ICARDA *(International Center for Agricultural Research in Dry Areas)* combinent un niveau élevé de productivité et une bonne adaptation aux conditions méditerranéennes. Ces comportements peuvent s'expliquer en considérant que des « effets résiduels » de productivité ont été conservés (même si la signification physiologique de ces « effets » reste à élucider), et/ou que les caractères de tolérance présents dans ces matériels sont des caractères inductibles, à faible coût énergétique, non antagonistes du rendement.

Le risque apparaît donc très grand, en ayant recours à des ressources génétiques « à base large », d'introduire des caractères de tolérance liés en fait à des caractéristiques d'architecture (forte production de biomasse végétative et faible indice de récolte « tamponnant » les effets du stress sur la production de grain) antagonistes d'une haute productivité (un risque que l'attrait mythique d'un retour aux ressources sauvages ou originelles ne suffit pas à compenser !). Des résultats encourageants ont certes été obtenus dans le cas du blé dur à partir de croisements interspécifiques au sein du groupe tétraploïde [49], mais il s'agissait en fait d'espèces primitives assez proches et parfois domestiquées (*T. dicoccum*, *T. polonicum*, *T. carthlicum*). L'utilisation de ressources génétiques sauvages pour l'amélioration de la tolérance aux stress (espèces du genre *Aegilops* en l'occurrence dans le cas du blé) nous semble requérir deux conditions préalables :

– une meilleure connaissance de la physiologie des ressources sauvages, et en particulier des mécanismes d'adaptation aux stress, afin d'être en mesure d'identifier les caractères dont le transfert chez l'espèce cultivée puisse s'effectuer sans érosion de la potentialité de rendement ;

– la recherche de marqueurs moléculaires permettant d'évaluer la variabilité intra et interspécifique, de suivre les introgressions, et la transmission des caractères physiologiques dans les descendances.

Conclusion

La tolérance à la sécheresse est un phénomène complexe, faisant intervenir, face à la pression erratique des contraintes environnementales, de nombreux mécanismes interactifs, et à déterminisme génétique complexe. Face à cette réalité, l'amélioration génétique de la tolérance à la sécheresse ne peut se contenter ni d'une amélioration empirique (qui a d'ores et déjà montré ses limites), ni d'une introduction « à l'aveugle » de caractères de tolérance chez des génotypes productifs. La stratégie à mettre en œuvre dans une telle situation nous semble devoir prendre en compte plusieurs niveaux d'intégration, en définissant pour chacun d'eux un objectif spécifique ; la description du comportement global dans des milieux donnés, la caractérisation physiologique, l'analyse génétique des caractères, et la recherche de marqueurs pour ces caractères apparaissent ainsi comme autant de maillons dans une chaîne faisant intervenir des connaissances et compétences en matière de physiologie, génétique, et biologie moléculaire. La mise en place de programmes basés sur de telles stratégies (Figure 2) requiert donc la constitution d'équipes pluridisciplinaires et la mise en place de larges collaborations.

Références

1. Acevedo E, Ceccarelli S (1989). Role of physiologist-breeder in a breeding program for drought tolerance conditions. In : FWG Baker, ed. *Drought resistance in cereals,* CAB International : 117-139.
2. Acevedo E (1991). Improvement of winter cereals in Mediterranean environments. Use of yield, morphological and physiological traits. In : *Physiology-Breeding of winter cereals for stressed mediterranean environments,* INRA-ICARDA, Montpellier (France) : 273-306.
3. Acevedo E (1992). Morphological traits of adaptation of cereals to Mediterranean environments. In : *Improvement and management of winter cereals under temperature, drought and salinity stress,* ICARDA-INIA, Cordoba (Spain) : 85-96.
4. Ali Dib T (1992). Contribution à l'étude de la tolérance à la sécheresse chez le blé dur *(Triticum durum* Desf.). Étude de la diversité des caractères phénologiques et morphophysiologiques d'adaptation. Thèse ENSA-Montpellier Sciences Agronomiques, 186p.
5. 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.
6. Ali Dib T, Monneveux P, Araus JL (1992). Adaptation à la sécheresse et notion d'idéotype chez le blé dur. II. Caractères physiologiques d'adaptation. *Agronomie* 12 : 381-393.
7. Amri A, Mekni MS (1991). Barley breeding strategies under rained conditions of Morocco. In : *Physiology-Breeding of winter cereals for stressed mediterranean environments,* INRA-ICARDA, Montpellier (France) : 161-178.
8. Bidinger FR, Mahalakshmi V, Talukdar BS, Alagarswamy G (1987). Improvement of drought resistance in millet. In : *Drought resistance in crop plants with emphasis on rice.* International Rice Research Institute, Los Banos (Philippines) : 357-365.
9. Biscoe PV, Gallagher J, Littleton EJ, Monteith JL, Scott RK (1975). Barley and its environment. Sources of assimilates. *J Appl Ecol* 12 : 295-302.
10. Blum A, Mayer J, Gozlan G (1983). Associations between plant production and some physiological components of drought resistance in wheat. *Plant, Cell and Environment* 6 : 219-225.
11. Blum A (1989). Osmotic adjustment and growth of barley genotypes under drought stress. *Crop Sci* 29 : 230-233.
12. Bogyo TP, Russell TS, Konzak CF (1973). The analysis of genotype-environment interac-

tion on durum wheat. In : Scarascia-Mugnosa GI, ed. *Genetics and Breeding of durum wheat,* Bari (Italy) : 413-435.
13. Boyer JS (1985). Water transport. *Ann Rev Plant Physiol* 36 : 473-516.
14. Brennan PS, Byth DE (1979). Genotype x environmental interactions for wheat yields and selection for widely adapted wheat genotypes. *Aust J Agric Res* 30 : 221-227.
15. Ceccarelli S (1989). Wide adaptation : how wide ? *Euophytica* 40 : 197-205.
16. Daday HF, Biner E, Grassia A, Peak JW (1973). The effect of environment on heritability and predicted selection response in *Medicago sativa. Heredity* 31 : 293.
17. Delseny M, Gaubier P, Hull G, Saez-Vasquez J, Gallois P, Raynal M, Cooke R, Grellet F (1993). Nuclear genes expressed during seed dessication : relationship with response to stress. In : *Stress induced gene expression,* Harwood Academic Reading (UK).
18. Finlay KW, Wilkinson GN (1963). The analysis of adaptation in a plant breeding program. *Aust J Agric Res* 14 : 742.
19. Fischer RA, Maurer R (1978). Drought resistance in spring wheat cultivars. Grain yield responses. *Aust J Agric Res* 29 : 897.
20. Fox PN, Rosielle AA (1982). Reference sets of genotypes and selection for yield in unpredictable environments. *Crop Sci* 22 : 1171-1176.
21. Freeman GH (1973). Statistical methods for the analysis of genotype x environment interactions. *Heredity* 31 : 339-345.
22. Frey KJ (1964). Adaptation reaction of oat strains selected under stress and non-stress environmental conditions. *Crop Sci* 4 : 55-61.
23. Garcia del Moral LF, Ramos JM (1992). Identification des paramètres morphophysiologiques d'adaptation aux contraintes environnementales. Adaptation de l'orge dans le sud de l'Espagne. In : *Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale.* Colloque INRA-ENSA-AGROPOLIS, Montpellier (France), à paraître (Colloque INRA n° 64).
24. Gate P, Bouthier A, Casabianca H, Deleens E (1993). Caractères physiologiques décrivant la tolérance à la sécheresse des blés cultivés en France : interprétation des corrélations entre le rendement et la composition isotopique des grains. In : *Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale.* Colloque INRA-ENSA-AGROPOLIS, Montpellier (France), à paraître (Colloque INRA n°64).
25. Gauch HG (1988). Model selection and validation for yield trials with interaction. *Biometrics* 40 : 705-715.
26. Hardwick RC, Wood JT (1972). Regression methods for studying genotype-environment interactions. *Heredity* 28 : 209-222.
27. Hewstone C (1979). El analisis de grupos de experimentos y de las relaciones del genotipo y el medio ambiente sobre el rendimiento de variedades comerciales de trigo. In : *Analisis del rendimiento de variedades comerciales de trigo y de algunos factores del medio ambiente que lo afectan en el sur de Chile,* Publication INIA n°11, Temuco (Chile), 3-19.
28. Houde M, Dhindsa RS, Sarhan F (1992). A molecular marker to select for freezing tolerance in *gramineae. Mol Gen Genet* 234 : 43-48.
29. Hsiao TC, Oliveira EC, Hall WM (1978). Adaptation of cotton leaves to water stress. *Plant Physiol* 61 : 80-86.
30. Johnson RR, Moss DN (1976). Effect of water stress on $14CO_2$ fixation and translocation in wheat during grain filling. *Crop Sci* 14 : 728-731.
31. Kempton RA (1984). The use of the biplots in interpreting variety by environment interactions. *Biometrics* 88 : 705-715.
32. Ledoigt G, Coudret A (1992). Stress hydrique : étude des mécanismes moléculaires et des modifications de l'expression du génome. *Bull Soc Bot Fr* 139 : 175-190.
33. Lefort-Buson M, Rodolphe F, Charcosset A (1990). De nouvelles perspectives pour l'analyse génétique des caractères quantitatifs. A la recherche des locus importants. *Biofutur :* 30-37.
34. Lewicki S (1993). Évaluation de paramètres liés à l'état hydrique chez le blé dur *(Triticum durum* Desf.) et l'orge *(Hordeum vulgare* L.), soumis à un déficit hydrique modéré, en vue d'une application à la sélection de génotypes tolérants. Thèse ENSA-Montpellier : 87 p.

35. Ludlow MM, Fischer MJ, Wilson JR (1985). Stomatal adjustment to water deficits in three tropical grasses and tropical legumes grown in controlled conditions and in the field. *Aust J Plant Physiol* 12 : 131-139.
36. 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,* AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext : 165-186.
37. Monneveux P, Chaballier C, Lewicki S, Lafarga A, Sombrero R, Romagosa I (1992). Étude du comportement de lignées d'orge dans différentes conditions de sécheresse en Espagne. Estimation du rôle de la capacité d'ajustement osmotique dans l'adaptation à la variabilité environnementale. In : *Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale.* Colloque INRA-ENSA-AGROPOLIS, Montpellier (France) : 64 : 217-237.
38. Morgan JM, Hare RA, Fletcher RJ (1986). Genetic variation in osmoregulation in bread and durum wheats and its relationship to grain yields in a range of field environments. *Aust J Agric Res* 37 : 449-457.
39. Mundy J, Shinozaki K, Chua N (1990). Nuclear proteins bind conserved elements in the abscissic acid responsive promoter of rice rab gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 1406-1410.
40. Nachit M, Ketata H (1991). Selection of morphophysiological traits for multiple abiotic stresses resistance in durum wheat *(Triticum turgidum* L. var. *durum).* In : *Physiology-Breeding of winter cereals for stressed mediterranean environments,* INRA-ICARDA, Montpellier (France) : 273-306.
41. Nachit M, Nachit G, Keteta H, Gauch HG, Zobel RW (1992). Use of AMMI and linear regression models to analyze genotype-environment interaction in durum wheat. *Theor Appl Genet* 83 : 597-601.
42. Pedersen AR, Everson EH, Grafius JE (1978) The gene pool concept as a basis for cultivar selection and recommendation. *Crop Sci* 18 : 883-886.
43. Reitz LP (1974). Breeding for more efficient water-use – is it real or a mirage ? *Agric Meteorol :* 14 : 3-7.
44. 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), à paraître (Colloque INRA n° 64).
45. Weng J, Nguyen HT (1992). Differences in the heat-shock response between thermotolerant and thermosusceptible cultivars of hexaploïd wheat. *Theor Appl Genet :* 84 : 941-946.
46. Wright AJ (1971). The analysis and prediction of some two factor interactions in grass breeding. *J Agric Sci* 76 : 301-306.
47. Zobel RW, Wright MJ, Gauch HG (1988). Statistical analysis of a yield trial. *Agron J* 80 : 388-393.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1995, pp. 165-171.

17

Cancer végétal *in vitro* : aspects morphogénétiques et biochimiques

T. GASPAR [1], C. KEVERS [1], B. BISBIS [1], M. CRÈVECŒUR [2], C. PENEL [2], H. GREPPIN [2], F. LE DILY [3], J.-P. BILLARD [3], C. HUAULT [3], J.-M. FOIDART [4]

1. Université de Liège, Institut de Botanique B22, Sart Tilman, B-4000 Liège, Belgique.
2. Université de Genève, Physiologie végétale, 3, place de l'Université, CH-1211 Genève, Suisse.
3. Université de Caen, Physiologie végétale, F-14032 Caen, France.
4. Université de Liège, Biologie générale, CHU, B 23, B-4000 Liège, Belgique.

Les notions de cancer végétal et de cellules cancéreuses sont restées très vagues en biologie végétale et le plus souvent associées aux tumeurs induites par des bactéries ou des virus [4, 7, 16]. Le cancer végétal induit en l'absence de pathogènes est rarement décrit même si les termes de néoplasmes végétaux et de progression néoplasique sont cités [38]. Les cals dits habitués (anergiés ou accoutumés aux hormones), c'est-à-dire ne nécessitant pas d'auxine ou pas de cytokinine, ou les 2, pour leur croissance, sont généralement classés comme tumeurs en parallèle aux tumeurs « génétiques » résultant d'hybrides interspécifiques [3, 40]. Nous avons eu la chance d'étudier une lignée de cellules habituées, totalement indépendantes d'auxines et de cytokinines exogènes. Leur caractérisation morphologique et biochimique [5, 9, 10, 14, 15, 20, 23, 25, 33, 35] nous a amenés à les considérer comme des cellules vitrifiées (hyperhydriques) d'abord [10, 14], puis comme de véritables cellules cancéreuses, comparables à des cellules cancéreuses animales [15, 17, 23]. Cela nous conduit à préciser ci-dessous la notion de cancer végétal à l'état cellulaire. Étudiant par ailleurs le processus de vitrification (malformations hyperhydriques) de pousses feuillées en cours de micropropagation [13, 15, 17], nous avons rencontré des situations où la subculture de pousses vitrifiées en conditions vitrifiantes conduisait à leur habituation, avec acquisition de caractères morphologiques et biochimiques comparables à ceux de cals habitués. Les

nécroses d'apex et la perte progressive de totipotence qui en résultent accompagnent une progression néoplasique et une cancérisation générale, en l'absence de pathogènes, que nous pouvons maintenant mieux préciser à l'état organismique. Habituation et vitrification peuvent donc être considérés comme des processus faisant partie de ces progressions néoplasiques chez les végétaux.

Cal habitué = cal vitrifié ?

L'habituation est généralement considérée comme un processus réversible (le processus serait donc de nature épigénétique), et la plupart des cellules habituées décrites dans la littérature, d'apparence normale, gardent en principe toute ou une partie de leur totipotence, c'est-à-dire la capacité de régénérer des bourgeons, des racines, ou des embryons somatiques [31, 37]. Ainsi en va-t-il d'une lignée cellulaire chlorophyllienne de betterave, habituée aux auxines et aux cytokinines, et régénérant automatiquement, sans traitement particulier, des pousses feuillées [28]. Mais cette lignée, ne répondant plus à l'apport exogène d'auxine, s'avère incapable de régénérer des racines, et peut être considérée comme ayant perdu une partie de sa totipotence organogène. Des cellules blanches, peu ou pas chlorophylliennes, apparaissant sporadiquement sous forme de petits clones (d'origine monoclonale ?) à la surface de cals habitués verts organogènes ont été isolées et ont fourni la lignée cellulaire habituée non organogène [27] que nous décrivons ici. Ces cellules peuvent être considérées comme vitreuses [9, 14].

Comme les cellules de pousses vitrifiées, en effet :

– elles sont peu chlorophylliennes [9, 14, 25, 34] et apparaissent glauques, translucides ;

– elles sont hyperhydriques [9, 14], en faisant remarquer que le surplus d'eau se trouve surtout dans les espaces intercellulaires et dans des parois jouant le rôle d'éponges [30] ;

– les parois sont déficientes en cellulose et en lignine [9, 14, 20, 21], ce qui permet la formation de hernies cytoplasmiques apparemment nues au travers de leurs mailles [23] ;

– l'hyperlignification se traduit par l'absence de différenciation de cellules ligneuses, en particulier d'éléments xylémiques [9, 14] ;

– elles sont friables ; cette dissociation aisée étant à rapprocher de la fragilité des pousses vitrifiées qui sont cassantes ;

– elles se nécrosent rapidement lorsqu'elles ne sont pas subcultivées sur milieux frais régulièrement, ce qui est à rapprocher des nécroses de bordure de feuilles jeunes et des apex chez les pousses vitrifiées ;

– biochimiquement, elles manifestent une forte activité glutamate déshydrogénase, accumulent du glutamate [32, 34] et produisent peu d'éthylène [22].

Cellules habituées = cellules cancéreuses ?

Il existe différents degrés d'habituation aux hormones et sans doute tous les types de cellules habituées n'ont-elles pas toutes les mêmes caractéristiques. Celles qui appartiennent au cal habitué non-organogène de betterave décrit ci-dessus présentent cepen-

dant toute une série de caractéristiques [1] qui les ont fait reconnaître comme de véritables cellules cancéreuses :

– leur origine monoclonale [27],

– leur degré de juvénilité (rapport nucléo-cytoplasmique élevé ; paroi peu ou pas différenciée) et leur taux élevé de réplication [20, 23],

– leur indépendance hormonale,

– leur degré de polyploïdie et d'aneuploïdie, associé aux noyaux volumineux, polyinvaginés, avec plusieurs nucléoles et peut-être fragmentés en micronoyaux [20],

– leur friabilité correspondant à une perte de mécanismes spécifiques d'adhésion cellulaire [36] comparable à celle qui caractérise des métastases animales,

– des caractéristiques biochimiques comme l'accumulation de malonyldialdéhyde [19], une teneur élevée en diacylglycérol et un turnover accéléré des inositol-phosphates [12], une déviation des sucres dans la voie des pentose-phosphates [5].

Cette cancérisation cellulaire végétale, à son état terminal, pourrait être caractérisée non seulement par l'absence de différenciation cellulaire, mais surtout par l'incapacité de telles cellules à se réorganiser en méristèmes primaires (les cals normaux croissent autour de points méristématiques ; dans le cal habitué non-organogène, chaque cellule se multiplie indépendamment des autres, sans méristèmes). La perte irréversible de totipotence organogène en résulterait, comme aboutissement d'une progression néoplasique, telle qu'esquissée au Tableau I.

Tableau I. Quelques étapes d'une progression néoplasique *in vitro* aboutissant à des cellules totalement habituées et non-organogènes.

Matériel	Autonomie hormonale (auxines et cytokinines in vitro)	Méristèmes ou points méristématiques	Totipotence
Organes et tissus d'une plante-mère	–	+	+
Cal normal	–	+	+
Cal habitué organogène	+	+	partielle
Cal habitué non-organogène	+	–	– (irréversible)

Vitrification, habituation et cancérisation à l'état organismique

Les malformations hyperhydriques accompagnant la vitrification des pousses feuillées ont été bien décrites [13, 17, 41]. Si elles ne résultent pas directement d'un disfonctionnement des méristèmes primaires apicaux ou axillaires, elles doivent bien traduire, à côté d'une différenciation cellulaire déficiente des parois, une perturbation des facteurs

d'organisation tissulaire. La vitrification est d'ailleurs considérée généralement comme un processus réversible, entendant par là que placés en conditions non-vitrifiantes, des méristèmes de pousses vitrifiées peuvent générer des pousses feuillées normales.

Ce qu'on sait moins, et qui est peut-être moins courant, c'est que la subculture répétée de pousses vitrifiées en conditions vitrifiantes conduit à leur habituation : à partir d'un certain stade, de telles pousses continuent de proliférer en l'absence d'apport de régulateurs exogènes mais les organes formés sont de plus en plus anormaux. Des signes de disfonctionnement des méristèmes primaires se manifestent avec l'apparition de tiges fasciées. De telles pousses habituées ont perdu la faculté de s'enraciner, et ne répondent pas à l'apport d'auxine exogène. Il y a donc perte partielle de totipotence. Des nécroses d'apex se font de plus en plus fréquentes, et il arrive un moment où elles sont généralisées : cette mort subite des pousses feuillées par lâchage des méristèmes n'est-elle pas l'équivalent de l'arrêt de fonctionnement du cœur ? Et, dans les présentes circonstances, à la suite d'un cancer généralisé où les cellules du méristème, entre autres mécanismes, avaient perdu le contact par adhésion cellulaire, avec le reste de l'organisme ? Toutes les cellules de pousses feuillées où les apex se nécrosent ne sont cependant pas mortes. En culture *in vitro*, la base de telles pousses génère un cal (blanc) habitué non organogène [17]. C'est la perte totale et irréversible de la totipotence organogène caractérisant le cancer à l'état organismique à sa phase terminale : perte des méristèmes existants et incapacité des cellules restées vivantes et proliférant de se réorganiser en méristèmes primaires organogènes. Cette perte totale de totipotence est l'aboutissement d'une progression néoplasique à l'état organismique telle qu'on peut l'esquisser au Tableau II.

Tableau II. Quelques étapes d'une progression néoplasique *in vitro* aboutisant à des pousses feuilles habituées générant un cal habitué non-organogène

Matériel	Autonomie hormonale	Méristèmes	Organes formés	Situation des méristèmes
Organes d'une plante mère, souche en prolifération axillaire *in vitro*	–	Fonctionnent bien	Tiges et feuilles normales	Normale
Souche vitrifiée	–	Fonctionnent bien	Tiges et feuilles anormales	Réversible (pour tous les méristèmes)
Souche vitrifiée multipliée en conditions vitrifiantes	+	Fonctionnent mal	Tiges fasciées Feuilles très anormales	Réversible (pour certains méristèmes)
Souche précédente subcultivée en conditions vitrifiantes	+	Fonctionnent anormalement	Organes aberrants	Irréversible (nécrose)
Cal formé à la base	+	Absents	Aucun	–

Cancérisation en l'absence de pathogènes

Des tumeurs et des cancers animaux peuvent être provoqués par des radiations, des composés chimiques et des stress divers [1, 16]. La vitrification (et l'habituation qui peut suivre) est généralement considérée comme une réponse adaptative à plusieurs stress simultanés :

– les blessures inhérentes à la découpe des explants et au repiquage ;

– la quantité et/ou la qualité des cytokinines, ou le thidiazuron (celui-ci est considéré comme cancérigène en biologie animale [4]) utilisés ;

– la quantité d'ions ammonium dans les milieux de culture ;

– l'infiltration des espaces intercellulaires par les éléments des milieux de culture (facilitée dans les milieux mous [6]) et l'anoxie et/ou le choc osmotique qui peuvent en résulter [30] ;

– l'humidité atmosphérique à l'intérieur des flacons de culture ;

– le confinement gazeux (éthylène et autres gaz) ;

– etc.

Une étude récente sur des pousses en voie de vitrification contrôlée nous a indiqué (résultats non publiés) que leurs tissus, s'ils avaient vu leur activité superoxide dismutase augmenter, avaient au contraire une activité diminuée de leurs autres enzymes de défense (ascorbate peroxydase et glutathion réductase, notamment) contre les formes actives de l'oxygène générées à la suite de stress. L'accumulation de telles formes actives de l'oxygène initie-t-elle un stress oxydatif [16, 33] ou est-ce l'aboutissement de dérégulations métaboliques, en relation avec les nécroses constatées ? Dans des extraits du cal habitué non-organogène (cancéreux) de betterave, les enzymes de protection contre les formes actives de l'oxygène ont une activité plus élevée que dans des extraits de cellules normales [24], mais on ne peut affirmer que ces enzymes fonctionnent bien *in situ* parce qu'on ne mesure pas d'acide ascorbique notamment. Des extraits de ces cellules habituées [26] et des cellules entières [8] manifestent un important pouvoir réducteur. L'interprétation de déviations métaboliques spécifiques à ces cellules cancéreuses, entre autres une déficience en composés tétrapyrroliques [14, 21, 27, 28, 29, 35], une accumulation de produits azotés tels le glutamate, la proline, les polyamines [18, 32, 34], une orientation des sucres dans la voie des pentose-phosphates [5], l'accumulation de dérivés de l'acide benzoique [11], conclut cependant à une accumulation de formes toxiques de l'oxygène [34] et à considérer les cellules du cal habitué non-organogène sous stress permanent [35]. L'accumulation de malonyldialdehyde [2, 19], une composition membranaire modifiée [2, 22] et les nécroses pourraient traduire cette situation.

On se trouve donc confronté à des résultats et conclusions actuellement contradictoires. Les signes de stress sont cependant évidents. Une étude plus approfondie de la réaction des végétaux à chacun des stress supposés dans les conditions particulières des cultures *in vitro* s'avère indispensable.

Références

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Rass M, Roberts K, Watson J (1989). Cancer. In : Alberts B, Bray D, Lewis J, Rass M, Roberts K, Watson J, eds. *Molecular Biology of the Cell,* 2nd Ed., Garland, NY : 1187-1216.

2. Arbillot J, Le Saos J, Billard JP, Boucaud J, Gaspar Th (1991). Changes in fatty acid and lipid composition in normal and habituated sugar beet calli. *Phytochem* 30 : 491-494.
3. Bayer MH (1982). Genetic tumors : physiological aspects of tumor formation in interspecies hybrids. In : Kahl G, Schell JS, eds. *Molecular Biology of Plant Tumors.* Acad Press, NY, 33-67.
4. Bednar TW, Linsmaiser-Bednar EM (1989). Chemical carcinogenesis in plants and interaction with viruses and cancer causation. In : Kaiser HE, ed. *Comparative Aspects of Tumor Development.* Kluwer Acad Publ, Dordrecht : 240-248.
5. Bisbis B, Le Dily F, Kevers C, Billard JP, Huault C, Gaspar Th (1993). Disturbed sugar metabolism in a fully habituated nonorganogenic callus of *Beta vulgaris* (L.). *Plant Growth Regulation* 13 : 257-261.
6. Böttcher I, Göring H (1987). Die Vitrifikation der Pflanzen bei der *in vitro*-Kultur als Infiltration Problem. *Biol Rundsch* 25 : 191-193.
7. Braun AC (1978). Plant tumors. *Biochem Biophys Acta* 516 : 167-191.
8. Carrie B, Gaspar Th, Greppin H, Penel C (1994). Redox characteristics of normal and habituated cell lines of sugarbeet. *Plant Cell Environment* 17 : 457-461.
9. Crèvecœur M, Kevers C, Greppin H, Gaspar Th (1987). A comparative biochemical and cytological characterization of normal and habituated sugarbeet calli. *Biol Plant* 29 : 1-6.
10. Crèvecœur M, Hagege D, Catesson AM, Greppin H, Gaspar Th (1992). Ultrastructural characteristics of cells from normal and habituated sugar beet calli. *Plant Physiol Biochem* 30 : 87-95.
11. Engelmann I, Macheix JJ, Gaspar Th (1993). Phenolic compounds in hormone-dependent and independent sugarbeet callus lines compared to donor-plants. *Saussurea* 24 : 15-21.
12. Feutry S, Poder D, Hagege D (1995). Embancement of diacylglycerol level and inositol phosphates turnover in fully habituated sugar beet cell line. *Plant Physiol Biochem* 33. In press..
13. Gaspar Th (1991). Vitrification in micropropagation. In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry.* Vol. 17. High-Tech and Micropropagation. Springer, Berlin : 116-126.
14. Gaspar Th, Kevers C, Penel C, Crèvecœur M, Greppin H (1988). Biochemical characterization of normal and habituated sugarbeet calli. Relationship with anatomy, habituation and organogenesis. *Potsdamer Forschungen* B 57 : 20-30.
15. Gaspar Th, Hagege D, Kevers C, Penel C, Crèvecœur M, Engelmann I, Greppin H, Foidart JM (1991). When plant teratomas turn into cancer in the absence of pathogens. *Physiol Plant* 83 : 691-701.
16. Gaspar Th, Hagege D, Penel C, Foidart JM, Greppin H (1992). *Peroxidases and plant cancer in the absence of pathogens.* In : Penel C, Gaspar Th, Greppin H, eds. *Plant Peroxidases.* 1980-1990. *Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects.* Univ. of Genève, Switzerland : 125-137.
17. Gaspar Th, Kevers C, Crèvecœur M, Penel C, Foidart JM, Greppin H (1992). Habituation and vitrification of plants cultured *in vitro :* a reciprocal relationship. Wiss. Zeitschr. Humboldt-Univ. Berlin, Mathem./Naturwiss. 41 : 35-40.
18. Hagege D, Kevers C, Boucaud J, Duyme M, Gaspar Th (1990). Polyamines, phospholipids, and peroxides in normal and habituated sugar beet calli. *J Plant Physiol* 136 : 641-645.
19. Hagege D, Nouvelot A, Boucaud J, Gaspar Th (1990). Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts : avoidance of pigment interference. *Phytochemical Analysis* 1 : 86-89.
20. Hagege D, Kevers C, Gaspar Th, Thorpe TA (1991). Abnormal growth of habituated sugarbeet calli and cell suspensions. *In Vitro Cell Dev Biol* 27 : 112-116.
21. Hagege D, Kevers C, Crèvecoeur M, Tollier MTh, Monties B, Gaspar Th (1991). Peroxidases, growth and differentiation of habituated sugarbeet cells. In : J. Lobarszewski *et al.* eds., *Molecular and Physiological Aspects of Plants Peroxidases.* Univ. de Genève 281-290.
22. Hagege D, Kevers C, Gaspar Th (1991). A comparison between ethylene production, ACC and mACC contents, and hydroperoxide level in normal and habituated sugarbeet calli. *Physiol Plant* 82 : 397-400.

23. Hagege D, Catania R, Micalef H, Gaspar Th (1992). Nuclear shape and DNA content of fully habituated nonorganogenic sugarbeet cells. *Protoplasma* 166 : 49-54.
24. Hagege D, Kevers C, Salabert Ph, Gaspar Th (1992). Protective systems against activated oxygen species compared in normal and fully habituated nonorganogenic sugarbeet calluses. *In Vitro Cell Dev Biol* 28P : 143-147.
25. Hagege D, Werck-Reichart D, Schmitt P, Gaspar Th (1992). Deficiency in tetrapyrrole-containing compounds in a non-organogenic habituated sugarbeet cell line. *Plant Physiol Biochem* 30 : 649-654.
26. Hagege D, Deby C, Kevers C, Foidart JM, Gaspar Th (1993). Anti-lipoperoxidant potential of the fully habituated nonorganogenic sugarbeet callus. *Arch Intern Physiol Biochim Biophys* 101 : 9.
27. Kevers C, Coumans M, De Greef W, Hofinger M, Gaspar Th (1981). Habituation in sugarbeet callus : auxin content, auxin protectors, peroxidase pattern and inhibitors. *Physiol Plant* 51 : 281-286.
28. Kevers C, Coumans M, De Greef W, Jacobs M, Gaspar Th (1981). Organogenesis in habituated sugarbeet callus : auxin content and protectors, peroxidase pattern and inhibitors. *Zeitschr Pflanzenphysiol* 101 : 79-87.
29. Kevers C, Sticher L, Penel C, Greppin H, Gaspar Th (1982). Calcium-controlled peroxidase secretion by sugarbeet cell suspensions in relation to habituation. *Plant Growth Regul* 1 : 61-66.
30. Kevers C, Gaspar Th (1986). Vitrification of carnation *in vitro* : changes in water content, extracellular space, air volume, and ion levels. *Physiol Veg* 24 : 647-653.
31. Krsnik-Rasol M (1991). Peroxidase as a developmental marker in plant tissue culture. *Int J Dev Biol* 35 : 259-263.
32. Le Dily F, Billard JP, Gaspar Th, Huault C (1993). Disturbed nitrogen metabolism associated with the hyperhydric status of fully habituated callus of sugarbeet. *Physiol Plant* 88 : 129-134.
33. Le Dily F, Billard JP, Huault C, Kevers C, Gaspar Th. Fully habituated sugarbeet callus : under permanent stress ? *In Vitro Cell Dev Biol.* 29P : 149-154.
34. Le Dily F, Huault C, Gaspar Th, Billard JP (1993). Does altered nitrogen metabolism and H_2O_2 accumulation explain the vitrified status of the fully habituated callus of *Beta vulgaris* (L.) ? *Plant Cell Tissue Organ Culture* 35 : 69-74.
35. Le Dily F, Kevers C, Huault C, Billard JP, Gaspar Th (1993). Peroxidase deficiency in plant cancer cells as resulting from deviated nitrogen and sugar metabolisms ? In : Welinder KG, Rasmussen SK, Penel C, Greppin H, eds. Proceedings IIIrd Intl Symposium : *Plant Peroxidases : Biochemistry and Physiology.* Univ. de Genève, Switzerland, 345-348.
36. Liners F, Gaspar Th, Van Cutsem P (1994). Acetyl- and methylesterification of pectins of friable and compact sugarbeet calli : consequences for intercellular adhesion. *Planta* 192 : 545-556.
37. Meins F Jr (1982). Habituation of cultured plant cells. In : Kahl G, Schell JS, eds. *Molecular Biology of Plant Tumors.* Acad. Press, NY : 3-31.
38. Pengelly WL (1989). Neoplastic progression in plants. In : Kaiser HE, ed. *Comparative Aspects of Tumor Development.* Kluwer Acad. Publ., Dordrecht : 15-23.
39. Schmitt P, Gaspar Th, Hagege D (1994). Sterol composition of normal and habituated sugarbeet calli *(Beta vulgaris* L. *altissima). In vitro Cell Dev Biol.* 30P : 1-3.
40. Serafini Fracassini D, Bagni N, Torrigiani P (1980). *Nicotiana glauca* x *Nicotania langsdorffii* tumor hybrid : growth, morphology, polyamines, and nucleic acids *in vitro. Can J Bot* 58 : 2285-2293.
41. Ziv M (1991). Vitrification : morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In : Debergh PC, Zimmerman RH, eds. *Micropropagation. Technology and Application.* Kluwer Acad. Publ., Dordrecht : 45-69.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1995, p. 173.

18

Les biopesticides

V. HEUZÉ, J. DESTAIN, PH. THONART

Centre Wallon de Biologie Industrielle, Belgique.

L'emploi des micro-organismes pour lutter contre les ennemis des cultures (biopesticides) est un moyen de protection phytosanitaire respectant l'environnement. En effet, la plupart des parasites (champignons, insectes, mauvaises herbes) des plantes ont un ou plusieurs ennemis microbiologiques naturels (bactéries, champignons, etc.). Mais pour garantir l'efficacité d'un biopesticide, il faut bien connaître le cycle de développement du parasite et les conditions d'activité de l'antagoniste. Le présent travail décrira la démarche conduisant à la mise au point d'une biopréparation.

La première étape consiste à sélectionner des antagonistes potentiels, généralement à partir du milieu naturel. La force de l'antagonisme *in vitro* constitue le premier critère de sélection, mais d'autres paramètres, tels que l'aptitude à adhérer aux surfaces biologiques, peuvent également intervenir dans ce processus.

Une fois le micro-organisme sélectionné, celui-ci doit être produit en grandes quantités. Cette production industrielle nécessite une infrastructure de base : le bioréacteur, et un savoir-faire détenu par les biotechnologues.

L'étape suivante doit permettre le conditionnement, la formulation des micro-organismes. C'est sans doute l'une des étapes les plus délicates puisqu'il faut :

- préserver l'intégrité de l'agent biologique,
- préserver son activité spécifique vis-à-vis du parasite,
- favoriser son installation et son développement sur le matériel traité.

La maîtrise technique de ces étapes est chaque jour améliorée. Néanmoins, les coûts de production pour de tels produits restent élevés et cela constitue un handicap des biopesticides vis-à-vis des produits chimiques classiques. C'est pourquoi, on préconise, pour l'heure, leur utilisation dans des exploitations horticoles ou arboricoles où les productions présentent de hautes valeurs ajoutées.

PARTIE III

Culture *in vitro* et amélioration des plantes

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1995, pp. 177-183.

19

Néoformation de plantes d'épinard à partir de suspensions cellulaires

XING-GUO XIAO, GILBERT CHARLES, MICHEL BRANCHARD

Laboratoire d'Amélioration des Végétaux-Biotechnologie, ISAMOR, Université de Bretagne Occidentale, Technopole Brest-Iroise, 29280 Plouzané-Brest, France.

Au cours de ces dernières années, la culture des suspensions cellulaires pour la propagation en masse de plantes a progressé à grands pas, de sorte que le système a été récemment automatisé [5]. Ainsi, la culture industrielle de cellules végétales est réalisée à grande échelle dans des bioréacteurs atteignant un volume de 75 000 litres [8, 10]. Les espèces végétales expérimentées sont nombreuses et vont des espèces ligneuses vivaces aux herbacées annuelles ; elles comprennent notamment *Euphorbia pulcherrima*, *Echinacea purpurea*, le lis, la carotte, la luzerne et divers conifères [3, 7]. Chez l'épinard, l'obtention de suspensions cellulaires a été, pour la première fois, signalée par Dalton et Street [2]. Ce type de culture a alors été utilisé pour de nombreuses études physiologiques ainsi que pour l'isolement de protoplastes. Cependant, à notre connaissance, aucune publication ne mentionne ce jour la néoformation de plantes issues de cultures de suspensions cellulaires.

L'objectif de notre travail a donc été d'établir un système de culture de suspensions cellulaires d'épinard permettant d'obtenir la néoformation de plantes, et de définir quels sont les facteurs majeurs influençant cette néoformation.

Matériel et méthodes

Des graines d'épinard (*Spinacia oleracea* L cv. Carpo) sont stérilisées et mises à germer comme décrit antérieurement [11]. Pour l'induction de cal, des fragments d'hypo-

cotyles et de racines (sans apex) de 3 à 4 mm de long sont prélevés à partir des plantes âgées d'une semaine et mis en culture en boîte de Pétri sur milieu solide de MS [6] auquel ont été additionnés l'AIA (8,5 mg.l^{-1}) et le GA_3 (3,5 mg.l^{-1}). Les cultures sont incubées à l'obscurité à 22 ± 1 °C pendant une semaine, puis transférées et maintenues à 24 ± 1 °C sous une lumière continue (LC) d'intensité égale à 30 $\mu Em^{-2}s^{-1}$ environ. Après 4 semaines de culture, les cals induits sont repiqués sur le même milieu frais.

Des suspensions cellulaires sont alors initiées par transfert de fragments de cals friables dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de milieu liquide composé de MS modifié par Dalton et Street [2] et de (en mg.l^{-1}) : myo-inositol 100, glutamine 200, biotine 5,0, AIA 1,0, GA_3 0,35 et kinétine 0,5. Ce milieu est dénommé M1. Les erlenmeyers sont ensuite placés sur un agitateur (125 rpm) à 22 ± 1 °C, et en lumière continue (environ 6 $\mu Em^{-2}\,s^{-1}$). Les cultures sont filtrées par passages successifs sur des tamis métalliques doubles de 200 et 100 µm. Les fractions inférieures à 100 µm et comprises entre 100 et 200 µm sont alors mises dans un volume connu de milieu M1. La densité cellulaire est évaluée à la fois par comptage du nombre de cellules et par mesure du PCV (*packed cell volume*) obtenu par centrifugation à 100 g pendant 5 mn. L'inoculum sert à ensemencer 40 ml de milieu M1 par erlenmeyer de 150 ml et est dilué de manière à obtenir une densité finale de $3,2 \times 10^4$ cellules par ml (soit ≈ 1,7 µl PCV.ml^{-1}) ou de $3,2 \times 10^5$ cellules par ml (soit ≈ 6µl PCV.ml^{-1}).

Le repiquage des suspensions cellulaires isolées en milieu liquide est effectué tous les 14 jours. En général, 10 ml de suspensions sont transférés dans 40 ml de milieu de repiquage (M1, M2 ou M3, voir Tableau I) suivant une procédure dite « par étape ». « Une étape » correspond au transfert des suspensions de M1 à M1, « deux étapes », de M1 à M2 ou de M1 directement à M3 et « trois étapes », de M1 à M2 puis à M3. L'intervalle entre chaque étape est de 28 jours. La vitesse d'agitation est alors de 95 rpm.

Les pousses feuillées néoformées dans divers milieux sont alors transférées sur un milieu solide MS contenant de l'AIA (0,5 mg.l^{-1}) et GA_3 (0,35 mg.l^{-1}) dans des erlenmeyers de 250 ml, pour favoriser leur élongation. Ces pousses feuillées, lorsqu'elles

Tableau I. Milieux liquides utilisés pour l'initiation et le repiquage des suspensions cellulaires d'épinard.

Code	Milieu de base	Facteurs de croissance (en mg.l^{-1}) AIA	GA_3	Kinétine
M1	MSM*	1,0	0,35	0,5
M2	MSM			
M2a		2,5	0,35	0,0
M2b		5,0	0,35	0,0
M3	MSm**			
M3a		0,0	0,35	0,0
M3b		0,0	0,35	0,1
M3c		5,0	0,35	0,5
M3d		8,5	0,35	0,0

*MSM : MS modifié par Dalton et Street (1976) + (en mgl^{-1}) : myo-inositol 100, glutamine 200, biotine 5,0 et saccharose 20 000.
**MSm : MS modifié par Dalton et Street (1976) + (en mgl^{-1}) : myo-inositol 100, glutamine 100, biotine 0,5 et saccharose 20 000.

atteignent 3 cm, sont enracinées dans un milieu MS solidifié par un mélange de Transfergel (10 $g.l^{-1}$) et de Difco-agar (3 $g.l^{-1}$) additionné d'ANA (1,0 $mg.l^{-1}$) et de GA_3 (0,35 $mg.l^{-1}$), pH 6,5 sous une photopériode de 10 h, une intensité lumineuse d'environ 36 $\mu Em^{-2}s^{-1}$ et une thermopériode de 24/16 ± 1 °C jour/nuit. Les jeunes plantes sont alors repiquées en pots contenant un mélange de vermiculite (ou de sable) et du terreau (1 : 3). Ces plantes sont arrosées la première semaine par une solution composée des sels de MS dilués de moitié. Elles sont ensuite arrosées d'une solution diluée au 1/4 des sels de MS, puis enfin d'eau du robinet. Les principaux paramètres de l'environnement se résument en une photopériode de 10 h avec une intensité lumineuse d'environ 40 $\mu Em^{-2}s^{-1}$, une thermopériode de 20/15 ± 1°C jour/nuit et une humidité relative de 85 ± 10 %.

Tous les milieux utilisés sont ajustés à pH 5,8 avant autoclavage à 120 °C pendant 20 min, à l'exception du milieu destiné à l'enracinement des pousses feuillées qui est ajusté à pH 6,5. L'AIA, L'ANA et le GA_3 sont stérilisés par passage sur un filtre Millipore de 0,45 µ de vide de maille. Les expériences ont été réalisées deux fois, et les valeurs communiquées de callogenèse, de rhizogenèse et de caulogenèse sont donc les moyennes des chiffres obtenus lors de ces expériences.

Résultats

Obtention de cals

De petits cals blanchâtres apparaissent au niveau des sections des explants, lors de la seconde semaine de culture. Ces cals prolifèrent et envahissent le centre des explants. Après 45 jours de culture, les cals atteignent une dimension de 5 à 6 mm de diamètre, et sont d'apparence humide, molle et friable.

Établissement des suspensions cellulaires

Les cals âgés de 45 jours mis en culture se dissocient facilement après une semaine de culture en milieu liquide agité à 125 rpm. Les cultures consistent alors en une suspension de petits agrégats cellulaires ou de cellules isolées et les observations microscopiques révèlent une grande variation dans la dimension et le type de cellules avant filtration.

La fraction cellulaire recueillie entre 100 et 200 µm (dite > 100 µm, ci-après) est constituée de « grandes cellules » isolées et relativement homogènes, alors que la fraction cellulaire de taille inférieure à 100 µm est également homogène, mais surtout constituée de petites cellules rondes et de débris.

Croissance et différenciation des cultures

La division des cellules de la fraction > 100 µm commence environ 48 h après l'ensemencement. Les suspensions deviennent rapidement épaisses et plus ou moins mucilagineuses. Leur vitesse de croissance, lorsqu'elles proviennent de la racine, est plus grande que lorsqu'elles proviennent de l'hypocotyle. La fraction cellulaire de taille inférieure à 100 µm, que son origine soit hypocotylaire ou racinaire, manifeste une

reprise de croissance très lente, les suspensions devenant plus ou moins brunes avec de rares divisions.

La callogenèse et l'organogenèse obtenues dans la fraction > 100 µm des suspensions issues des cals de racine à densité cellulaire initiale de $3,2 \times 10^5$ cellule.ml^{-1} sont résumées dans le Tableau II.

Tableau II. Influence du choix de la méthode et du milieu de repiquage sur la callogenèse et l'organogenèse des suspensions cellulaires issues des cals de racine (fraction > 100 µm), à la densité cellulaire initiale de 3,2 x 10^5 cellules.ml^{-1}

Milieu initial	Une étape* (M1 à M1)	Deux étapes* (M1 à M2 ou M1 à M3)	Trois étapes* (M1 à M2 à M3)	Formation de cals**	Nombre de cals*** formant des	
					racines	bourgeons
M1	M1	—	—	oui	0,0	0,0
	(M1)	M2a	—	oui	50-75	> 100
		M2b	—	oui	≈ 90	0,0
	(M1)	M3a	—	oui	0,0	0,0
		M3b	—	oui	0,0	0,0
		M3c	—	non	0,0	0,0
		M3d	—	non	0,0	0,0
	(M1)	(M2a)	M3a	oui	50-75	> 75
			M3b	oui	50-75	50-75
			M3c	oui	0,0	0,0
			M3d	non	0,0	0,0
		(M2b)	M3a	non	0,0	0,0
			M3b	oui	0,0	0,0
			M3c	oui	0,0	0,0
			M3d	non	0,0	0,0

* : méthode comportant 1 à 3 étapes de repiquage sur des milieux différents M1, M2 et M3.
** : cals visibles à l'œil nu.
*** : nombre des cals par Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de suspension cellulaire.

L'analyse de ce tableau permet d'observer que dans le milieu M1, en utilisant la méthode « une étape », les suspensions cellulaires ne forment que des cals visibles à l'œil nu. Si la méthode comporte « deux étapes », les suspensions produisent alors des cals, des racines adventives et des pousses feuillées si elles sont dans le milieu M2a, mais pas si elles sont dans le milieu M2b. Pourtant, même par la technique « deux étapes », les suspensions transférées directement du milieu M1 aux milieux sans AIA (M3a et M3b) ne forment ni racines ni pousses feuillées, bien qu'elles puissent révéler une organisation en microcals puis en cals. Par ailleurs, la présence ou l'absence de kinétine à une concentration de 0,1 mg.l^{-1} ne semble pas avoir d'effet notable sur la croissance, la callogenèse, la rhizogenèse ou la caulogenèse des suspensions. Les suspensions repiquées directement du milieu M1 aux milieux contenant de fortes concentrations en AIA, *i.e.* M3c (5,0 mg.l^{-1}) ou M3d (8,5 mg.l^{-1}) (technique « deux étapes »), restent toujours à l'état de cellules et/ou de petits agrégats. Par la procédure « trois étapes », après 28 jours dans la milieu M2a, les suspensions produisent des cals, puis des racines adventives et/ou des pousses feuillées quand elles sont transférées dans un troisième milieu qui ne contient pas d'AIA (M3a et M3b). En revanche, quand elles sont repiquées sur un troisième milieu contenant une forte concentration d'AIA (M3c

et M3d), elles ne forment ni racines ni pousses feuillées. Toutefois, même en suivant la procédure « trois étapes », un passage de 28 jours dans le milieu M2b ne permet pas aux suspensions de se différencier dans le milieu M3, quelle que soit la composition hormonale de ce dernier.

Par ailleurs, la fraction cellulaire supérieure à 100 µm à faible densité d'ensemencement, par la technique des « étapes », a pu finalement produire des cals dans les milieux M1 (« une étape »), M2a et M2b (« deux étapes ») ainsi que dans les milieux M3a et M3b après passage dans le milieu M2a (« trois étapes »). De plus, les cals ont pu différencier quelques racines adventives (milieux M1a, M3a et M3b), et même quelques pousses feuillées (milieu M2a), bien que la fréquence de néoformation des racines (< 25/Erlen) et des pousses feuillées (< 10/Erlen) soit faible.

Pour la fraction cellulaire inférieure à 100 µm à forte densité (6 µl. PCV.ml^{-1}), les suspensions semblent toujours rester à l'état de cellules isolées ou de très petits agrégats composés de 3 à 4 cellules. En produisant une substance mucilagineuse, elles deviennent donc brunes. Malgré de nombreux repiquages par « étapes », qui leur ont permis de s'organiser en microcals dans le milieu M2a (« deux étapes »), M3a et M3b (« trois étapes »), après un passage dans le M2a, les tentatives d'obtention des pousses feuillées se sont soldées par le brunissement des suspensions. Des résultats similaires ont été obtenus pour les suspensions ensemencées à plus faible densité.

En ce qui concerne les suspensions issues de cals d'hypocotyle, la fraction < 100 µm a repris sa croissance très lentement après l'ensemencement. Ayant traversé toutes les « étapes » de repiquage, elle s'est nécrosée après avoir produit quelques cals dans le milieu M1. Pour la fraction cellulaire > 100 µm, les suspensions à faible densité d'ensemencement s'accroissent plus lentement qu'à densité plus élevée, et elles forment quelques cals dans les milieux M1, M2a ainsi que dans les milieux M3a et M3b après passage dans le milieu M2a. En revanche, les suspensions avec plus forte densité d'ensemencement forment de nombreux cals dans ces milieux : les cals dans le milieu M2a forment des racines adventives tandis que les cals dans le milieu M1 produisent aussi bien des pousses feuillées que des racines adventives.

Maintien et enracinement des pousses feuillées et sevrage des jeunes plantes

Des pousses feuillées sur le milieu gélosé d'allongement poussent vigoureusement et atteignent environ 3 cm après 2 ou 3 semaines de culture. A ce stade, les pousses feuillées sont mises sur milieu d'enracinement. Pendant les 3 semaines qui suivent ce repiquage, plus de 90 % des pousses feuillées s'enracinent. Après transfert en pots, environ 70 % des plantes se développent normalement.

Discussion et conclusion

La bonne qualité des cals de départ est la première garantie pour la croissance et l'évolution des suspensions. L'association d'AIA et de GA_3 a été choisie pour l'induction de ces cals, parce qu'il a été montré que les tissus d'épinard appartiennent au groupe « AIA-spécifique » et « GA_3-sensible » du point de vue de leur réaction en culture *in vitro* [11].

La dimension des cellules d'ensemencement joue un rôle dominant dans la croissance et l'évolution des suspensions cellulaires. En suivant la même procédure par

« étapes », seules les suspensions de la fraction > 100 µm se divisent activement et forment une population de cals visibles à l'œil nu, qui se différencient et initient des racines adventives et des pousses feuillées.

La densité cellulaire initiale joue un rôle prédominant sur la croissance et l'évolution ultérieure des cultures. A forte densité, la croissance des suspensions est plus rapide et les néoformations des pousses feuillées et des racines adventives sont plus fréquentes qu'à faible densité. Un tel effet est couramment observé en culture de cellules [1]. Chez l'épinard, Fry et Street [4] ont observé que les suspensions cellulaires ne peuvent bien croître qu'à partir d'une densité cellulaire initiale de 5×10^4 cellules.ml^{-1}.

Le milieu, surtout le deuxième milieu (qu'il y ait deux ou trois étapes), et la méthode de repiquage jouent un rôle déterminant sur la callogenèse et surtout l'organogenèse des suspensions cellulaires. Par la méthode « deux étapes », les suspensions transférées directement aux milieux sans AIA (M3a, M3b) ou aux milieux contenant une concentration supérieure à 5,0 mg.l^{-1} d'AIA (M2b, M3c et M3d) ne forment aucun organe. Il en est de même pour celles qui ont traversé la deuxième étape dans le milieu contenant une forte concentration d'AIA (M2b 5,0 mg.l^{-1} AIA) par la technique « trois étapes ». En revanche, le repiquage des suspensions sur milieu contenant de l'AIA en faible concentration (M2a, 2,5 mg.l^{-1}) conduit à la néoformation de pousses feuillées. De même, après un passage dans le milieu M2a, les suspensions repiquées sur milieux sans AIA (M3a et M3b) par la méthode « trois étapes » ont pu produire des pousses feuillées. Cela implique que l'organogenèse a peut-être été initiée lors de la phase d'induction et/ou de développement des cals par des concentrations élevées d'AIA et de GA_3 et qu'elle n'est que « complétée » lors de la phase de culture des suspensions cellulaires par une concentration plus faible d'AIA. L'absence d'AIA ou sa présence à une concentration trop élevée lors de la phase de culture des suspensions n'est pas favorable à la réalisation de l'organogenèse et/ou inhibe le développement des organes initiés.

Les suspensions issues de cals de racine sont plus favorables que celles provenant d'hypocotyles pour obtenir la régénération de pousses feuillées et cela est peut-être dû à la différence d'état physiologique et de teneurs en AIA et GA_3 actifs endogènes.

En conclusion, la néoformation de plantes à partir de suspensions cellulaires chez l'épinard est, pour la première fois, réalisée, et un système complet de culture, des cals aux cellules isolées jusqu'aux plantes en pots, est établi. Cette néoformation est un processus continu, et de nombreux facteurs interviennent dans ce processus à différentes phases et à différents niveaux. Les principaux, parmi eux, sont, semble-t-il, l'origine et la qualité des cals à partir desquels les cellules sont isolées, la dimension des cellules ensemencées, la densité cellulaire initiale, le milieu et la méthode d'ensemencement et de repiquage ainsi que les conditions physiques de l'environnement.

L'établissement de ce système chez l'épinard fournit un outil potentiellement utilisable pour l'amélioration de cette espèce d'intérêt agronomique.

Références

1. Benbadis A (1968). Culture de cellules isolées : problème du conditionnement des milieux de culture. In : *La culture de tissus des plantes.* CNRS : 121-129.
2. Dalton CC, Street HE (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.

3. Durzan DJ, Durzan PE (1991). Future technologies : model, reference control systems for the scale-up of embryogenesis and polyembryogenesis in cell suspensions cultures. In : Debergh PC, Zimmerman RH, eds. *Micropopagation,* Kluwer Acad. Publ., The Netherlands : 389-423.
4. Fry SC, Street HE (1980). Gibberellin-sensitive suspension cultures. *Plant Physiol* 65 : 472-477.
5. Levin R, Gaba V, Hirsch S, De Nola D, Vasil IK (1988). Automated plant tissue culture for mass propagation. *Bio/Technology* 6 : 1035-1040.
6. Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
7. Preil W (1991). Application of bioreactors in plant propagation. In : Debergh PC, Zimmerman RH, eds. *Micropropagation.* Kluwer Acad. Publ., The Netherlands : 425-445.
8. Rithershaus E, Wrich J, Weiss A, Westphal K (1989). Large scale industrial fermentation of plant cells : design, instalation and initial operation of a fermentation unit (75 000 litres) for plant cell cultures. *Bio Engineering* 5 : 8-10.
9. Rithershaus E, Wrich J, Weiss A, Westphal K (1989). Large scale industrial fermentation of plant cells : experiences in cultivation of plant cells in a fermentation cascade to a volume of 75 000 litres. *Bio Engineering* 5 : 28-30.
10. Westphal K (1990). Large scale production of biologically active compound in plant cell cultures. In : Nijkamp HJJ, Van der Plas LHW, Van Aartrijk J, eds. *Progress in plant cellular and molecular biology.* Proc. VIIth IAPTC Congress, Kluwer Acad. Publ., The Netherlands.
11. Xiao XG, Branchard M (1993). Embryogenesis and plant regeneration of spinach (*Spinacia oleracea* L.) from hypocotyl segments. *Plant Cell Rep* 13 : 69-71.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 185-194.

20

Clonage de plantes hyperflorales par bourgeonnement stipulaire adventif chez le fraisier micropropagé par méristème

A. JEMMALI [1], PH. BOXUS [1], D. DEKEGEL [2], G. VAN HEULE [2]

1. Station fruitière et maraîchère, 234, chaussée de Charleroi, 5030 Gembloux, Belgique.
2. Microscopie électronique, Institut Pasteur, 642, rue Engeland, 1180 Bruxelles, Belgique.

Résumé

En dépit de sa propagation sur un milieu de culture contenant seulement 4,4 10^{-6} M de cytokinines « 6-Benzyl Amino Purine », le cultivar de fraisier Gorella se distingue par une intense activité organogénétique adventive sur les stipules foliaires. Une fois initié, le centre méristématique qui en résulte se met en prolifération rapide conduisant à la formation d'une masse très importante de petits bourgeons dont le nombre peut facilement dépasser celui des axillaires, et de plus en plus au fil des subcultures.

Grâce à la miscroscopie électronique à balayage, un polymorphisme a été mis en évidence chez les bourgeons stipulaires. Un tel polymorphisme serait surtout lié à leurs stades de développement et aux phénomènes de fasciation et de multi-apex (apex multiples générés par un même méristème) fréquemment observés avec cette forme d'organogenèse particulière.

La présence notable d'amidon dans les cellules subépidermiques des stipules en dédifférenciation constituerait une source énergétique indispensable à l'accomplissement d'au moins les premières étapes de l'ontogenèse du bourgeon adventif. Dès que ce dernier acquiert un méristème normal, il devient autonome et son isolement de la stipule ne présente plus d'obstacles à sa prolifération ultérieure. Notons enfin que les micro-

plants issus de néoformation sont cultivés avec la même facilité que ceux produits par voie axillaire. Ces deux catégories de plantes ont une morphologie générale semblable ; en revanche les premières produisent toujours plus de fleurs et moins de fraises commercialisables (petit calibre).

La micropropagation en masse du fraisier pour usage commercial fut décrite pour la première fois par Boxus en 1974 [2], et ultérieurement adaptée à d'autres laboratoires [3, 9, 35].

Des plants de fraisier ont par ailleurs été régénérés à partir de cals émis par méristèmes excisés [24], anthères [25, 30], fragments d'inflorescences et de pétiole [12, 15], feuilles et filets [17], embryons immatures [34], cotylédons excisés et akènes [21] et par stipules foliaires [32].

Une organogenèse directe a été observée sur le limbe foliaire suite à de fréquentes subcultures de deux semaines [36] et sur les stipules du cultivar Gorella micropropagé [13].

Le fraisier octoploïde a souvent été caractérisé par sa grande stabilité génotypique [5] et phénotypique [33]. Néanmoins, certains auteurs ont signalé quelques anomalies chez les plantes micropropagées, à savoir le multi-apex [1], le *white streaking* (stries blanches sur feuilles), la stérilité femelle [33], les dissociations chimériques [18] ou encore l'hyperfloraison [16, 13].

Bien que les travaux réalisés dans le domaine de la culture de tissus chez le fraisier soient nombreux, les chercheurs se sont rarement interressés à l'aspect histologique et cytologique des diverses formes d'organogenèse décrites jusqu'à présent. C'est notamment la forme adventive qui a fait l'objet de quelques investigations. A ce propos, l'analyse histologique en miscroscopie optique a porté sur le bourgeonnement adventif endogène ou épidermique au sein du limbe foliaire d'apex excisé [11], la néoformation sur cal stipulaire [32] et l'organogenèse à partir de cellules épidermiques ou subépidermiques de disques foliaires [23].

Le présent travail aura pour objet de caractériser histologiquement et morphogénétiquement le bourgeonnement stipulaire adventif chez le fraisier *in vitro*, et d'étudier le comportement floral des plantes qui en dérivent.

Matériel et méthodes

L'étude porte exclusivement sur le cultivar Gorella. Les méristèmes sont prélevés sur des pieds mères peu micropropagés. Les milieux de culture sont ceux proposés par Boxus [2].

Après trois subcultures en présence de 4,4 10^{-6} M BAP (1 mg/l), les bourgeons axillaires et stipulaires sont séparés et cultivés pendant trois transferts supplémentaires sur 0,88 10^{-6} M BAP (0,2 mg/l) seulement.

A la sortie de l'*in vitro*, les plantules sont cultivées en phytotron [13]. Les quinze meilleures plantes de chaque série sont empotées en vue de comparer leurs productions florales à l'anthèse.

Pour les études morphologiques en MEB et histologiques, des échantillons de bourgeons stipulaires ou axillaires sont fixés dans le glutaraldéhyde 2 % préparé avec un tampon cacodylate de sodium 0.2 M à pH 6,5. Les objets destinés à l'observation en balayage sont ensuite lavés à l'eau distillée et passés dans une série de bains alcoo-

liques progressifs allant de 30° à 100°. Après un séjour de quelques heures dans l'alcool anhydre, les échantillons sont séchés au point critique et enrobés d'une couche d'or pour être visionnés à 20 kV au moyen d'un MEB « OMNISCAN ETEC ».

Pour les études histologiques, les objets fixés sont rincés à l'eau distillée trois fois 10 min, puis placés dans l'acide osmique (O_5O_4) pendant une nuit. Après rinçage, les tissus passent une nuit dans l'acétate d'uranyl avant de subir des déshydratations à l'acool puis à l'oxyde de propylène. L'étape suivante consiste à plonger les échantillons dans un mélange d'oxyde de propylène et de résine « Epon Spur » (50 : 50) puis dans de la résine pure renouvelée trois fois. Enfin, les objets sont inclus dans la même résine coulée dans des moules spéciaux et polymérisés à 70 °C pendant 12 heures. Les gélules ainsi obtenues sont fraisées à l'aide d'une fraise « TM 60 REICHERT », et les coupes semi-fines (2 µm) ou fines (50 nm) sont réalisées au moyen d'un microtome « ULTRACUT REICHERT-JUNG ».

Les micrographies sont prises soit au miscroscope optique « ZETOPAN REICHERT » ou au miscroscope électronique à transmission « ELMISKOP 1 SIEMENS ».

La ploïdie des vitroplants d'origine axillaire ou stipulaire est déterminée par la technique de cytométrie de flux.

Résultats

La détection des bourgeons stipulaires chez le cultivar Gorella est possible dès les toutes premières subcultures sur le milieu de production commerciale contenant 1 mg/l BAP.

Après 2 ou 3 cycles consécutifs de multiplication, il est encore facile de faire la distinction entre les deux formes de bourgeonnement, axillaire (BA) et stipulaire (BS). Les premiers accusent une plus grande vigueur par rapport à ceux qui poussent sur les stipules foliaires. Les BA portés à l'aiselle des stipules sont solidaires de la tige, alors que les BS prennent pour site préférentiel la partie distale des stipules formant la connexion de celle-ci avec le pétiole.

Plus rarement, on rencontre les BS sur la surface intérieure et les bords des deux ailes stipulaires latérales.

Après les trois premières subcultures sur 1 mg/l BAP, les deux types de bourgeons séparés et transférés sur un milieu ne contenant que 0,2 mg/ 1 BAP ne prolifèrent que par voie axillaire. A cette concentration en cytokinine, les explants se multiplient difficilement lors de la première subculture, mais après deux passages supplémentaires, ils se mettent à proliférer avec un taux de multiplication de 3 ou 4 par subculture de trois semaines.

L'enracinement *in vitro* et le transfert sur terreau ordinaire sous climat contrôlé (phytotron) ne posent pas de problèmes. Si les jeunes plantes néoformées présentent un léger manque de vigueur *in vitro*, elles récupèrent rapidement en phytotron et plus aucune différence morphologique ne les distingue des fraisiers d'origine axillaire.

Toutefois, à la floraison, le nombre de fleurs arrivant à l'anthèse est nettement plus élevé chez les plantes d'origine stipulaire (Figure 1) et cela représente la même tendance observée au cours des deux expériences conduites avec des mériclones différents (vitroplants initiés à partir d'apex méristématiques provenant de pieds mères distincts du même cultivar « Gorella »).

Généralement, les fleurs ainsi que les fruits produits par des plantes hyperflorales

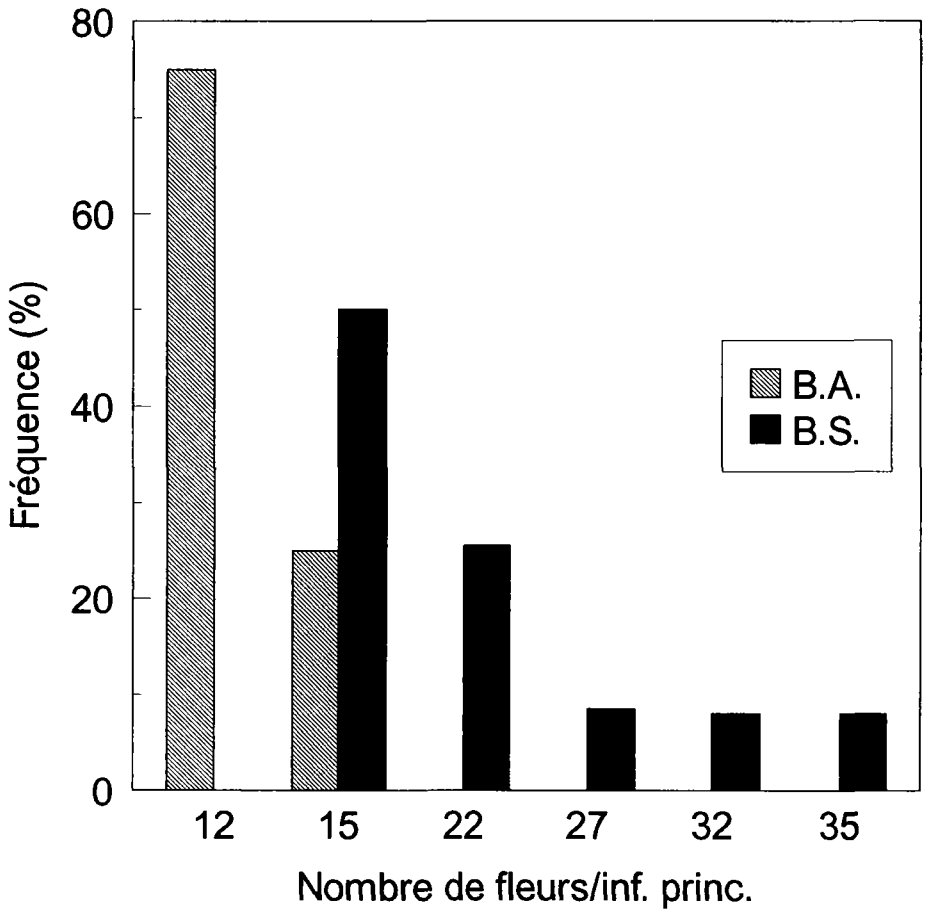


Figure 1. Production florale en phytotron de plants de fraisier cv. Gorella clonés *in vitro* par bourgeonnement axillaire (BA) et par bourgeonnement stipulaire (BS). – Distribution de fréquence (%) de l'inflorescence principale en fonction du nombre de fleurs arrivant à l'anthèse.

sont plus petits que ceux des plantes normales. Même si la nouaison n'est pas défectueuse, le calibre des petits fruits n'est pas amélioré.

Les micrographies (au microscope à balayage) des stipules portant à la fois un BA et un BS indiquent que ces deux bourgeons sont relativement très distants l'un de l'autre (Figure 2 et Figure 3). Avant de commencer à déployer ses feuilles, le BA est entouré d'une enveloppe foliaire à limbe réduit et à stipule bien définie. Par contre, à ce même stade, le BS possède une gaine sans stipule et qui doit éclater pour laisser sortir les ébauches foliaires vraies (Figure 2).

La surface organogène des stipules qui ne produit généralement qu'un seul petit bourgeon peut parfois s'étendre pour donner naissance à un amas complexe de plusieurs bourgeons (Figure 4).

Histologiquement, il ressort que deux processus consécutifs de dédifférenciation et

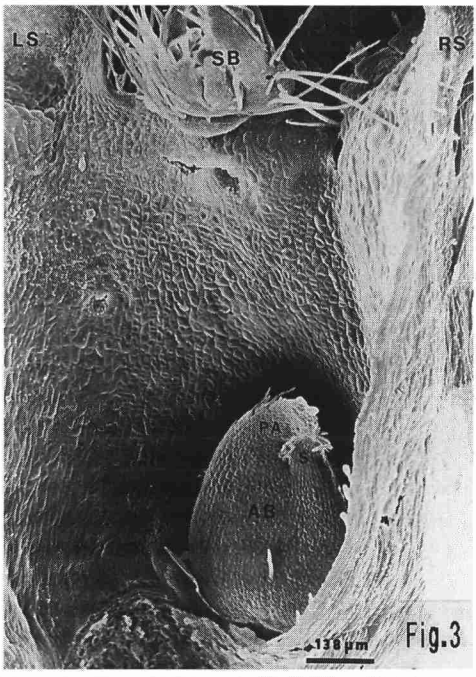


Figure 2. Micrographie MEB d'un stade primitif du bourgeon stipulaire en présence d'un bourgeon axillaire en phase d'épanouissement.

Figure 3. Micrographie MEB d'un bourgeon stipulaire dont la gaine extérieure est en cours de désintégration en présence d'un bourgeon axillaire non épanoui. AB : bourgeon axillaire, S : stipule, PA : axe pétiolaire, PSB : bourgeon stipulaire primitif, SB : bourgeon stipulaire, LS : aile stipulaire gauche, RS : aile stipulaire droite, LP : pétiole foliaire.

Figure 4. Amas de bourgeons stipulaires sur les ailes des stipules foliaires. SBs : bourgeons stipulaires, S : stipules, ABs : bourgeons axillaires alignés à l'aisselle des stipules.

de différenciation sont à l'origine de la néoformation des BS. En effet, l'observation en microscopie optique (Figure 5) montre bien que des couches cellulaires sous-épidermiques et épidermiques des stipules entrent en dédifférenciation. Suite à ce changement, certaines cellules se spécialisent dans l'amylogenèse apportant la source énergétique à d'autres cellules voisines qui se mettent en activité mitotique progressive. Ces dernières, d'abord riches en vacuoles et ne possèdant qu'un petit noyau placé contre la membrane plasmique, acquièrent au terme de la dédifférenciation l'aspect de cellules méristématiques. Elles ont alors un rapport nucléoplasmique élevé, des vacuoles très réduites et un cytoplasme riche en organites cellulaires dont les mitochondries, les dictyosomes et les ribosomes (Figure 6). Le méristème primaire ainsi édifié va assurer, par le processus inverse « la différenciation », l'ontogenèse des organes foliaires et caulinaires du bourgeon stipulaire. La différenciation s'accompagne cytologiquement par le regroupement des petites vacuoles en une vacuole plus grande, le noyau occupe alors une position centrale dans la cellule et le contenu cytoplasmique se réduit.

La cytométrie de flux n'a révélé aucune différence de ploïdie entre les deux catégories de plantes axillaires et stipulaires.

Discussion

Le bourgeonnement adventif direct sur les stipules a été observé chez plusieurs cultivars de fraisier micropropagé sur des milieux contenant de 0,5 à 1 mg/l de BAP. La sensibilité à l'égard de cette organogenèse relève du cultivar, voire même du mériclone. La variété « Gorella » très sensible au phénomène de l'hyperfloraison est aussi des plus aptes au bourgeonnement stipulaire.

Depuis que le problème de l'hyperfloraison et celui des petits fruits s'est déclaré, des recherches sérieuses ont été menées en France [8, 22] et en Belgique [4, 16] pour en trouver les causes. Ces travaux démontraient que les anciens clones, c'est-à-dire les clones longuement subcultivés, présentaient plus cette aberration que les lots peu ou non micropropagés. C'est pourquoi, à partir de 1981, des corrections ont été apportées au schéma français de production *in vitro.* Notamment, le nombre de subcultures a été limité à 10 et les doses de phytohormones ajoutées au milieu ont été réduites de moitié [28].

Les expérimentations faites par Kinet, à l'Université de Liège, sur le cultivar Gorella ont montré l'existence d'individus hyperfloraux dès la huitième subculture. De plus, cet auteur a démontré la persistance du caractère hyperfloral au travers de plusieurs générations de stolons. Cette constatation nous a conduit à axer nos investigations au niveau de la phase de micropropagation proprement dite où risquaient de se produire des événements temporaires ou répétitifs dont les conséquences s'exprimeraient au champ. La première hypothèse, largement soutenue par les scientifiques, était un déséquilibre physiologique de type hormonal par exemple, mais cela supposerait la réversibilité du déséquilibre par le retour aux conditions normales de culture, ou par l'application de certains traitements comme le froid. Ces mesures ont échoué et il ne nous a pas été possible de provoquer un rétablissement des plants anormaux par multiplication classique.

Même si Demarly [10] signale que la probabilité d'obtenir des variants à partir d'une prolifération adventive dont l'explant initial est un méristème est très faible, l'implication des bourgeons stipulaires [13] dans la production de fraisiers hyperfloraux

Figure 5. Coupe longitudinale dans le plan des stipules montrant la dédifférenciation des grosses cellules stipulaires vacuolisées en cellules méristématiques adventives donnant lieu au bourgeon stipulaire. SC : cellules stipulaires vacuolisées, AMC : cellules méristématiques adventives, LP : primordium foliaire (× 50).

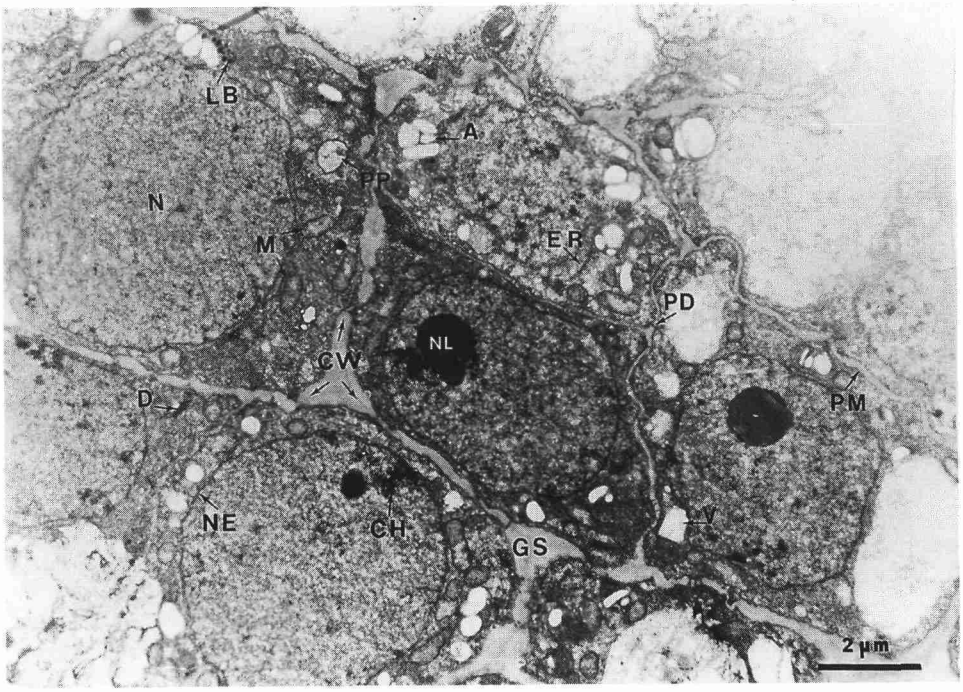


Figure 6. Micrographie d'une coupe ultrafine effectuée au sein du dôme méristématique du bourgeon stipulaire de la Figure 5. **N :** noyau, LB : inclusions lipidiques, M : mitochondries, PP : proplastides, CW : paroi cellulaire, D : dyctiosomes, A : amyloplastes, NL : nucléole, NE : enveloppe nucléaire, CH : chromatine, ER : réticulum endoplasmique, PD : plasmodesme, GS : méat inter-cellulaire, V : vacuole, PM : membrane plasmique.

n'était pas à écarter d'office comme le prouvent nos expériences actuelles sur les origines stipulaires ou axillaires.

L'étude morphologique et histologique de cette organogenèse particulière révèle un grand polymorphisme des BS qui peuvent s'organiser de différentes manières. La différenciation du BS en véritable bourgeon feuillé peut intervenir, selon les cas, juste à la sortie de l'épiderme ou après la formation préalable d'un petit nodule superficiel à configuration protocormique.

Au point de vue histologique, on retrouve le schéma général décrit par Buvat [6, 7] sur l'organogenèse adventive. Nous avons en plus montré, par une analyse ultrastructurale en MET, l'existence d'un bon nombre de cellules spécialisées en amylogenèse, et ce par la transformation de leurs plastes en véritables amyloplastes. De telles structures vivantes spécialisées pourraient encore se trouver chez le tout jeune méristème primaire, mais elles disparaîtront du méristème adulte qui ne devrait normalement plus contenir de substances paraplasmiques y compris celles des vacuoles.

Une approche ultrastructurale semblable de la néoformation *in vitro* a été décrite chez le *Cichorium intybus* multiplié par nodules méristématiques [26] à partir des cellules cambiales de la nervure principale de feuilles incisées (Piéron, communication personnelle), et chez le tabac reproduit par cal [31].

La présence d'amidon en tant que source énergétique indispensable au bourgeonnement adventif a été observée dans les cals organogènes de *Saintpaulia ionanta* [29] et de *Fragaria x ananassa* [32] ou embryogènes de *Corylus avellana* [27] et de *Coffea arabica* [20].

Le bourgeonnement adventif épiphylle naturel est assez rare (certaines Polypodiacées), mais son éventualité peut néanmoins suggérer une assez grande aptitude potentielle des feuilles à la néoformation de bourgeons adventifs [19]. Chez le fraisier, il pourrait s'agir d'un mécanisme semblable parce qu'il se produit toujours sur une zone bien précise des stipules foliaires qui y seraient prédisposées mais ne l'exprimeraient que sous certaines conditions stimulantes (*in vitro* en particulier).

Références

1. Anderson HM, Abbott AJ, Wiltshire S (1982). Micropropagation of strawberry plants *in vitro*. Effect of growth regulators on the incidence of multi-apex abnormality. *Scientia Hortic* 16 : 331-341.
2. Boxus Ph (1974). The production of strawberry plants by *in vitro* culture. *J Hort Sc* 49 : 209-210.
3. Boxus Ph, Quoirin M, Laine JM (1977). Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. In : *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture,* Reinert J, Bajaj YPS eds Springer Verlag, 130-143.
4. Boxus Ph (1986). Comportement du fraisier issu de micropropagation *in vitro*. Aspects pratiques actuels. *Le fruit belge* 410 : 106-110.
5. Boxus Ph (1989). Review on strawberry mass propagation. International strawberry symposium. May-June 88, Cesena (Italy). *Acta Horticulturae* 265 : 309-320.
6. Buvat R (1965). Les bases cytologiques de la différenciation et de la dédifférenciation chez les plantes. *Handbuch d. Planzenphysiologie.* Bd. XV/L : 100-145.
7. Buvat R (1989). Cytology of the process of differentiation and dedifferentiation during the *ontogeny of vascular plants. In : Ontogeny, cell differentiation and structure of vascular plants.* Springer Verlag : 188-224.

8. CIREF (1982-1988). Compte-rendu de l'expérimentation fraise.
9. Damiano C (1980). Strawberry micropropagation. In : Proceedings of the conference on nursery production of fruit plants through tissue culture : applications and feasibility. USDA-SEA. Agriculture Research Results. ARR-NE-11, Beltsville, Maryland, USA : 11-22.
10. Demarly Y (1986). Experimental and theoretical approach of *in vitro* variations. In : Semal J, ed. *Somaclonal variations and crop improvement. Advances in Agricultural Biotechnology Martinus Nijhoff Publisher :* 84-99.
11. Eun JS, Lee BK, Lee MS, Harn C (1982). Studies on the rapid clonal propagation by means of meristem and callus cultures in strawberry. *J Kor Soc Hort Sci* 23(4) : 259-276.
12. Foucault C, Letouzé R (1987). *In vitro.* Régénération de plants de fraisier à partir de fragments de pétioles et de bourgeons floraux. *Biologia plantarum* 29 (6) : 409-414.
13. Jemmali A, Boxus Ph, Kinet JM (1992). Are strawberry plantlets arising from adventitious stipule buds also true to type ? *Acta Horticulturae* 319 : 171-176.
14. Jemmali A, Boxus Ph (1992). Strawberry behaviour from rooting to anthesis in relation to the number of subcultures *in vitro. Physiol Plant* 85 (3), Abst. 531.
15. Jones OP, Waller BJ, Beech MG (1988). The production of strawberry plants from callus cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 12 : 235-241.
16. Kinet JM, Parmentier A (1989). The flowering behaviour of micropropagated strawberry plants cv. « Gorella » : The influence of the number of subcultures on the mutliplication medium. In : International Strawberry Symposium. May-June 88, Cesena (Italy). *Acta Horticulturae* 265 : 327-334.
17. Liu ZR, Sanford JC (1988). Plant regeneration by organogenesis from strawberry leaf and runner tissue. *Hort Science* 23 (6) : 1057-1059.
18. Marcotrigiano M, Morgan PA, Swartz HJ, Ruth J (1987). Histogenic instability in tissue culture proliferated strawberry plants. *J Am Soc Hort Sci* 112 : 383-387.
19. Margara J (1982). Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogenèse. INRA-France.
20. Michaux-Ferrière N, Dublin P, Schwendiman J (1987). Étude histologique de l'embryogenèse somatique à partir d'explants foliaires de *Coffea arabica* L. *Café Cacao Thé* 31 (2) : 103-110.
21. Miller AR, Chandler CK (1990). Plant regeneration from excised cotyledons of mature strawberry achenes. *Hort Science* 25 : 569-571.
22. Navatel JC, Varchaud G, Roudeillac Ph, Bardet A (1986). Comportement agronomique de plants de fraisier issus de pieds-mères produits par micropropagation par rapport au matériel classique. *Infos-CTIFL*, 21 : 2-8.
23. Nehra NS, Stushnoff C, Kartha KK (1989). Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks. *J Am Soc Hort Sci* 114 (6) : 1014-1018.
24. Nishi S, Oosawa K (1973). Mass propagation method of virus-free strawberry plants through meristem callus. *Japan Agricult Res Quart* 7 : 189-194.
25. Oosawa K, Toda M, Nishi S (1974). Studies on the anther culture of vegetable crops. Breeding of a great quantity of virus free plants by means of strawberry anther culture method. *Bull Veg Ornam Crops Res Stn., Japan* A 1 : 41-57.
26. Piéron S, Belaizi M, Boxus Ph (1993). Nodule culture, a possible morphogenetic pathway in *Cichorium intybus* L. propagation. *Sciencia hortic* 53 : 1-11.
27. Radojevic LJ, Kovoor A, Zylberberg L (1979). Étude anatomique et histochimique des cals embryogènes de *Coryllus avellana* L. et de *Paulownia tomentosa. Steud Rev Cytol Biol Veget - Bot* 2 : 155-167.
28. Rancillac M, Nourrisseau JG, Navatel JC (1987). Incidence de la multiplication *in vitro* sur le comportement du plant de fraisier en France. In : Boxus Ph, Larvor P, eds. *In vitro culture of strawberry plants.* CEC Report, Luxembourg, 55-73.
29. Rao AN (1977). *In vitro* culture of leaf fragments of *Saintpaulia ionanta.* In : Gautheret RJ, ed. *La culture des tissus et des cellules des végétaux.* Masson Paris : 110-122.
30. Rosati P, Devreux M, Laneri U (1975). Anther culture of strawberry. *Hort Science* 10 : 119-120.

31. Ross MK, Thorpe IA, Costerton JW (1973). Ultrastructural aspects of shoot initiation in tobacco callus cultures. *Am J Bot* 60 (8) : 788-795.
32. Rugini E, Orlando R (1992). High efficiency shoot regeneration from calluses of strawberry *(Fragaria x ananassa* Duch.) stipules of *in vitro* cultures. *J Hort Sci* 67 (4) :577-582.
33. Swartz HJ, Galetta GJ, Zimmerman RH (1981). Field performance and phenotypic stability of tissue culture-propagated strawberries. *J Am Soc Hort Sci* 106 : 667-673.
34. Wang DY, Wergin WP, Zimmerman RH (1984). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of strawberry. *Hort Science* 19 : 71-72.
35. Zimmerman RH (1981). Micropropagation of fruit plants. *Acta Horticulturae* 120 : 217-222.
36. Zimmerman RH (1991). Micropropagation of temperate zone fruit and nut crops. In : Debergh PC, Zimmerman RH, eds. *Micropropagation, technology and application.* Kluwer Academic Publishers : 231-246.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 195-204.

21

Multiplication végétative *in vitro* d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana*

M.N. DI MICHELE, L. BRAY

ISERST, Laboratoire de Lutte contre la Désertification, BP 486, Djibouti, République de Djibouti.

Résumé

La multiplication végétative in vitro *d'*Acacia flava *syn.* erhenbergiana *a été mise au point. Les semences sont d'abord mises à germer en conditions stériles. Les bourgeons cotylédonaires sont mis en culture sur un milieu contenant les éléments minéraux de Murashige et Skoog additionné de 50 g.l^{-1} de saccharose et de 2 mg.l^{-1} de kinétine. Les rameaux obtenus sont microbouturés sur un milieu d'allongement contenant 1 mg.l^{-1} de kinétine et 2 mg.l^{-1} d'acide α-naphtylacétique. L'enracinement est réalisé sur un milieu sans hormone ou avec 1 mg.l^{-1} d'acide α-naphtylacétique. La discussion est orientée sur l'optimisation de l'allongement et de l'enracinement. Cet article présente les premiers résultats obtenus à notre connaissance sur la multiplication végétative* in vitro *de l'espèce. D'ores et déjà, la méthode permet d'obtenir des vitroplants pour des expériences de sélection précoce* in vitro *et pour des tests de sensibilité à* Agrobacterium tumefaciens *en vue d'améliorer la résistance à la salinité.*

En Afrique, environ 2 000 millions d'hectares sont considérés comme des terres arides dont les trois quarts sont touchés par la désertification. La quasi-totalité de ces zones dégradées sont des terres de parcours principalement utilisées par les populations nomades [14]. Djibouti, pays aride [15] dont 95 % de la population agricole est nomade, est fortement affecté par une désertification croissante de ses terres cultivées et de

parcours [6]. Les terres cultivées dont l'irrigation est souvent mal gérée subissent une salinisation excessive et deviennent incultes [5].

Les terres de parcours, du fait d'une forte croissance démographique, sont soumises à une exploitation beaucoup plus forte que dans le passé : augmentation corrélative du bétail et de la pression de pâturage, coupes de bois plus importantes. En conséquence, le fragile équilibre existant entre l'utilisation des ressources naturelles par les populations nomades et la capacité de régénération naturelle a été rompu. Le processus de désertification est alors amorcé malgré l'adaptation des espèces locales à des conditions extrêmes d'aridité.

La lutte contre la désertification peut être menée, soit par des méthodes classiques de reboisement [1], soit par les biotechnologies [8]. D'une part, la multiplication végétative *in vitro* permet la conservation de la biodiversité (ou la propagation d'individus ayant acquis des caractères améliorants) [13], d'autre part, les biotechnologies permettent des améliorations génétiques rapides en court-circuitant les longs cycles végétatifs naturels.

Dans le cadre de la lutte contre la désertification, un préalable nécessaire aux travaux d'amélioration génétique à la résistance à la salinité est la mise au point de milieux de multiplication *in vitro*. Cet article a pour objectif de présenter les travaux effectués afin d'introduire et de multiplier *in vitro Acacia flava*, espèce à usages multiples intéressant Djibouti et la Corne de l'Afrique.

Matériels et méthodes

Matériel végétal

A. flava (Forsk.) Schweinf. var. *seyal* (Del.), synonyme d'*A. erhenbergiana* peuple des dépressions à sols argileux ou limoneux [8]. C'est un arbre à usages multiples : principalement fourrage, mais aussi bois de chauffe, charbon, bois d'œuvre, production de tanins, clôtures sèches et pharmacopée [1].

Méthodes

• *Introduction* in vitro *et obtention du matériel juvénile*

Le matériel juvénile est obtenu par la germination *in vitro*, en conditions stériles, des semences récoltées à Djibouti (site de Balbala) en juin 1992. Elles sont conservées dans des sachets plastiques, à l'abri de la lumière, et à une température de 4 °C.

L'inhibition tégumentaire est levée par la scarification à l'acide sulfurique concentré (95-97 %) durant 10 min. Après un rinçage à l'eau courante, les restes de téguments sont supprimés par un essuyage avec du papier filtre. La stérilisation est réalisée sous la hotte à flux laminaire par un premier bain de 10 min dans de l'alcool à 70° suivi d'un deuxième de 10 min dans de l'eau de Javel du commerce diluée à 6° de chlore actif. Enfin, trois rinçages de 10 min chacun sont effectués avec de l'eau distillée et stérilisée.

Les semences sont ensuite mises à germer par lots de 40, dans des pots de germination contenant de l'eau gélosée avec 6 $g.l^{-1}$ d'agar-agar (Prolabo) et stérilisée par autoclavage à 110 °C pendant 30 mn.

Les explants, prélevés sur des plantules issues de semis de 15 à 20 jours, sont constitués des deux cotylédons, de 5 mm d'épicotyle et de 3 mm d'hypocotyle [9]. Ils

sont transférés dans des tubes de culture contenant 15 ml d'un milieu de culture solide dit de multiplication contenant les éléments minéraux de Murashige et Skoog [19] additionnés de 50 g.l^{-1} de saccharose et de 2 mg. l^{-1} de kinétine.

Après 45 à 50 jours de culture, les microboutures d'une taille de 1 à 1,5 cm et comprenant un ou deux nœuds sont prélevées sur les rameaux formés à partir des explants cotylédonaires. Elles sont cultivées dans des tubes contenant 15 ml d'un milieu d'allongement puis repiquées sur milieu d'enracinement.

• ***Milieux et conditions de culture***

Différents milieux ont été testés pour l'allongement et l'enracinement des microboutures. Ils contiennent toujours les éléments de Murashige et Skoog [19] additionnés de 1 ml.l^{-1} du mélange vitaminique de Nitsch et Nitsch [20], de 8 g.l^{-1} d'agar-agar (Prolabo) et de 5 ml.l^{-1} d'une solution de FeEDTA obtenue par dissolution dans 1 litre d'eau de 5,57 g de $FeSO_4$ et 7,45 g de Na_2EDTA. Sauf indication contraire, l'apport en carbone est réalisé par 50 g.l^{-1} de saccharose. Le pH est ajusté à 5,6 $\pm$ 0,1. Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage pendant 30 min à 110° C.

Les hormones testées, en combinaison ou non, sont la Benzyl Amino Purine (BAP, Sigma) en concentration de 0 à 3 mg.l^{-1}, l'acide β-indolylacétique en concentrations de 0 à 1 mg.l^{-1}, l'acide gibbérellique de 0 à 2 mg.l^{-1}, la kinétine et l'acide α-naphtylacétique (ANA) en concentrations de 0 à 3 mg.l^{-1}.

Les explants sont cultivés dans une chambre de culture avec une photopériode, 18 h de jour et 6 h de nuit, à une température de 27° C. La lumière artificielle est générée par des tubes fluorescents OSRAM L 30 W/20.

• ***Analyse des données***

Les mesures concernant l'allongement sont effectuées de façon hebdomadaire. Au temps initial, il est vérifié par le test t de Student de comparaisons des moyennes qu'il n'y a pas de différences significatives entre les différentes conditions. Par la suite, les différences sont dites significatives à p = 0,05 si la valeur calculée de t est supérieure à la valeur seuil pour un degré de liberté donné (ddl = nombre d'individus moins un).

Les mesures concernant l'enracinement des boutures sont présentées à 50 jours. Les données sont analysées selon les mêmes méthodes que pour l'allongement.

Résultats

Milieu d'allongement

• ***Influence de l'acide gibbérellique (GA3)***

La taille des boutures, Figure 1, est donnée en fonction de la durée de repiquage sur des milieux contenant 0, 0,5, 1 ou 2 mg.l^{-1} de GA3. Nous constatons qu'il n'y a pas de différence significative entre la taille des boutures cultivées sans hormone ou en présence de 0,5 et 1 mg.l^{-1} de GA3 (les valeurs calculées du t de Student sont inférieures aux valeurs seuils). En revanche, les boutures cultivées en présence de 2 mg.l^{-1} de GA3 ont une taille significativement inférieure à celle des boutures témoins (t = 2,21). L'acide gibbérellique ne favorise donc pas l'allongement et a, au contraire, un effet inhibiteur à 2 mg.l^{-1}.

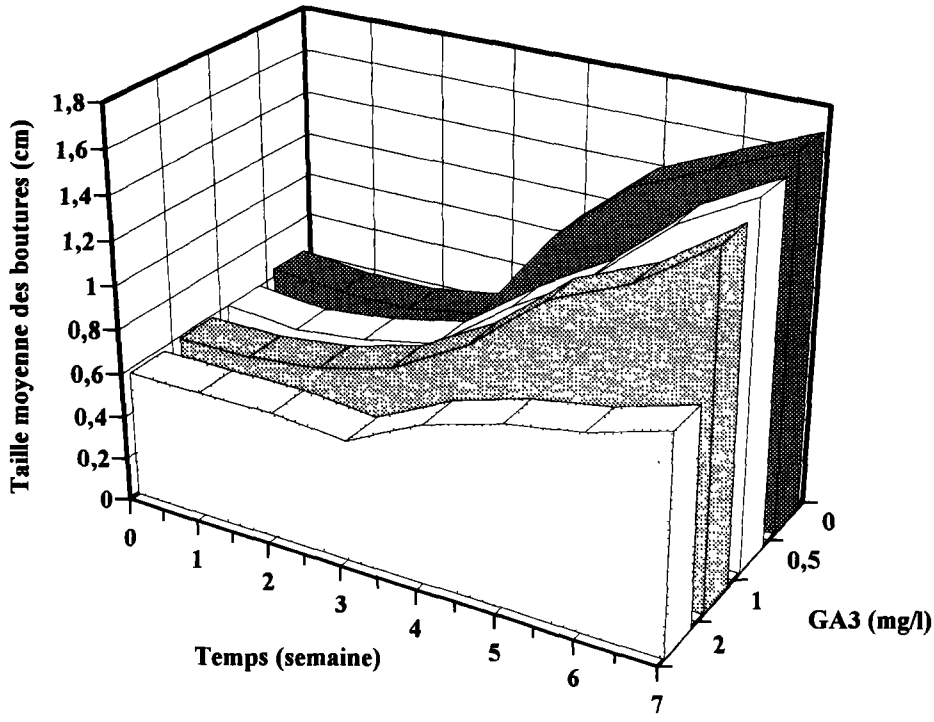


Figure 1. Évolution de la taille des boutures d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana* en fonction de la concentration en acide gibbérellique (GA3) dans le milieu de culture (MS).

• ***Influence de la kinétine (Kin) et de l'acide α-naphtylacétique (ANA)***

La Figure 2 représente l'allongement à 6 semaines de boutures repiquées sur des milieux additionnés de Kin et d'ANA en concentrations combinées de 0 à 2 $mg.l^{-1}$. Avant la 6e semaine, aucune différence significative n'est observée.

A 6 semaines, l'allongement obtenu avec 2 $mg.l^{-1}$ d'ANA et 1 $mg.l^{-1}$ de Kinétine est de 1,580 cm et est significativement supérieur à celui des témoins (le t de comparaison des moyennes est de 3,06).

Bien que l'allongement soit plus faible qu'avec 1 $mg.l^{-1}$ de Kin et 2 $mg.l^{-1}$ d'ANA, les tailles moyennes sans kinétine et avec seulement 1 $mg.l^{-1}$ ou 2 $mg.l^{-1}$ d'ANA sont aussi significativement plus grandes que celles des témoins avec des valeurs de t, respectivement, de 2,06 et de 2,623.

Enfin, les allongements mesurés sont identiques pour le milieu sans hormone et pour ceux dont le rapport molaire Kin/ANA est équivalent à 1.

• ***Influence de la 6-benzyl-aminopurine (BAP)***

L'allongement des boutures a été étudié en fonction de la durée de repiquage sur un milieu dépourvu d'hormone ou contenant 1,2 ou 3 $mg.l^{-1}$ de BAP (Figure 3).

Nous observons que l'allongement des boutures jusqu'à la 6e semaine est faible (< 0,6 cm) quelle que soit la condition. Entre la 6e et la 7e semaine, les allongements

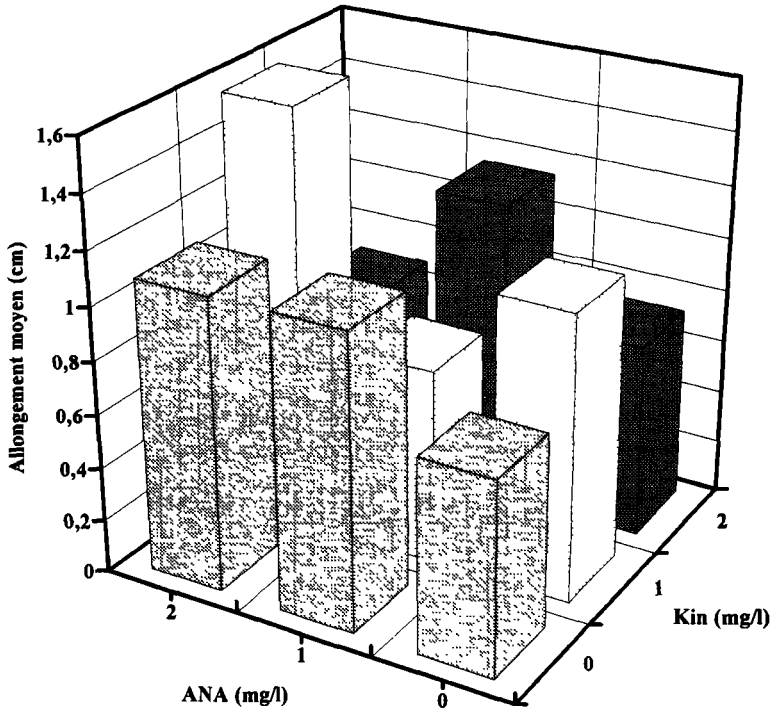


Figure 2. Allongement des boutures d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana* en fonction des concentrations en acide α-naphtylacétique (ANA) et en kinétine (Kin) dans le milieu de culture (MS).

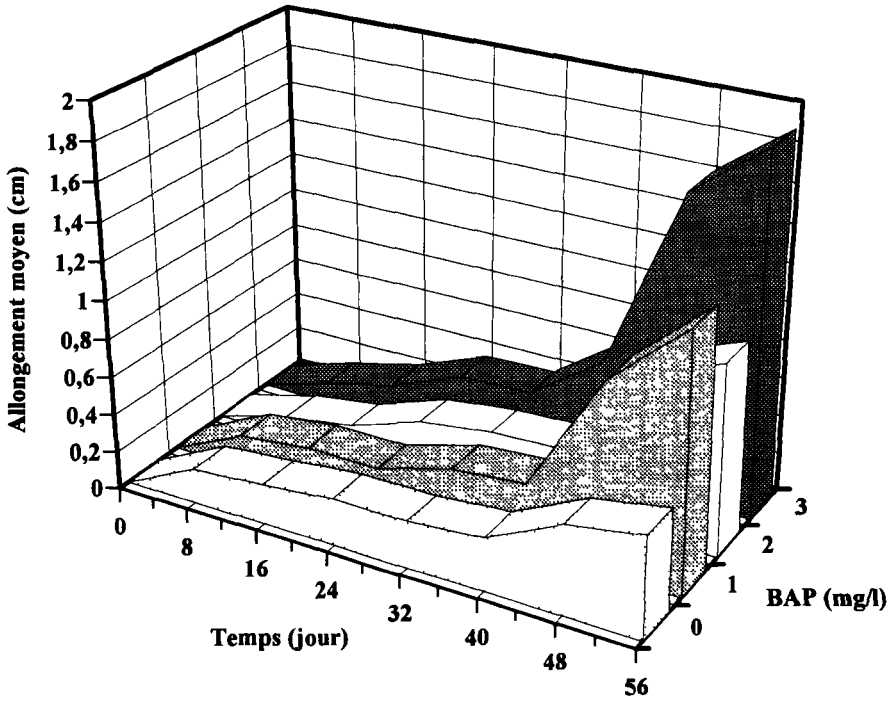


Figure 3. Allongement des boutures d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana* en fonction de la concentration en 6 benzyl-aminopurine (BAP) dans le milieu de culture (MS).

augmentent fortement. Ainsi, pour 3 mg.l^{-1} de BAP, l'allongement passe de 0,6 à 1,6 cm.

A la 8^{e} semaine, les allongements en présence de BAP sont tous significativement supérieurs à ceux des témoins. En effet, les valeurs du t de Student par rapport aux témoins pour 1,2 et 3 mg.l^{-1} de BAP sont respectivement de 2,184, 2,139 et 4,32.

Milieu d'enracinement

• *Influence de la concentration en saccharose*

Le pourcentage moyen de boutures enracinées à 50 jours a été étudié en fonction de la teneur en saccharose et en Kin (Figure 4). En l'absence de kinétine, il n'y a aucune différence significative entre les taux d'enracinement à 30 et 50 g.l^{-1} de saccharose qui sont, respectivement, de 11 % et de 13 %. En présence d'hormones, le taux moyen d'enracinement avec 50 g.l^{-1} de saccharose est de 12 %, et est significativement plus élevé que pour 30 g.l^{-1} (le t de Student est égal à 2,15 et est supérieur à la valeur seuil de 1,96).

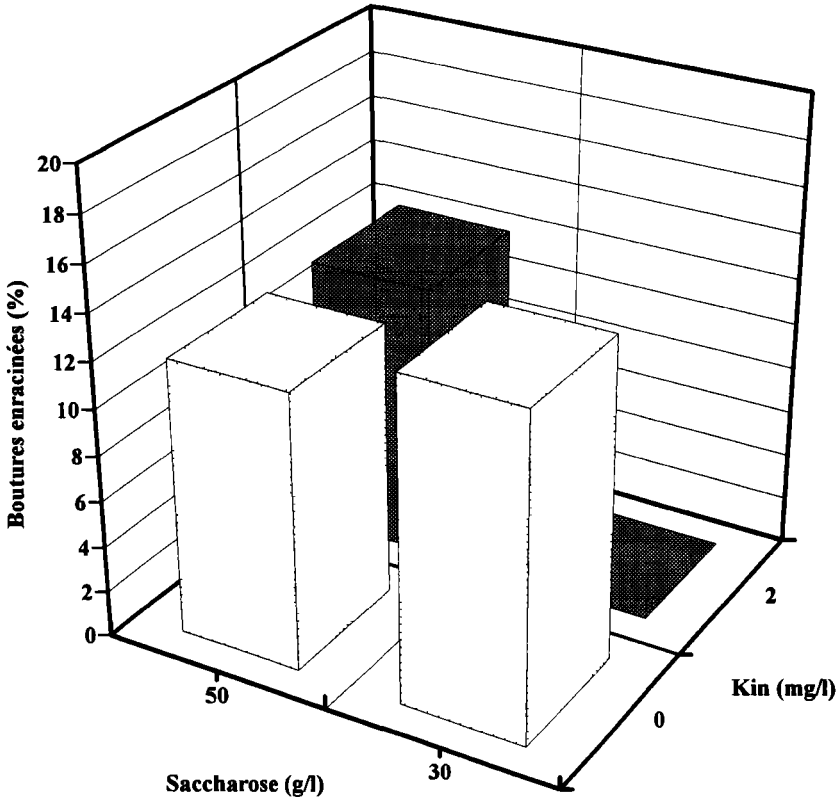


Figure 4. Enracinement des vitroplants d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana* en fonction des concentrations en saccharose et en kinétine (Kin) dans le milieu de culture (MS).

• ***Influence de l'acide gibbérellique (GA3)***

Le pourcentage de boutures enracinées à 50 jours est représenté sur la Figure 5 en fonction de la teneur en GA3 (0, 0,5, 1 ou 2 $mg.l^{-1}$). Le meilleur pourcentage de boutures enracinées est obtenu sur le milieu dépourvu d'hormones ou en présence de seulement 0,5 $mg.l^{-1}$ de GA3 avec respectivement 7,2 % et 7,1 % de boutures enracinées.

• ***Influence des teneurs combinées en Kin et en ANA***

Le pourcentage moyen de boutures enracinées à 50 jours a été étudié en fonction de la concentration en ANA et en Kin (Figure 6). Les meilleurs enracinements sont obtenus en absence d'hormones ou avec 1 $mg.l^{-1}$ d'ANA avec, respectivement, 7,2 % et 6,8 % de boutures enracinées.

Enfin, des boutures ont été soumises à une phase d'induction de 10 jours en présence de teneurs combinées en Kin et d'ANA suivie d'une phase d'expression racinaire sur un milieu sans hormones. Aucune différence significative n'a été observée par rapport aux résultats obtenus sans repiquage sur milieu sans hormones.

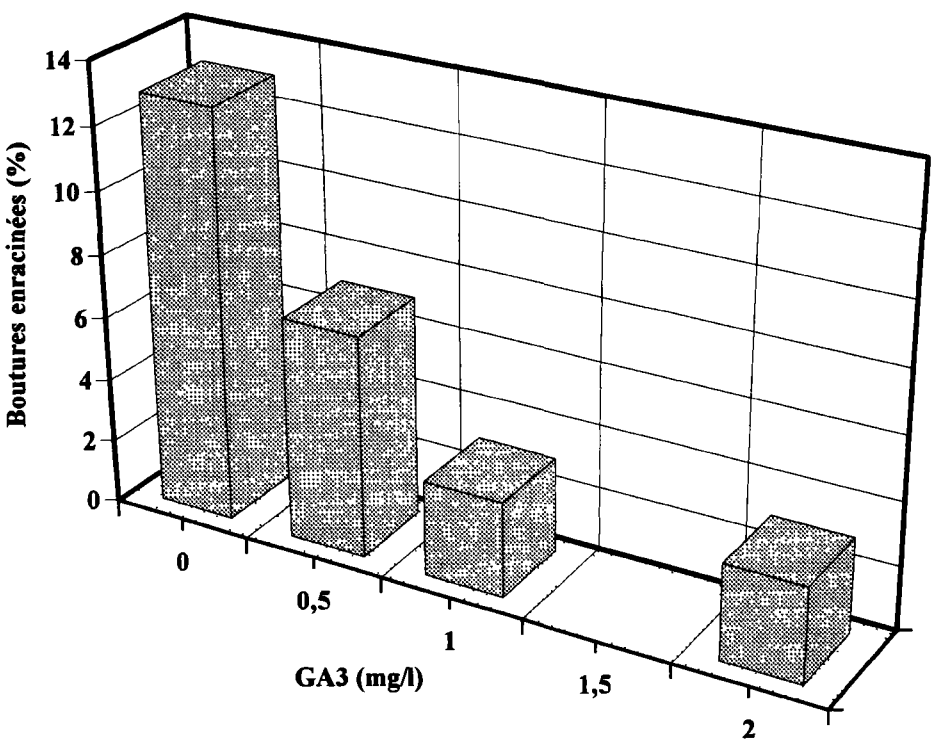


Figure 5. Enracinement des vitroplants d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana* en fonction de la concentration en acide gibbérellique (GA3) dans le milieu de culture (MS).

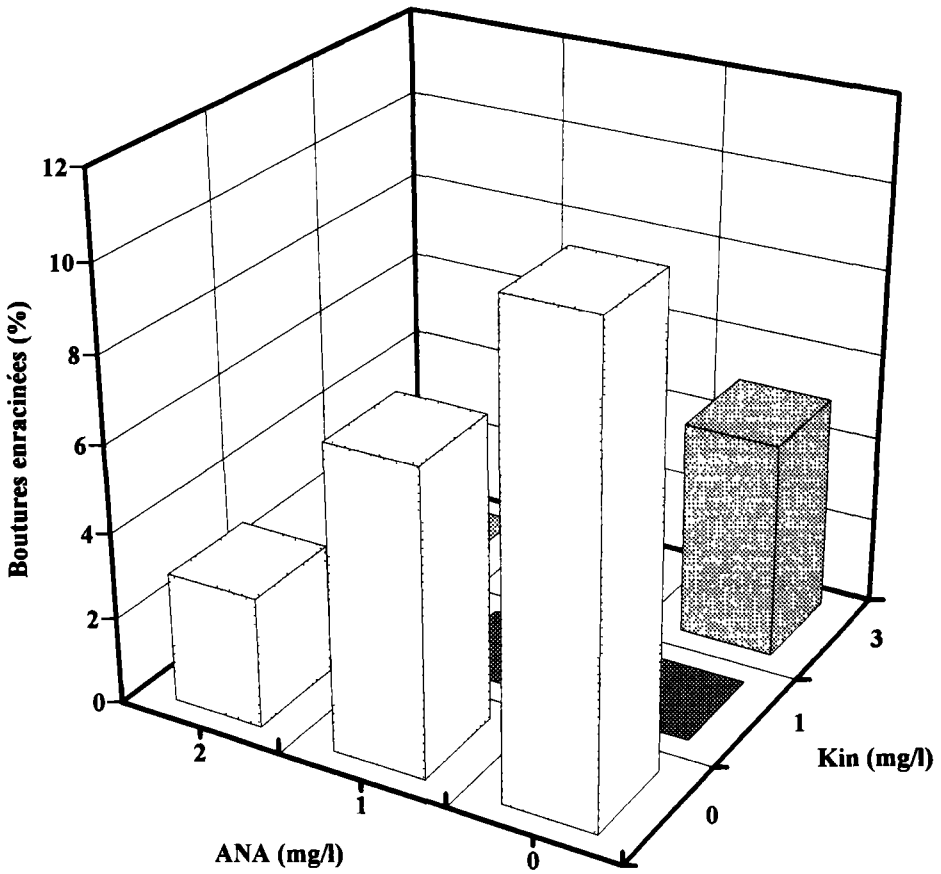


Figure 6. Enracinement des vitroplants d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana* en fonction des concentrations en acide α-naphyltacétique (ANA) et en kinétine (Kin) dans le milieu de culture (MS).

Discussions et perspectives

Ces différentes études ont permis d'introduire et de multiplier *in vitro A. flava*. Le milieu d'allongement actuellement utilisé est celui contenant 1 $mg.l^{-1}$ de Kin et 2 $mg.l^{-1}$ d'ANA. Nous avons aussi montré que la présence de Kin n'est pas nécessaire pour la phase d'allongement. A l'inverse, chez *Prosopis juliflora*, la présence de Kin ou de BAP est nécessaire à l'élongation des boutures [16].

La croissance avec 3 $mg.l^{-1}$ de BAP est identique à celle obtenue avec 1 $mg.l^{-1}$ de Kin et 2 $mg.l^{-1}$ d'ANA, mais elle est obtenue avec une semaine de retard. La caulogenèse est aussi stimulée par la présence de BAP chez *Albizia lebbek* [11] et chez *A. auriculiformis* [12]. Nous poursuivons actuellement des expériences avec des milieux contenant de la BAP combinée à de l'ANA afin d'obtenir un milieu d'allongement optimal.

Par ailleurs, d'autres milieux ou méthodes d'enracinement devront être testés. Chez une autre espèce d'*Acacia*, *A. nilotica*, le pourcentage de boutures enracinées atteint 50 % à 63 jours avec 0,5 $mg.l^{-1}$ AIA (données personnelles). Des expériences sont en cours pour vérifier si cette hormone permettrait d'améliorer l'enracinement des boutures d'*A. flava*. L'acide indole-3-butyrique devra aussi être testé car il favorise l'enracinement de nombreuses légumineuses *in vitro* [7, 11, 12, 17] ou *in vivo* [3]. Enfin, une phase d'induction de 10 jours en présence de teneurs combinées en Kin et ANA, suivie d'une phase d'expression racinaire sur un milieu sans hormones n'a pas amélioré l'enracinement des boutures alors qu'une telle méthode permet d'obtenir un taux d'enracinement proche de 100 % chez *A. senegal* [4].

La concentration de saccharose retenue pour les milieux d'allongement et d'enracinement est de 50 $g.l^{-1}$. Les feuilles sont plus nombreuses et plus vertes que par rapport à 30 $g.l^{-1}$ et le pourcentage de boutures enracinées est plus élevé. Chez *A. albida*, des taux de rhizogenèse de 100 % sont obtenus avec une concentration identique en saccharose [9]. De plus, nous observons un noircissement de l'extrémité des racines. Ce phénomène est rapporté chez d'autres espèces d'*Acacia* : *A. albida* [9], *A. nilotica* (le noircissement est visible dès la 3^{e} semaine, données personnelles).

Il a aussi été montré que l'acide gibbérellique n'avait aucun effet stimulateur aussi bien sur l'allongement que sur l'enracinement des boutures d'*A. flava*. Les résultats que nous avons obtenus chez *A. nilotica* sont identiques. Chez le genre *Acacia*, la GA3 aurait donc un effet inhibiteur aussi bien sur l'allongement que sur l'enracinement, alors que certains auteurs rapportent qu'elle peut stimuler l'allongement des entre-nœuds [2]. Selon Junttila [10], l'acide gibbérellique favorise aussi l'allongement des entre-nœuds aux dépens de la formation des racines et des feuilles.

En conclusion, les milieux de multiplication végétative *in vitro* d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana* nous ont déjà permis de commencer des études de sélection précoce *in vitro* et d'effectuer des tests de sensibilité à *Agrobacterium tumefaciens* en vue d'obtenir des plantes transgéniques plus résistantes à la salinité.

Références

1. Audru J, Labonne M, Planchenault D (1990). Desertification : a reversible trend. The example of Djibouti. Ministère de la Coopération/CEE/IEMVT-CIRAD : 8 p.
2. Augé R, Beauchesne G, Boccon-Gibod J, Decourtye L, Galandrin J-Cl, Minier R, Morand J-Cl, Vidalie H (1986). La culture *in vitro* et ses applications horticoles. JB Baillère Pub. : 152 p.
3. Badji S, Ndiaye I, Danthu P, Colonna JP (1991). Vegetative propagation of gum arabic trees. 1. Propagation of *Acacia senegal* (L.) Willd. using lignified cuttings of small diameters with eight nodes. *Agroforestery Systems* 14 : 183-191.
4. Badji S, Mairone Y, Ndiaye I, Merlin G, Colonna JP, Danthu P, Neville P (1992). Multiplication végétative *in vitro* du gommier : *Acacia senegal* L. (Willd.). Symposium UIFRO-AFOCEL Bordeaux sept. 1992 : 155-166.
5. Baulain PY (1990) Arboriculture fruitière. Rapport de fin de projet, première phase, octobre 1987 juin 1990, v. 1. MADR/ministère de la Coopération, Djibouti, 93 p.
6. CNE (Comité National pour l'Environnement) (1991). Rapport National Environnement. ONTA/SPSE, Djibouti, 105 p.
7. Dilip Nandwani, Ramawat KG (1991). Callus culture and plantlets formation from nodal explants of *Prosopis juliflora* (Swartz) DC. *Indian J Exp Biol* 29 : 523-527.

8. Di Michele MN, Bray L (1993). La culture *in vitro* à Djibouti : un outil de la lutte contre la désertification. *Rivista di Agricoltura Subtropicale e Tropicale* 87 : 85-96.
9. Duhoux E, Davies D (1985). Caulogenèse à partir de bourgeons cotylédonaires d'*Acacia albida* et influence du saccharose sur la rhizogenèse. *J Plant Physiol* 121 : 175-180.
10. Junttila O (1970). Effects of gibberellic acid and temperature on the growth of young seedlings of *Syringa vulgaris* L. *J Hort Sci* 45 : 315-329.
11. Lakshmana PV, Deepesh NDE (1987). Tissue culture propagation of tree legume *Albizia lebbek* (L.) Benth. *Plant Sci* 51 : 263-267.
12. Ranga Rao GV, Prasad MNV (1991). Plantlet regeneration from the hypocotyl callus of *Acacia auriculiformis* – Multipurpose tree legume. *J Plant Physiol* 137 : 625-627.
13. Thorpe TA, Harry IS, Kumar PP (1991). Application of micropropagation to forestry. In : Debergh, PC Zimmerman RH, eds. *Micropropagation.* Kluwer Academic Publishers : 311-336.
14. UNEP (1992). Status of desertification and implementation of the United Nations plan of action to combat desertification. Report of the executive director. UNEP, Nairobi : 88 p.
15. UNESCO (1977) Carte de répartition des régions arides.
16. Wainwright H, England N (1987). The micropropagation of *Prosopis juliflora* (Swartz) DC : establishment *in vitro*. *Acta Horticulturae* 212 : 49-53.
17. Yashpal Goyal, Arya HC (1985). Tissue culture of desert trees : II. Clonal multiplication of *Ziziphus in vitro*. *J Plant Physiol* 119 : 399-404.
18. Lebrun *et al.* (1989).
19. Murashige, Skoog (1962).
20. Nitsch, Nitsch (1962).

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 205-209.

22

Évaluation et potentialité des minitubercules de pomme de terre produits par *in vitro*

G. FOUARGE

Station de Haute Belgique, CRA Gembloux, Belgique.

Résumé

Si la technique de micropropagation in vitro *est intéressante pour régénérer des plants de pommes de terre et mettre sur le marché un matériel végétal de qualité, des problèmes de rentabilité se posent en raison du taux de multiplication qui est souvent aléatoire.*

Des essais ont été réalisés en vue d'améliorer la production de tubercules en agissant sur la fumure phosphopotassique, les régulateurs de croissance, la densité de repiquage, la masse de substrat.

Des facteurs climatiques comme l'humidité, la lumière, la chaleur seraient plus déterminants ainsi que la maîtrise du stockage.

La culture hydroponique est aussi une technique à prendre en considération pour une meilleure maîtrise des autres facteurs.

La technique *in vitro* comme moyen rapide de produire une masse importante de matériel végétal d'un état sanitaire fiable est largement utilisée aujourd'hui.

Depuis plusieurs années, les producteurs de plants de pommes de terre ont choisi cette voie pour améliorer la qualité sanitaire de leur matériel de base.

C'est ainsi qu'ils utilisent soit des microplantules, soit des microtubercules, soit des minitubercules.

Une certaine confusion existe quant à l'origine de ces différentes formes de production.

Si les microplantules et les microtubercules sont des plants produits directement en milieu *in vitro*, les minitubercules sont le résultat d'une première génération *in vivo* issue soit d'une microplantule, soit d'un microtubercule.

Le microtubercule et le minitubercule se différencient par l'origine et par le calibre.

Le microtubercule produit *in vitro* est d'un calibre de 3 à 5 mm, le minitubercule se rapproche déjà plus d'un plant classique par son calibre qui se situe entre 10 et 25 mm. De plus il est produit sur substrat, donc dans un milieu non stérile.

Il n'est cependant pas comparable à un petit calibre de 25 mm issu d'un triage de plants de pleine terre, son potentiel de production étant supérieur.

Quels sont les problèmes rencontrés et comment les résoudre ?

Les problèmes posés sont le nombre de minitubercules produits par plantule, et l'état physiologique du tubercule au moment de la plantation en plein champ.

Lorsque des microplantules issues du laboratoire sont transférées en phase d'acclimatation en serre, ce transfert se réalise en bacs dont chaque alvéole a une dimension de 6 × 6 cm, soit pratiquement 250 plantules/m^2.

Après une période de 3 à 4 semaines, la plantule développe un chevelu radiculaire important et atteint une hauteur de 10 à 15 cm. Elle est alors transférée en plein champ. La mise en place est généralement mécanisée.

La densité de plantation au champ est de 65 000 plantes/ha, soit un écartement de 0,75 m × 0,20 m ; ce qui correspond aux caractéristiques des repiqueuses à motte.

Le rendement se situe entre 5 et 7 tubercules par plantule. Le calibre est compris entre 35 et 45 mm, donc une fourchette assez étroite d'écart de calibres. Cette homogénéité, tant dans le développement végétatif que dans le calibre des tubercules, est une des constantes de ce matériel végétal qui se caractérise par une grande unité d'âge physiologique.

Les minitubercules suivent un cheminement différent.

Après acclimatation en serre, les plantules sont transférées en bac de culture à une densité de 200 plantes/m^2, et placées en serre ou sous abri *insectproof*.

Le coefficient de multiplication est assez hétérogène : 2 à 6 tubercules/plante.

Le calibre s'échelonne de 10 mm à 25 mm, voire 35/40 mm.

90 % des tubercules sont supérieurs à 10 mm et quelque 50 % entre 10 et 20 mm.

– Des essais ont été réalisés afin de modifier le taux de multiplication.

– Un renforcement de la fumure phosphopotassique n'a pas modifié le nombre de tubercules.

– L'application de chloromequat chlorure (Cycocel), qui, secondairement, aurait pu augmenter le nombre de stolons, a une action légèrement négative sur la variété expérimentée Gasore dont le nombre de tubercules est assez élevé. Le coefficient de multiplication est tombé de 5,1 de moyenne à 4,2.

Nous avions pensé que si nous augmentions le volume de substrat de repiquage, les plantules disposant d'une réserve nutritive et d'un espace racinaire plus importants, ainsi que d'une bonne réserve d'humidité, le rendement en serait logiquement augmenté.

Ce paramètre est loin d'être absolu. Pour une même densité de plantation

(200 pl/m^2) une profondeur de bac de 6 cm, par rapport à 15 cm, donnait un rendement équivalent lorsque l'irrigation était conduite de façon à maintenir une humidité permanente du substrat, le drainage étant assuré par le dépôt des bacs sur une toile perméable anti-racinaire.

A plus faible densité (100 pl/m^2), une profondeur de 6 cm s'est montrée même supérieure à 15 cm, soit un coefficient de multiplication 6,8 contre 5,8 pour la variété Gasore expérimentée.

La masse de substrat mis à la disposition de la plantule destinée à produire des minitubercules n'est pas un facteur essentiel.

Il faut optimaliser les facteurs physiques comme l'humidité, la lumière et la température qui favorisent une croissance constante.

– Le caractère juvénile des microplantules entraîne aussi une exigence plus grande en durée de culture. Après 5 à 6 mois de culture, nous avons parfois atteint un coefficient 6 avec la formation de gros calibre 40/45 ; ce qui n'est pas nécessaire pour la multiplication future.

– En augmentant la densité, par exemple 500 plantes/m^2, et en travaillant sur une longue période de culture (5 à 6 mois), il serait possible d'obtenir un nombre plus élevé de tubercules.

Il faut cependant nuancer ce paramètre densité en fonction de la variété.

La variété Jaerle qui produit des tubercules moins nombreux (× 2,8) mais de gros calibre (+ de 35 mm en serre) a intérêt à être plantée à haute densité pour augmenter la quantité et réduire le calibre.

Il en est de même pour la variété Heideniere qui a tendance à s'allonger, et la variété Kennebec qui donne aussi de trop gros tubercules. En revanche, la variété Gasore plantée à une densité de 90 plantules/m^2 a produit le double de minitubercules (6,8 contre 3,4) par rapport à une densité de 180 plantules/m^2.

Dans ce dernier cas, une occupation moins dense pour un même résultat est une économie de plantules.

Pour augmenter la densité, il faut pratiquement procéder à une mise en place directe en bac de culture, des plantules sortant de l'*in vitro* sans passer par la phase d'acclimatation.

Des essais effectués cette année ont montré que ce passage de l'*in vitro* à la culture en bac était possible, la différence de rendement étant non significative.

– Selon le contrôle par électrophorèse, le positionnement des protéines n'est pas modifié au niveau des minitubercules. C'est aussi un élément important pour l'identification variétale à ce niveau.

Au stade de la production de minitubercules, il n'est pas nécessaire de rechercher un gros calibre.

Aussi, en augmentant la densité, par exemple 500 plantes/m^2, et en travaillant sur une longue période 4 à 5 mois, il est possible d'obtenir un nombre plus élevé de tubercules.

A densité plus élevée, l'acclimatation en bac à alvéoles n'est plus possible, il faut transférer directement les plantules de l'*in vitro* en bacs simples.

Des essais effectués cette année ont montré que le transfert direct était possible, et les différences de production non significatives, par rapport à un passage préalable en phase d'acclimatation.

– Pour une même variété, l'électrophorèse ne montre aucune différence entre un minitubercule et un tubercule de production de plein champ. Le positionnement des

protéines est identique. L'identification variétale est donc possible au niveau des minitubercules.

– La période de dormance n'est pas plus longue, mais l'évolution du germe est plus lente. Une conduite particulière de la conservation et de l'amenée du minitubercule dans sa phase de germination est nécessaire.

Potentialité des minitubercules

Au champ, les minitubercules montrent une grande homogénéité de levée et de développement végétatif, mais accusent un retard assez sensible par rapport à des tubercules de sélection classique.

Le retard de début de levée est de ± 5 jours et la levée générale de ± 10 jours.

La couverture du sol atteint 80 % à 90 % après 100 jours contre 60 jours en culture traditionnelle.

Ce retard dans le développement phénologique du minitubercule est lié au caractère juvénile du minitubercule qui s'exprime par une dominance apicale du germe qui se comble lentement en cours de culture, d'où moins de tiges et un nombre de tubercules plus faible (jusqu'à 30 %).

Le schéma de production des minitubercules sous abri, la récolte tardive et, par conséquent, le peu de maturité de ces derniers ont pour conséquence de limiter le tubercule dans l'expression de sa capacité de production.

Ce schéma pourrait être modifié.

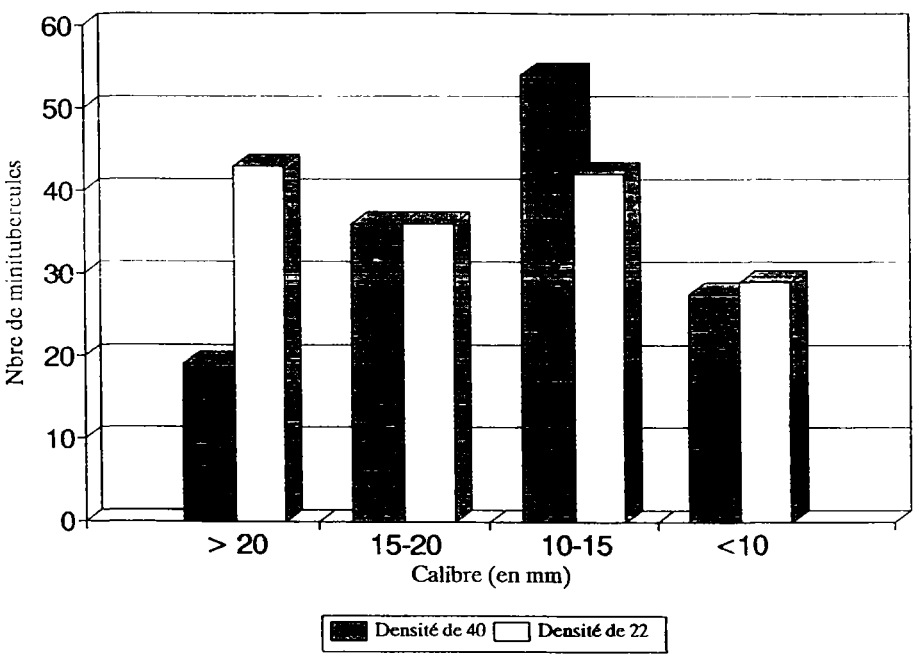


Figure 1. Récolte minitubercules SHB-1993. Essai densité de semis.

En conclusion, il faut améliorer, d'une part, la production de minitubercules en milieu protégé et, d'autre part, la productivité de ces minitubercules pour retrouver le potentiel réel propre à chaque variété.

Au niveau des microplantules, il faut mieux intégrer le facteur densité lié à la variété, maîtriser l'irrigation, voire travailler en technique hydroponique avec récolte échelonnée (type éclaircissage).

Au niveau des minitubercules, il faut retrouver leur potentialité en agissant sur un stockage plus court en frigo, une prégermination longue (8 semaines), un apport N-P rapidement utilisable en début de culture.

L'allongement de la période culturale favorable est bénéfique également, d'où l'intérêt d'effectuer la plantation au champ en région plus chaude ou sous tunnel.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 211-225.

23

Maîtrise de la culture et de la régénération de protoplastes de bananiers en vue de la création de nouvelles structures génétiques

R. HAICOUR [1], L. ROSSIGNOL [1], V. BUI TRANG [2], R. MEGIA [3], S. TIZROUTINE [1]

1. Laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât. 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France.
2. Laboratoire de Physiologie Végétale, Université Hô-Chi-Minh-Ville, 227 Nguyen Van Cu Q5, TP Hô-Chi-Minh, Vietnam.
3. Institut Pertanian Bogor Jurusan Biologi JL Raya Pajajaran, Bogor 16143, Indonésie

Résumé

Plusieurs méthodes mettant en œuvre divers explants ont été appliquées afin d'obtenir des suspensions cellulaires. Ces dernières, initiées soit à partir de génotypes diploïdes, séminifères de l'espèce Musa acuminata *AA (*Long Tavoy, banksii *ou* malaccensis*), soit à partir d'un triploïde, parthénocarpique ABB (le cv.* Matavia*), se sont avérées constituer le meilleur matériel pour la production de protoplastes aptes à se diviser. Un protocole original, utilisant des protoplastes isolés de suspensions cellulaires en phase active de croissance et mis en culture à haute densité sur « couche nourrice », a permis d'obtenir la division soutenue des protoplastes. A partir d'une suspension cellulaire « âgée » de* Long Tavoy *ayant perdu ses capacités morphogénétiques, le stade de cal n'a pas été dépassé. Alors que des suspensions nouvellement initiées, ayant conservé un potentiel embryogène important, peuvent être à l'origine de protoplastes à fort potentiel de développement qui évoluent en structures embryonnaires puis en plantes (*Malaccensis *et surtout* Matavia*), nous avons observé une embryogenèse somatique directe en prenant comme matériel de départ la suspension cellulaire de* Matavia. *On a pu obtenir*

ensuite la production de plantes, à partir de ces embryons, mais en faible nombre (dans 10 % de cas environ). On a noté aussi chez ce même cultivar, à partir des embryons somatiques primaires, la mise en place très vite d'un phénomène d'embryogenèse adventive très intense, qui a permis d'augmenter considérablement le nombre de plantes régénérées. Au cours de ce travail, ont été étudiés un certain nombre de facteurs concernant l'évolution quantitative des protoplastes. Nous avons pu déterminer quels étaient les « nourrices » et les supports les plus efficaces et montrer qu'il existait une réponse spécifique des protoplastes de bananiers concernant à la fois la « couche nourrice » et la barrière physique qui sépare les protoplastes de la « nourrice ». Nous avons établi également le moment où doit être appliquée la couche nourrice, et la durée de contact des protoplastes avec celle-ci. Une étude cytologique a permis, par ailleurs, de préciser les modalités d'évolution des protoplastes au cours du temps. Des premiers essais d'électrofusion de protoplastes ont déjà été effectués. On peut à présent envisager une insertion rapide de ces biotechnologies dans les programmes de sélection classique pour contribuer à une amélioration rapide et efficace des bananiers.

Dès le début de la période historique, les bananiers sont des plantes cultivées principalement pour la consommation de leurs fruits. Plus tardivement la production s'organise autour de deux types d'exploitations en fonction des variétés utilisées. La culture de bananes douces (ou « dessert ») sert avant tout à l'exportation. La culture vivrière (ou d'autoconsommation) concerne essentiellement les bananes à cuire et quelques cultivars de bananes douces.

La production mondiale annuelle de bananes est estimée à 72 millions de tonnes. Les bananes douces représentent environ les deux tiers de cette production dont 9 millions de tonnes sont exportés [11]. Ces chiffres indiquent la grande importance à la fois économique et vivrière de ces plantes. La banane représente, en effet, le premier fruit du commerce international pour le tonnage et la valeur commerciale. Les bananes douces et à cuire sont également, dans de nombreux pays tropicaux et subtropicaux, la principale source de glucides pour des centaines de millions d'habitants sur tous les continents.

L'Asie du Sud-Est est le centre d'origine et le principal centre de diversification des bananiers. Ces plantes, de régions tropicales humides, sont des Monocotylédones herbacées appartenant à l'ordre des Scitaminales, à la famille des Musacées, au genre *Musa* L. et à la section *Eumusa* [27]. Parmi toutes les espèces de cette section, *M. acuminata,* seule ou avec *M. balbisiana,* est à l'origine de tous les bananiers cultivés [29]. Les deux espèces au départ sont diploïdes (2n = 22), sauvages, seminifères. Leur génome est représenté respectivement par les lettre AA (*acuminata*) et BB (*balbisiana*). En Malaisie, Indonésie et Nouvelle-Guinée seraient apparus les premiers individus diploïdes, parthénocarpiques (AA). A partir de ceux-ci se sont constitués les bananiers cultivés, triploïdes pour la plupart (génomes AAA, AAB, ABB) parthénocarpiques et hautement stériles. Les cultivars triploïdes, actuellement les plus répandus, appartiennent aux sous-groupes Cavendish, bananes douces, cultivars d'exportation (AAA), Plantains (AAB) et Bluggoe (ABB), bananes à cuire.

Actuellement la production bananière est sujette à de très lourdes menaces parasitaires (cercosporioses jaune et noire, maladie de Panama, maladie de Moko, virus du Bunchy top – BBTV –, de la mosaïque du concombre – CMV –, charançons et nématodes...). De toutes ces attaques, la plus redoutable est la cercosporiose noire qui affecte à la fois les bananes douces et les plantains.

En raison du faible nombre de cultivars existants et de leur base génétique restreinte, les bananiers cultivés sont des plantes sensibles aux maladies et surtout à la rapide

extension de nouvelles races d'agents pathogènes. De plus, la monoculture, l'absence de rotation des sols, leur mode de propagation végétative rendent les plantes plus sensibles à la pression parasitaire [7]. Face à ces menaces, les techniques de lutte chimique sont souvent inefficaces, et les traitements inutilisables car trop onéreux ou néfastes pour l'environnement.

Pour éviter la baisse des rendements (aussi bien pour les cultures d'exportation que pour la production vivrière), l'objectif principal des programmes d'amélioration est de pourvoir les cultivars existants de résistances ou de créer et/ou de sélectionner de nouveaux génotypes qui soient résistants ou tolérants aux principales maladies (et en particulier à la cercosporiose noire) [22]. De plus, chez ces cultivars, la parthénocarpie et la stérilité femelle doivent être maintenues ainsi qu'une bonne productivité et une bonne qualité des fruits.

Pour atteindre ces objectifs, les méthodes conventionnelles d'amélioration génétique sont restées sans grand succès jusqu'à présent du fait notamment du haut niveau de stérilité et de la polyploïdisation de ces plantes [22]. Ainsi, après plus de soixante années d'hybridations, il y a eu très peu de nouvelles acquisitions et la plupart des cultivars sont encore naturels, résultant de simple sélection clonale et/ou de mutations [24]. Cependant, d'importants programmes d'amélioration sont actuellement en cours (notamment celui mené par le CIRAD/FLHOR en Guadeloupe) [2, 12].

Afin de résoudre certains problèmes difficilement contournables par les voies d'amélioration classique, l'attention est de plus en plus tournée vers l'insertion, dans les nouveaux programmes de sélection, des techniques de culture *in vitro* et de biotechnologies plus avancées utilisant le génie génétique, toutes les fois qu'elles s'avèrent être efficaces [18, 28].

Un certain nombre de ces techniques ont déjà été mises en œuvre chez les bananiers. Nous nous limiterons volontairement, dans cette présentation, à la régénération de plantes à partir de l'isolement et de la culture des protoplastes. Puis nous envisagerons l'utilisation des protoplastes en vue de l'obtention d'hybrides somatiques par électrofusion et dans le cadre du transfert de gènes par électroporation.

L'isolement et la culture des protoplastes

Historique des premiers travaux réalisés sur l'isolement et la culture de protoplastes

Bakry [1] a été le premier à réussir l'isolement des protoplastes à partir de cals inflorescentiels de AAA (cv. *Grande Naine*). Ensuite Chen et Ku [4], Cronauer et Krikorian [5] ont obtenu des protoplastes qui se sont maintenus en survie durant une quinzaine de jours, mais sans qu'aucune division n'ait été notée. L'année suivante, Chaput [3] a observé des protoplastes plus réactifs en culture qui ont été capables de bourgeonner. Avec la culture en gouttes d'agarose de protoplastes provenant de suspensions cellulaires (*Musa acuminata* ssp. *burmannica* génotype *Long Tavoy* (AA), Da Silva Conceicâo [6] a constaté les premières divisions (1-3), mais les protoplastes ont tout de même fini par se nécroser au bout d'un mois. Les suspensions cellulaires se sont avérées, par conséquent, être le matériel le plus approprié pour isoler des protoplastes capables de se diviser chez les bananiers, comme d'ailleurs chez d'autres monocotylédones, céréales en particulier [23].

Matériel utilisé pour la production de protoplastes

Des suspensions cellulaires de quatre génotypes différents dont trois diploïdes (*M. acuminata* ssp. *burmannica Long Tavoy*, ssp. *banksii* et ssp. *malaccensis*) et une triploïde (cv. *Matavia*) ont été employées comme source de protoplastes. Elles sont d'aspects variés (laiteuses ou granuleuses, et dans ce cas, avec nodules de diverses tailles comme chez *Matavia* et la ssp. *malaccensis*) et d'âges différents (ayant de 1 à 6 ans) au moment de leur utilisation comme source de protoplastes.

De plus, les protoplastes ont été isolés durant la phase de croissance active de ces suspensions cellulaires qui est différente selon le génotype utilisé.

Résultats

Observations générales sur l'évolution des protoplastes

• *Rendement, viabilité et variabilité morphologique des protoplastes à l'isolement*

Dès les premières minutes d'incubation du matériel dans la solution enzymatique, on peut observer la libération de protoplastes. La quantité de protoplastes obtenue par gramme de suspension cellulaire initiale (masse de matière fraîche) en fin de macération varie selon les génotypes utilisés :

- *M. acuminata* ssp. *burmannica Long Tavoy* = 4 - 5.10^5/g de masse fraîche.
- *M. acuminata* ssp. *malaccensis* = 1,2 - 4.10^5/g de masse fraîche.
- Bluggoe cv *Matavia* = 1,1 - 3.10^5/g de masse fraîche.

Les suspensions granuleuses à nodules (malaccensis, Matavia) semblent libérer moins de protoplastes que la suspension sans nodules *(Long Tavoy).*

Des échantillons d'au moins 500 protoplastes ont été comptés sous microscope inversé après coloration au FDA [30]. Plus de 90 % des protoplastes isolés sont viables comme le montre leur coloration jaune vert en fluorescence.

La taille et le contenu cytoplasmique des protoplastes varient selon le génotype utilisé et également à l'intérieur d'un même génotype pour une même culture.

Le contenu cytoplasmique des protoplastes de *Long Tavoy* (Pl.IA), de la ssp. *banksii* et de la ssp. *malaccensis* est plus ou moins dense et relativement homogène. Chez le génotype *Matavia* (Pl.IIA), on observe nettement deux types de protoplastes : ceux de taille plus importante, relativement vacuolisés, et chargés de gros grains d'amidon et ceux de plus petite taille, à cytoplasme dense. Le premier type dérive vraisemblablement des cellules de la zone périphérique des gros nodules, riche en réserves amylacées. Le deuxième pourrait avoir pour origine les cellules des massifs à caractères embryogènes de la suspension et des cellules méristématiques des nodules.

• *Mise au point d'un protocole original pour la culture des protoplastes*

Les protoplastes ont été mis en culture à haute densité (5×10^5 protoplastes/ml de milieu) sur un milieu avec cellules « nourrices ». La coculture de protoplastes avec des cellules « nourrices » a été souvent utilisée pour activer les divisions. Cette technique, employée pour la première fois par Schneyour *et al* [26] chez des Solanacées (*Nicotiana tabacum* et *Petunia hybrida*) l'a été depuis dans de nombreux autres cas et surtout chez des céréales. Nous l'avons appliquée aux bananiers.

• ***Apparition de la paroi et les diverses étapes du développement***

On a pu constater chez des protoplastes venant d'être isolés, la disparition complète de la paroi par l'absence de fluorescence après coloration au calcofluor qui se fixe sur la cellulose. Le suivi microscopique de l'apparition de la paroi, visualisée par la même coloration, nous a permis de constater :

– que pendant les premières 24 heures après leur mise en culture, la synthèse de la paroi des protoplastes se faisait de façon fragmentaire ;

– qu'après 3 jours de culture, 2 % des protoplastes avaient régénéré une paroi complète et commencé à se diviser.

Chez tous les génotypes étudiés, la première division est très discrète. Elle apparaît dès le deuxième jour pour un petit nombre d'entre eux et s'opère de façon non simultanée pour les autres.

Après 3 à 5 jours de culture chez *Long Tavoy*, les premières et deuxièmes divisions se sont produites (Pl.IB et C). On assiste à la formation de microcolonies quelques jours plus tard, puis de microcals au bout de deux semaines (Pl.ID). Après 2 mois de culture, des structures callogènes sont repérables (Pl.IE) [15].

Dans le cas de *Long Tavoy* âgée, pour vérifier si des cals obtenus au-dessus de la couche « nourrice » sont vraiment des cals de bananier *Long Tavoy,* et non le résultat d'une contamination du support par des cellules « nourrices » de *Lolium*, nous avons procédé à des observations morphologiques et cytologiques ainsi qu'à des analyses isoenzymatiques.

Des observations morphologiques et cytologiques montrent, en effet, que les cellules des suspensions cellulaires de *Long Tavoy* sont différentes de celles du *Lolium*. Ainsi, le diamètre moyen des cellules de *Long Tavoy* est plus petit et le cytoplasme est plus dense que celui de cellules de *Lolium*. Les chromosomes de *Lolium* sont aussi plus longs que ceux de *Long Tavoy*. Il résulte de ces observations que les cellules des cals obtenus au-dessus de la couche « nourrice » ont les caractères morphologiques et cytologiques des cellules de la suspension de *Long Tavoy*.

Nous avons mis en évidence deux isozymes : la phosphoglumutase (PGM) et l'alcool déshydrogénase (ADH) qui sont capables de distinguer le matériel bananier du matériel *Lolium*. Puisque les zymogrammes des cals, localisés au-dessus du support les séparant de la couche « nourrice » concordent avec celui du matériel de banane, on peut en conclure que ces cals sont bien dérivés des protoplastes des bananes.

Chez le cv. *Matavia*, des massifs paucicellulaires de deux à trois cellules issus de la division de protoplastes sont visibles au bout d'une semaine de culture (Pl.IIB). Au 14^{e} jour de culture, des massifs pluricellulaires de tailles variées, peuvent être observés (Pl.IIB et C). Dès le 50^{e} jour, des globules apparaissent, déjà épidermisés (Pl.IID). Après deux mois de culture, des structures globulaires embryogènes sont discernables (Pl.IIE). On peut même parfois noter la présence d'un pseudo-suspenseur comme dans les embryons zygotiques. De plus, ces structures globulaires apparaissant cytologiquement conformes à celles des embryons zygotiques classiques de bananiers (Pl.IIF), nous les avons qualifiées d'embryons somatiques. Du fait que tous les protoplastes n'entreprennent pas leur évolution simultanément, on retrouve, dans la culture, diverses étapes de leur développement : massifs cellulaires inorganisés, globules organisés, embryons somatiques bien formés [17].

Étude de quelques facteurs conditionnant l'évolution quantitative des protoplastes (provenant en particulier de la suspension *Long Tavoy* âgée)

• ***Étude comparée de diverses couches « nourrices »*** **[15]**

Nous avons comparé (Tableau I) l'effet de 3 suspensions cellulaires, utilisées comme couches « nourrices » (*Lolium multiflorum*, *Triticum monococcum* et *M. accuminata. Long Tavoy*) sur des cultures initiales de 0,5 ml de protoplastes de *Long Tavoy*. Cinq répétitions ont été effectuées. Le témoin est constitué par des protoplastes déposés sur du milieu « nourrice » sans cellules « nourrices ». Les supports utilisés ont été soit la double épaisseur de toile à bluter en nylon (mailles 10 µm), soit une membrane Millipore blanche (mailles 0,22 µm) et le régulateur de croissance utilisé dans le milieu « nourrice » le 2,4-D (2mg/l).

Après 3 mois de culture, les cals issus de protoplastes ont été pesés et les masses obtenues sont présentées dans le Tableau I. Tout d'abord, certaines colonies cellulaires peuvent se développer parfois chez le témoin, c'est-à-dire en l'absence de cellules « nourrices ». Ainsi la masse moyenne observée après 3 mois de culture est relativement faible (4,8 mg).

L'utilisation d'une couche « nourrice » favorise très nettement le développement des protoplastes de *Long Tavoy* mais cette action est plus ou moins importante selon la « nourrice » utilisée. En particulier celle de *Lolium multiflorum* provoque une augmentation de masse moyenne égale à 163 et à 442 mg. De même la « nourrice » *Long Tavoy* peut entraîner une augmentation importante de la masse qui peut être égale à 367 mg. Avec la nourrice *Triticum monoccocum* en revanche, la culture de protoplastes est moins stimulée et la masse des cals obtenus est en moyenne inférieure à celle observée avec les autres « nourrices ». Donc les deux couches « nourrices » les plus efficaces sont : celle de *Lolium* et celle de *Long Tavoy*. Ce sont aussi les « nourrices » qui se divisent le plus activement. On doit cependant constater de fortes variations dans les résultats pour un même type de culture « nourrice » en particulier lorsqu'il s'agit de *Long Tavoy*.

Tableau I. Effet de la nature de la « nourrice » et du support sur l'évolution des protoplastes du génotype *Long Tavoy*. Masses des diverses cultures en mg, après 3 mois de culture.

Support	**Toile à bluter**				**Millipore**			
Couche « nourrice »	*Lolium multiflorum*	*Triticum monococcum*	*M. acuminata Long Tavoy*	*Témoin*	*Lolium multiflorum*	*Triticum monococcum*	*M acuminata Long Tavoy*	Témoin
Répétition								
1	116	142	431	4	346	3	3	4
2	149	90	521	6	455	5	2	10
3	126	114	140	3	405	4	5	3
4	309	8	618	2	533	4	24	3
5	115	121	125	8	471	3	17	4
Moyenne	163 ± 37,0	95 ± 23,3	367 ± 100,2	4,6 ± 1,1	442 ± 31,5	3,8 ± 0,4	10,2 ± 4,4	4,8 ± 1,3

• ***Effet combiné de la couche « nourrice » et du type de support utilisé*** **[15]**

Comme le montre le Tableau I, les cellules de la « nourrice » de *Lolium* provoquent une prolifération très élevée de cellules de bananiers issues de protoplastes (442 ± 31,5 mg) avec le Millipore comme support. Il en est de même lorsque la couche « nourrice » est constituée de cellules de *Long Tavoy* et que le support est de la toile à bluter (367 ± 100,2).

Cela indique qu'il y a une réponse spécifique des protoplastes de bananiers *(Long Tavoy)* vis-à-vis à la fois de la couche « nourrice » et de la barrière physique utilisées.

Pour affiner les résultats, on a voulu comparer l'évolution des protoplastes de *Long Tavoy* sur couche « nourrice » *M. acuminata Long Tavoy* avec comme régulateur de croissance le 2,4-D, en fonction de divers supports : toile à bluter, Millipore blanc, disque de cellophane, disque de membrane à dialyse.

Il ressort de cette expérimentation que la toile à bluter et le Millipore blanc constituent les meilleurs supports pour la culture de protoplastes de bananiers.

Des recherches effectuées à KUL *(Catholic University of Leuven),* il ressort que l'évolution des protoplastes est facilitée par une forte densité de protoplastes (10^6 protoplastes/ml), et par l'utilisation d'une couche « nourrice », celle-ci étant séparée des protoplastes par un filtre Millipore noir [21]. Ayant à notre tour vérifié l'efficacité du Millipore noir qui de plus facilite grandement les observations, nous mettrons à présent en culture les protoplastes de bananiers à plus forte densité, sur couche « nourrice » (*Long Tavoy*), et avec comme support le Millipore noir.

• ***Effet de la durée du contact des protoplastes avec la couche « nourrice » sur le développement***

Les huit traitements effectués sont présentés dans la Figure 1A. Nous avons utilisé la suspension cellulaire de *Long Tavoy* comme couche « nourrice ». Le régulateur de croissance employé dans le milieu « nourrice » est le 2,4-D, et le support la double épaisseur de toile à bluter. Quatre répétitions ont été réalisées pour chacun des traitements. Le milieu utilisé pour le témoin est identique au milieu « nourrice », à l'exception près qu'il ne contient pas de cellules « nourrices » de bananier.

Le développement des cals a été apprécié par pesées au cours de la culture (à 0, 3, 8, 15, 30 et 60 jours).

Les résultats obtenus (Figure 1B) montrent que la couche « nourrice » est nécessaire surtout en début de culture. Le traitement 8 montre qu'il n'y a pas de développement des protoplastes en cals quand le milieu est dépourvu de cellules « nourrices » lors de la première semaine de culture. On obtient le même résultat quand la couche « nourrice » a été présente seulement de 0 à 15 jours (traitements 7, 1, 2, 3).

Une durée de contact de 30 jours peut devenir favorable à un développement des protoplastes en cals (traitement 4).

Le meilleur résultat a été obtenu après 60 jours de culture sur la couche « nourrice » (traitement 5) et avec des conditions de culture sans changement de milieu.

Dans une expérimentation analogue, effectuée avec des protoplastes de *Matavia*, on a aussi observé que la masse fraîche produite à partir de protoplastes était la plus élevée après 60 jours de culture en continu sur couche « nourrice » (traitement 5).

Par conséquent, la durée de contact des protoplastes avec leur « nourrice », le moment et la durée de son application ont été précisés. Pour être efficace, la « nourrice » doit intervenir dès le début de la culture, et sur une période de 60 jours, en continu, sans changement de milieu.

A/ traitements effectués

Traitement	Jour					
	0	3	8	15	30	60
1	I=====	I*-------	I -------	I ----------	I ----------	I
2	I=====	I =====	I*-------	I ----------	I ----------	I
3	I=====	I =====	I =====	I*----------	I ----------	I
4	I=====	I =====	I =====	I========	I*----------	I
5	I=====	I =====	I =====	I ========	I ==========	I
6	I=====	I*====	I*====	I*========	I*==========	I*
7	I --------	I --------	I --------	I ----------	I ----------	I
8	I --------	I*====	I=====	I========	I==========	I

======= = milieu "nourrice" (avec cellules "nourrices" Long Tavoy).

..... = milieu "nourrice" (sans cellules "nourrices")

I = pesée

* = transfert sur milieu frais

B/ résultats

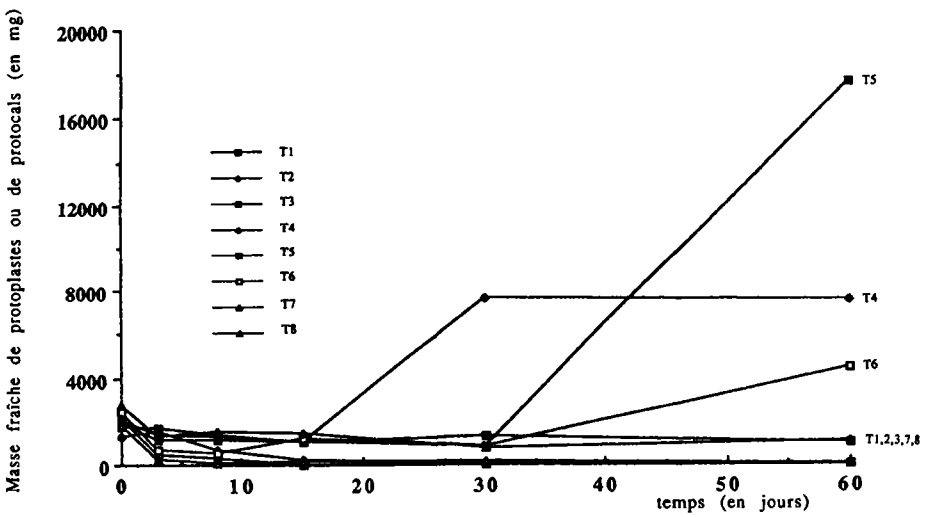


Figure 1. Effet de la durée de contact des protoplastes avec la « nourrice » sur leur développement (génotype *Long Tavoy*). A. Traitements effectués. B. Résultats.

Recherche des conditions permettant la régénération de plantes

• ***A partir des cals issus des protoplastes de*** **Long Tavoy**

De nombreuses tentatives de régénération à partir de cals de protoplastes d'une suspension de *Long Tavoy* âgée ont été réalisées. Elles se sont toutes soldées par un échec. Nous pensons que cet insuccès est lié à la perte des capacités morphogènes de cette suspension âgée qui se retrouve aussi dans les protoplastes, puis dans les cals qui en dérivent.

Avec la nouvelle suspension cellulaire embryogène des *Long Tavoy,* des protoplastes ont été obtenus et mis en culture sur couche nourrice. L'expérimentation est en cours.

• ***A partir des structures organisées de*** **Matavia**

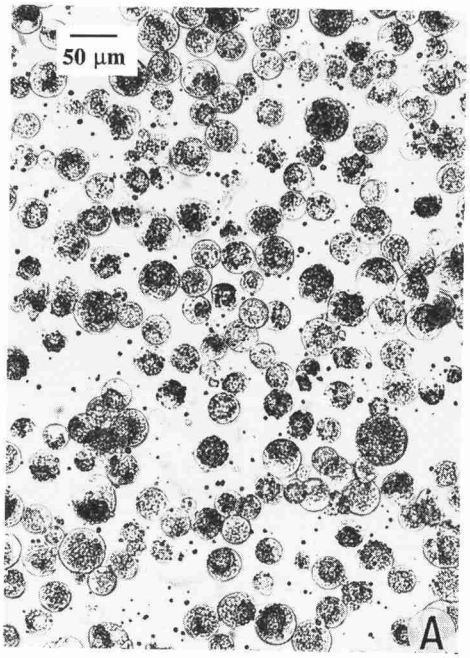
Les structures organisées (structures proembryonnaires et embryonnaires à divers stades) issues de la division de protoplastes du cv. *Matavia*, après 2 à 3 mois de culture sur couche « nourrice », ont été transférées sur des milieux solides, enrichis en BAP pour assurer leur germination. Sur ces milieux on a pu constater que seulement 10 % environ des embryons primaires ont été capables de germer et de se développer en plantes (Pl.IIIA) que l'on a pu, sans aucune difficulté, transférer en serre (Pl.IIIB). On obtient donc, chez ce cultivar, la régénération de plantes à partir de protoplastes, au travers d'un processus d'embryogenèse directe, ce qui a déjà été observé chez le blé par Li *et al.* [13]. La régénération de plantes par embryogenèse somatique directe à partir de protoplastes a également été réussie chez ce même cultivar à KUL [21].

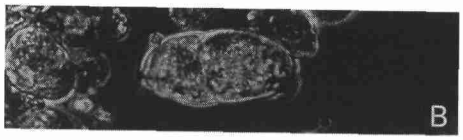
Les structures embryonnaires primaires restantes, laissées sur milieu enrichi en BAP, ont été le siège d'un phénomène d'embryogenèse secondaire adventive (Pl.IIIC, D et E). Cette embryogenèse adventive très intense prend naissance dans les assises superficielles des structures embryonnaires primaires qui se recouvrent alors d'un tissu jaunâtre, plus ou moins friable. Ce phénomène, s'il gêne le développement en plantes des embryons primaires, aboutit par ailleurs à une production considérable de plantes à partir des embryons secondaires (Pl.IIIE). Cette embryogenèse adventive illustre, en tous cas, la totipotence à long terme des cellules de ce type de matériel. Des embryons somatiques adventifs ont été également observés par Dhed'a *et al.* [8], lors de la régénération de plantes à partir de suspensions cellulaires chez ce même cultivar.

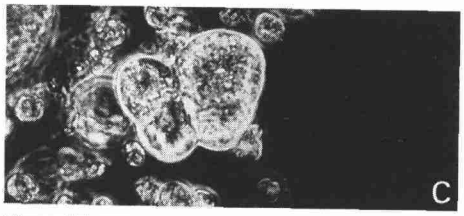
Travaux en cours et perspectives

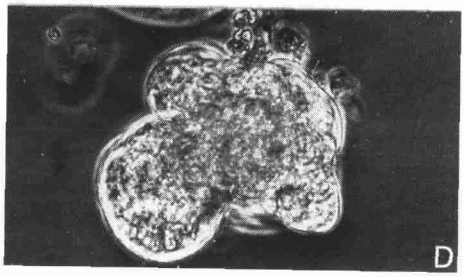
Ayant obtenu la régénération des plantes à partir de protoplastes en particulier chez le cv. *Matavia*, un essai est actuellement en cours avec ce cultivar au CIRAD-FLHOR en Guadeloupe. Il vise a établir, dans des conditions agronomiques en champ et sur au moins deux cycles, la conformité morphologique et cytologique des plantes régénérées à partir de protoplastes. Ces plantes seront comparées à d'autres, issues de cultures hautement proliférantes, ayant subi un nombre élevé de repiquages (ces cultures étant le point de départ de la suspension embryogène source des protoplastes), et à des individus témoins provenant de micropropagation.

La régénération est difficile à obtenir chez les Monocotylédones, surtout à partir de cellules isolées et de protoplastes. La maîtrise de ce phénomène et l'obtention de plantes à la fois à partir de suspensions cellulaires embryogènes [8, 9, 10, 14, 16, 19] et









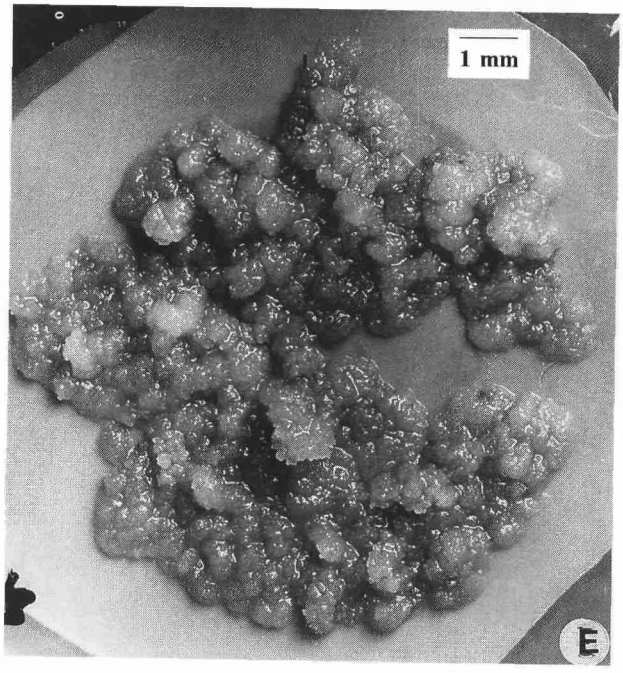


Planche I. Les étapes du développement à partir de protoplastes chez le génotype *Long Tavoy*. **A :** Population de protoplastes de *Long Tavoy*. **B et C :** Première et deuxième division des protoplastes après 3 à 5 jours de culture. **D :** Apparition de microcals au bout de deux semaines de culture. **E :** Cals dérivés, au bout de 3 semaines de culture, de protoplastes déposés sur couche « nourrice » *Lolium* et avec comme support une double épaisseur de toile à bluter. n = couche « nourrice » ; t = toile à bluter.

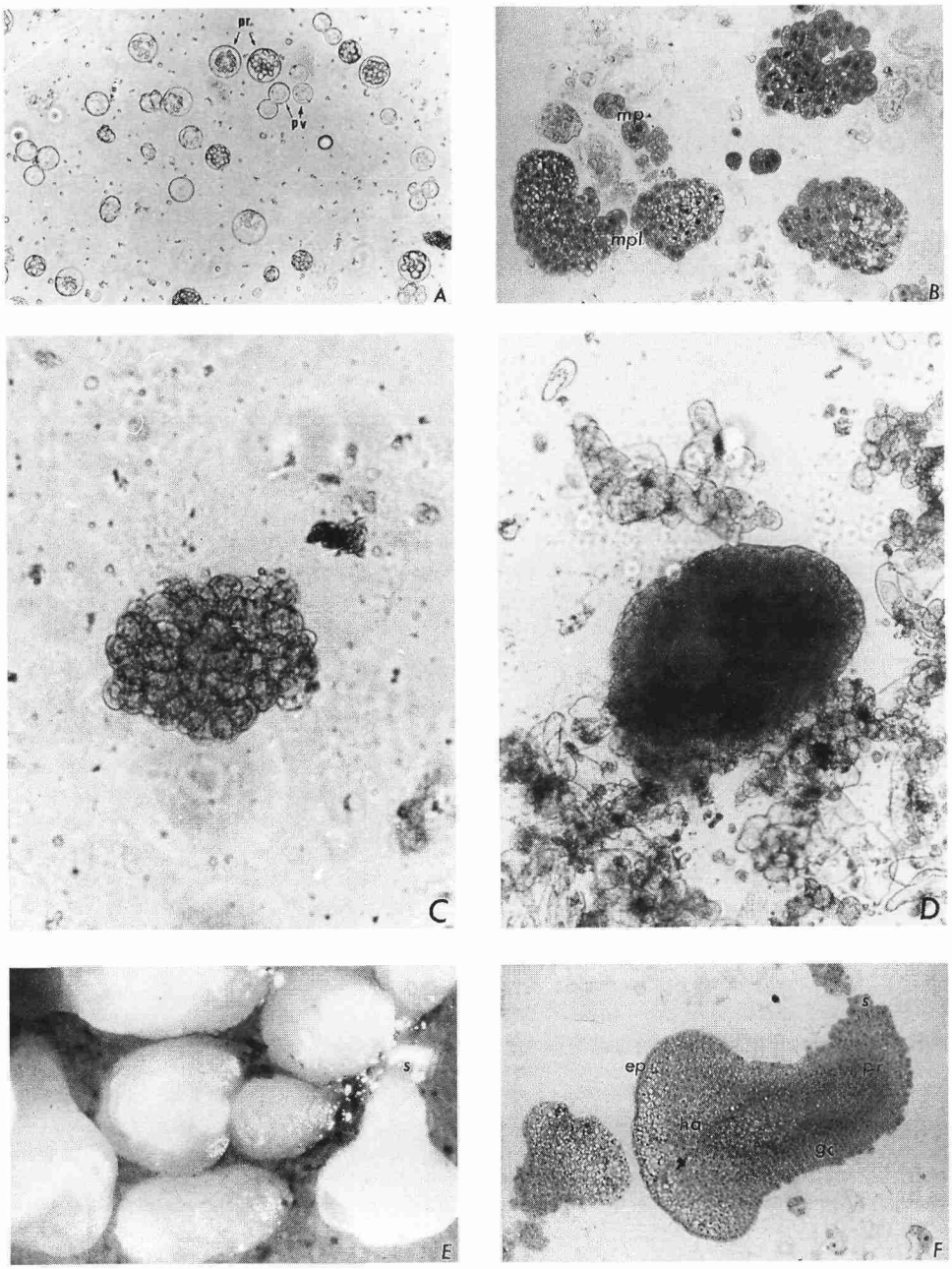
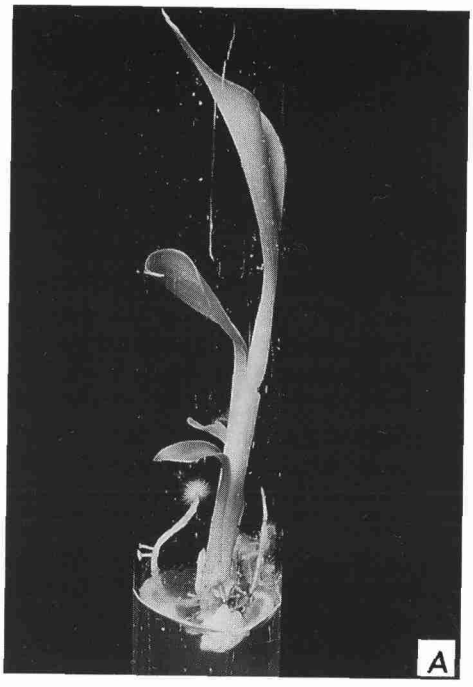
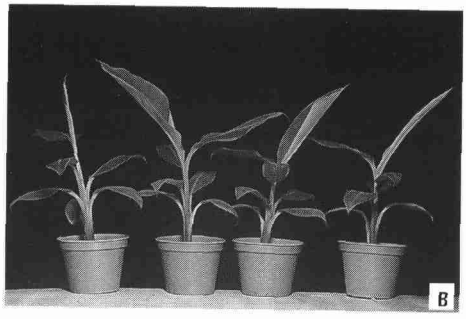
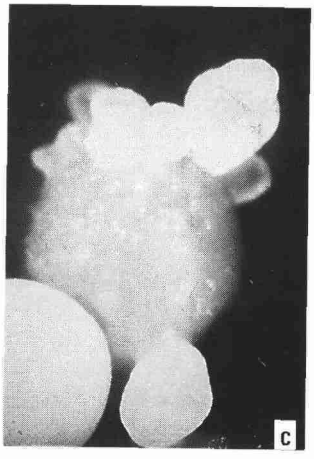
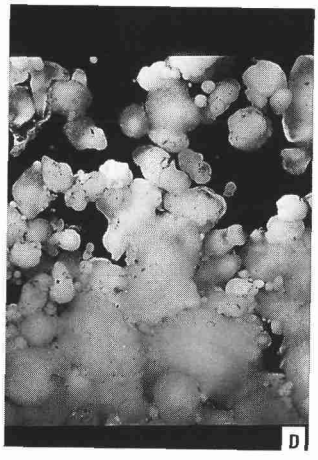


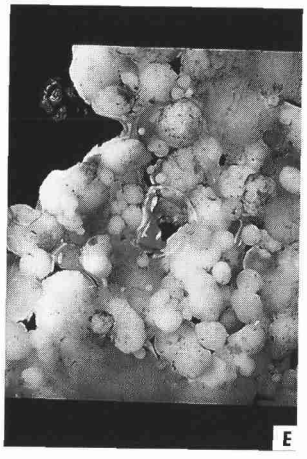
Planche II. Les étapes de développement à partir de protoplastes chez le cv. *Matavia.*
A : Population de protoplastes de *Matavia* avec présence de deux types de protoplastes : les uns plus gros, relativement vacuolisés et chargés de réserves (pr) et les autres, plus petits, à cytoplasme dense (pv). **B :** Massifs paucicellulaires de 2 à 3 cellules (mp) et massifs pluricellulaires (mpl) provenant du développement de protoplastes. **C :** Amas cellulaire provenant de la division de protoplastes au 14e jour de culture. **D :** Globule épidermisé après 50 jours de culture. **E :** Embryons somatiques avec suspenseur au bout de 3 mois de culture. s = suspenseur. **F :** Section longitudinale d'un embryon. ép : épiderme ; ha : haustorium ; gc : gaine cotylédonnaire ; pr : pôle racinaire ; s : suspenseur.











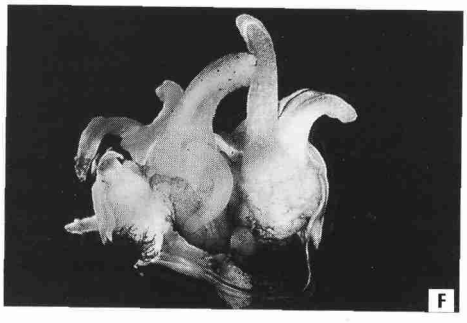


Planche III. Obtention de plantes chez le cv. *Matavia.*
A et **B :** obtention de plantes *in vitro* (A) à partir de la germination des embryons primaires puis passage de ces plantes en serre (B). **C, D** et **E :** A partir de structures embryonnaires primaires formation de nombreux embryons secondaires, de différentes tailles. **F :** Développement en plantes de ces structures secondaires.

de protoplastes [17, 21] a permis de lever chez les bananiers le principal goulot d'étranglement pour la mise en œuvre des biotechnologies.

Aussi avons-nous entrepris des expériences de transfert de gènes qui conduisent à des modifications plus ponctuelles (transformation) ou plus importantes du génome (fusion somatique).

Concernant ce dernier secteur, des essais d'abord réalisés en autofusion ont permis d'adapter l'appareil d'électrofusion aux protoplastes de bananiers.

Des essais d'hétérofusions, avec les autofusions correspondantes des deux parents, ont ensuite été réalisés en utilisant les protoplastes des suspensions cellulaires en notre possession (*M. acuminata* ssp. *burmannica Long Tavoy*, ssp. *banksii* et ssp. *malaccensis* et le cultivar *Matavia*). Ainsi des hétérofusions (2x + 2x) et (2x + 3x) ont été effectuées. Des pseudo-cals, avec des structures organisées, et des structures organisées plus isolées, ont été obtenus. L'analyse histologique de ces diverses formations est en cours de réalisation. L'évolution morphologique de ces diverses formations va être poursuivie.

Des études ont été déjà entreprises au niveau des suspensions cellulaires et des protoplastes issus de celles-ci, afin de trouver des isozymes qui permettent de les distinguer et qui pourront être utilisés, dans un premier temps, pour séparer les produits de fusion.

Les recherches sur la sélection au niveau diploïde et sur l'haplogenèse ayant bien progressé au CIRAD-FLHOR en Guadeloupe, il sera bientôt possible de disposer de matériels haploïde et diploïde intéressants, avec lesquels on pourra réaliser des fusions d'intérêt agronomique. Cela devrait aboutir à l'obtention de nouveaux génotypes de bananes douces (AAA) et de bananes à cuire (AAB) possédant des résistances en particulier.

Dans l'optique de la transformation chez les bananiers, on peut pratiquer l'électroporation de protoplastes. L'équipe du laboratoire de *Tropical Crop Husbandry* à Louvain a déjà utilisé cette technique chez le Bluggoe et a obtenu une expression transitoire du gène Gus variant entre 10^{-4} et $5/10^{-5}$ [25]. Ces résultats sont bien inférieurs à ceux notés par cette équipe dans le même temps avec la biolistique (canon à particules à hélium) sur des suspensions cellulaires. Cependant, l'origine unicellulaire des plantes régénérées après électroporation évite l'apparition de chimères. Ces techniques auxquelles on peut ajouter l'ultrasonisation sont actuellement en plein développement [20]. Nous allons nous intéresser à l'électroporation en coopération avec le laboratoire de KUL et continuons à progresser en biolistique [16] avec le nouveau canon à hélium construit au laboratoire et devenu maintenant opérationnel. Actuellement, nous essayons de mettre au point une technique efficace permettant de sélectionner de façon vitale les cellules transformées, en utilisant des gènes de sélection (NPTII et bar...). Il conviendra ensuite de vérifier la stabilité de la transformation et d'obtenir la régénération des plantes à partir des cellules transformées. Une fois ces divers points réalisés avec succès, on sera alors en mesure d'intégrer chez les bananiers des gènes agronomiquement intéressants, lorsque ceux-ci seront disponibles.

Ainsi, grâce, en particulier, à la coopération fructueuse de diverses équipes associées au sein des programmes STD2 et STD3 et à la volonté commune de mettre en œuvre de nouvelles techniques, de grands progrès ont pu être réalisés chez les bananiers. On peut à présent envisager une insertion rapide de biotechnologies dans les programmes de sélection plus classique pour contribuer à une amélioration rapide et efficace des bananiers.

Références

1. Bakry F (1984). Choix du matériel à utiliser pour l'isolement de protoplastes de bananier *(Musa* sp.). *Fruits* 39 (7-8) : 449-452.
2. Bakry F, Escalant JV, Haicour R, Horry JP, Leblanc L, Megia R, Rossignol L (1992). Applications of biotechnologies to banana breeding : haplomethods, regeneration of protoplasts and transformation. In : *INIBAP Workshop-Biotechnology for banana and plantain,* San José, Costa Rica, January 1992 : 27-31.
3. Chaput MH (1987). Isolement et culture de protoplastes chez divers génotypes de bananier *(Musa* sp.) DEA de Génétique et Sélection Animale et Végétale. Université de Paris-Sud, 13 p.
4. Chen WH, Ku ZC (1985). Isolation of mesophyll cells and protoplasts, protoplast fusion and culture in banana. *J Agric Assoc China* 129 : 56-57.
5. Cronauer SS, Krikorian AD (1986). Banana *(Musa* spp.), In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry,* Vol. I, Trees Berlin Heidelberg, Springer-Verlag : 233-252.
6. Da Silva Conceição A (1989). Isolement et culture de protoplastes de bananiers *(Musa* sp) : étude de divers facteurs. DEA Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, 12 p.
7. Delvaux B, Perrier X, Guyot PH (1990). Diagnostic de la fertilité de systèmes culturaux intensifs en bananeraies à la Martinique. *Fruits* 45 (3) : 223-236.
8. Dhed'a D, Dumortier F, Panis B, Vuylsteke D, De Langhe E (1991). Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. « Bluggoe » *(Musa* spp. ABB group). *Fruits* 46 : 125-135.
9. Escalant JV, Teisson C (1988). Embryogenèse somatique chez *Musa* sp. *CR Acad Sci Paris,* 306, Série III : 277-281.
10. Escalant JV, Teisson C (1989). Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana. Plant Cell Rep* 7 : 665-668.
11. Ganry J (1992). Le projet CEE-STD : motivations, réalisation et perspectives. In : Wills B, ed. Symposium International sur l'Amélioration Genétique des Bananiers pour la Résistance aux maladies et Ravageurs. CIRAD 7-9 septembre, Montpellier, France 1992 (sous presse).
12. Horry JP, Bakry F, Ganry J (1992). Création variétale par hybridation au niveau diploïde. In : Wills B, ed. Symposium International sur l'Amélioration Genétique des Bananiers pour la Résistance aux Maladies et Ravageurs. Montpellier, France 7-9 septembre 1992 (sous presse).
13. Li Zy, Xia GM, Chen HM (1992). Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic cell suspensions of wheat *(Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 28 : 79-85.
14. Marroquin CG, Paduscheck C, Escalant JV, Teisson C (1993). Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata* ssp *burmannicoïdes* and *Musa accuminata* ssp *malaccensis. In Vitro Cell Dev Biol* 29 : 43-46.
15. Megia R, Haïcour R, Rossignol L, Sihachakr D (1992). Callus formation from cultured protoplasts of banana *(Musa* sp.). *Plant Sci* 85 : 91-98.
16. Megia R (1993). Obtention de suspensions cellulaires embryogènes, maîtrise du développement à partir de protoplastes et premiers essais de transformation chez les bananiers. Thèse Doctorat en Sciences, Université Paris-Sud, Orsay, 206 p.
17. Megia R, Haicour 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., ABB group). *Plant Cell Rep* 13 : 41-44.
18. Murfett J, Clarke A (1987). Producing disease-resistant *Musa* cultivars by genetic engineering. In : Persley GJ, De Langhe EA, eds. Banana and plantain breeding strategies. *ACIAR Proceeding* 21 : 87-94.
19. Novak FJ, Afza R, Van Duren M, Perea-Dallos M, Conger BV, Tang XL (1989). Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas *(Musa* spp.). *Biotechnology* 7 : 154-159.

20. Panis B, Swennen R (1992). Cell suspension in *Musa :* applications and prospects. In : Wills B, ed. International Symposium on Genetic Improvement of Bananas for Resistance to Diseases and Pests. CIRAD 7-9 septembre 1992. Montpellier, France (sous presse).
21. Panis B, Wauwe AV, Swennen R (1993). Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana (*Musa* ssp.). *Plant Cell Rep* 12 : 403-407.
22. Persley GJ, De Langhe EA (1987). Banana and plantain breeding strategies. *ACIAR Proceedings* 21 : 187 p.
23. Rhodes CA, Lowe KS, Ruby KL (1988). Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures. *Biotechnology* 6 : 56-60.
24. Rowe PR (1984). Breeding bananas and plantains. In : Janick I, ed. *Plant Breed Rev* 7 : 135-155.
25. Sagi L, Remy S, Panis B, De Smet K, Cammue B, Volckaert G, Swennen R (1992). Transient gene expression in banana protoplasts and cells. Poster Session. In : Wills B, ed. International Symposium on Genetic Improvement of Bananas for Resistance to Diseases and Pests. CIRAD septembre 7-9, 1992. Montpellier, France (sous presse).
26. Schneyour Y, Zelcer A, Izhar S, Beckmann JS (1984). A simple feeder-layer technique for the plating of plant cells and protoplasts at low density. *Plant Sci Lett* 33 : 293-302.
27. Simmonds NW (1966). *Bananas.* Longman Ed., 2e Edition. Londres, 512 p.
28. Stover RH, Buddenhagen IW (1986). Banana breeding : polyploidy, disease resistance and productivity. *Fruits* 41 (3) : 175-191.
29. Stover RH, Simmonds NW (1987). *Bananas.* Third edition. Longman Scientific and technical. Essex, England, 468 p.
30. Widholm JM (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology,* 47 (4) : 189-194.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 227-232.

24

Régénération *in vitro* et acclimatation du caroubier *(Ceratonia siliqua* L.)

M. BELAIZI, M.R. BOLEN, P. BOXUS

Centre de Recherches Agronomiques, Station des Cultures Fruitières et Maraîchères, 234, chaussée de Charleroi, 5030 Gembloux, Belgique.

Résumé

*La micropropagation du caroubier (*Ceratonia siliqua *L.) a été réalisée à partir de nœuds prélevés sur des plantules issues de germination. La mise en culture et la prolifération de ce matériel juvénile n'ont pas posé de problèmes.*

Le milieu de multiplication constitué des macroéléments et des microéléments de Quoirin et Lepoivre [5], *de $FeNa_2EDTA$ et des vitamines de Walkey* [8] *a permis d'obtenir un taux de multiplication de l'ordre 2 à 4,5 en présence de BAP 0,5 mg/l, GA_3 0,1 mg/l et IBA 0,1 mg/l.*

L'emploi d'antigibbérelline, comme l'ancymidol, dans le milieu de multiplication a donné lieu à d'abondantes régénérations du type agglomérats de méristèmes. La miniaturisation des explants de caroubier a aussi été obtenue avec le paclobutrazol.

L'enracinement s'est situé entre 60 % et 95 %. La qualité des racines et le pourcentage d'enracinement ont été améliorés par un traitement à l'obscurité et en présence de vermiculite dans le milieu de développement racinaire.

L'acclimatation des plantules n'a pas posé trop de problèmes. Les plantes sont transférées sur un substrat composé de terreau et de vermiculite, maintenues à l'étouffée dans une atmosphère saturée en eau, puis acclimatées progressivement à l'atmosphère ambiante.

Le caroubier *(Ceratonia siliqua* L.) est un arbre cultivé dans les régions méditerranéennes pour son fruit. Le produit principal extrait de la gousse est la gomme de caroube.

Les premières tentatives de multiplication *in vitro* ont été réalisées par Martins-Loucao et Rodriguez-Barrueco [3], qui n'ont observé qu'une formation de cal. Les premiers succès ont été obtenus par Sebastian et McComb [6], et par Vinterhalter *et al.* [7].

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un programme de sélection clonale qui vise à produire rapidemment de grandes quantités d'arbres sélectionnés, adaptés aux conditions marginales de sol, de climat, et de relief des régions méditérranéennes.

Matériel et méthodes

Les explants sont prélevés sur des semis en serre. La désinfection est faite à l'hypochlorite de calcium 7 % pendant 30 minutes, suivie de 3 à 4 rinçages à l'eau distillée stérile.

Le milieu nutritif de base contient les sels minéraux de Quoirin et Lepoivre [5], le $FeNa_2EDTA$, les vitamines de Walkey [8], les substances de croissance (BAP 0 à 1,5 mg/l, GA_3 0 à 0,5 mg/l, IBA 0 à 2 mg/l), le saccharose à 30 g/l, le milieu est gélifié par de l'agar (Pasteur) à 5 g/l, le pH est ajusté à 5,7 avant l'autoclavage.

Les explants sont soumis à une photopériode de 16 heures par jour et à une température de 23 ± 1° C. L'éclairage est assuré par des tubes fluorescents Philips Daylight de 40 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$.

Résultats

Les travaux de micropropagation du caroubier sont développés au laboratoire depuis septembre 1991.

Pour la mise en culture *in vitro* des explants, les substances hormonales BAP (0,5 ou 1 mg/l), IBA (0 ou 0,1 mg/l), GA_3 (0 ou 0,1 mg/l) sont ajoutées au milieu nutritif. Quelques oxydations dues à la libération de composés phénoliques peuvent apparaître dans le milieu de culture. Pour éliminer ces oxydations, les explants sont immédiatement transférés sur un nouveau milieu frais. Un bon débourrement et une élongation des pousses sont observés sur les milieux qui contiennent la GA_3. Après 4 semaines de culture, le débourrement est de l'ordre de 80 %. Les explants allongés sont sevrés et transférés sur milieu de multiplication.

Les essais préliminaires ont permis de tester plusieurs milieux de multiplication, qui diffèrent par la concentration des substances de croissance (BAP 0 à 1,5 mg/l, IBA 0 à 0,1 mg/l, GA_3 0 à 0,25 mg/l). Les coefficients de multiplication obtenus varient de 2 à 5 (Tableau I). Les concentrations en BAP supérieures à 0,5 mg/l provoquent une forte callogenèse et une vitrification de l'explant, aussi ont-elles été supprimées (Tableau II, Figure 1).

L'emploi d'antigibbérelline comme l'ancymidol ou le paclobutrazol a été testé en phase de multiplication (l'ancymidol 0,1 à 1 mg/l, le paclobutrazol 1 mg/l). Ces substances donnent d'abondantes régénérations du type agglomérats de méristèmes, et entraînent une miniaturisation des bourgeons. En présence de BAP 0,5 mg/l, les taux de multiplication sont très élevés, de 11 à 16 (Figure 2). Il est possible de maintenir les explants miniaturisés sur le même milieu nutritif pendant plusieurs mois. Une partie de

Tableau I. Multiplication du caroubier : influence des substances de croissance. Les résultats expriment les taux de multiplication après 4 à 5 semaines de culture.

MB + BAP + GA3 + IBA (mg/l)	Subcult. 1	Subcult. 2	Subcult. 3	Subcult. 4
0,50 + 0,10 + 0,00	1,0	2,0	3,8	3,2
0,50 + 0,25 + 0,00	1,3	1,7	2,7	3,7
0,50 + 0,10 + 0,10	1,1	1,4	2,8	4,5
0,50 + 0,25 + 0,10	1,4	1,4	3,6	3,5
1,00 + 0,10 + 0,00	1,8	4,4	5,1	3,8
1,00 + 0,25 + 0,00	1,0	2,7	3,5	2,1
1,00 + 0,10 + 0,10	1,3	6,7	6,0	3,0
1,00 + 0,25 + 0,10	1,2	4,9	5,0	3,0
1,50 + 0,10 + 0,00	1,5	6,2	3,9	4,0
1,50 + 0,25 + 0,00	1,6	6,2	4,6	3,4
1,50 + 0,10 + 0,10	1,2	5,1	3,3	3,7
1,50 + 0,25 + 0,10	1,4	4,7	2,7	3,8

Tableau II. Comparaison de 2 milieux de multiplication en fonction des récipients de culture après 8 subcultures consécutives. Les résultats expriment les taux de multiplication après 4 à 5 semaines de culture.

Subculture	M 1 (tube)	M 1 (bocal)	M 3 (tube)	M 3 (bocal)
1	3,9	3,6	3,2	2,1
2	2,9	2,9	2,9	2,7
3	3,6	2,5	3,3	2,7
4	2,9	5,4	3,7	4,2
5	2,2	3,2	2,5	3,7
6	3,8	3,7	3,6	3,3
7	2,7	2,9	2,9	2,9
8	3,7	2,6	2,5	3,1

M 1 = MB + 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA3
M 3 = MB + 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA3 + 0,1 mg/l IBA.

ces explants miniaturisés a été repiquée sur un milieu d'élongation, avant son enracinement.

Le milieu d'enracinement de base contient les sels minéraux de Quoirin et Lepoivre [5], le $FeNa_2EDTA$, les vitamines de Walkey [8], le saccharose 20 g/l, l'agar 5 g/l, et le pH est ajusté à 5,7.

L'enracinement du caroubier a tout d'abord été réalisé à la lumière. Les pousses ont été transférées sur le milieu d'enracinement en présence de 2 mg/l IBA, et pendant 5 semaines de culture. Pour cette première tentative d'enracinement, nous avons séparé

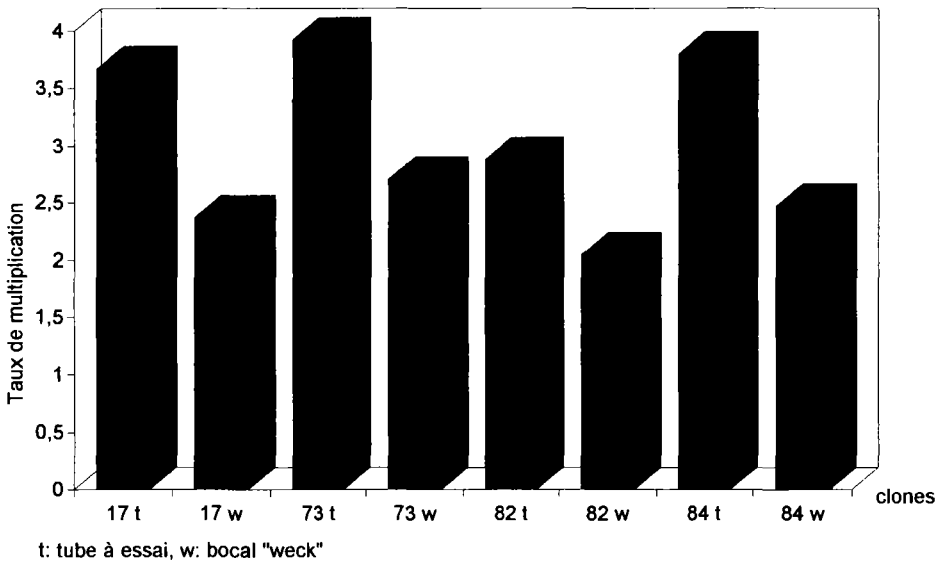


Figure 1. Influence des différents clones de caroubier sur le milieu de multiplication. (MB + 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA3 + 0,1 mg/l IBA).

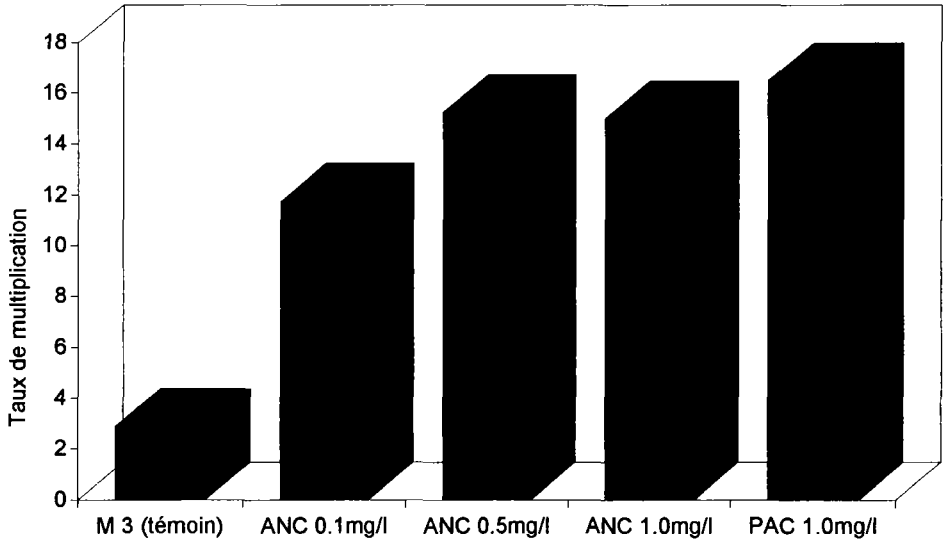


Figure 2. Effet de l'ancymidol ou du paclobutrazol en présence de 0,5 mg/l BAP pendant la phase de multiplication du caroubier.

les explants selon leur milieu de multiplication, le pourcentage d'enracinement est de 62 % à 72 % (Tableau III).

Pour améliorer le pourcentage d'enracinement et la qualité des racines, le milieu d'enracinement a été modifié :

– les macroéléments de Quoirin et Lepoivre [5] sont dilués de moitié et dépourvus de NH_4NO_3,

– et l'enracinement peut se dérouler en deux phases :

– induction en présence IBA (1 ou 2 mg/l) et à l'obscurité (7 ou 14 jours),

– développement des racines sur un milieu sans auxine et à la lumière.

Le milieu de développement racinaire est constitué soit de :

– milieu gélosé par de l'agar,

– milieu gélosé (agar) ajouté à la vermiculite,

– milieu liquide dans lequel est ajoutée la vermiculite.

Les meilleurs résultats d'enracinement ont été obtenus sur le milieu de développement contenant la vermiculite avec milieu gélosé : 95 % de pousses enracinées après 5 semaines de culture (Tableau IV).

Les microplantes sont transférées *ex vitro* pour l'acclimatation, sur un substrat composé de terreau et de vermiculite, et maintenues à l'étouffée dans une atmosphère saturée en eau. Elles sont progressivement acclimatées à l'atmosphère ambiante. Nous avons obtenu 85 % de plantes acclimatées après 6 semaines.

Tableau III. Influence du milieu de multiplication sur l'enracinement du caroubier. Indication en présence de 2 mg/l IBA et à la lumière. Les résultats sont relevés après 5 semaines de culture.

MB + BAP + GA3 + IBA (mg/l)	Nombre d'explants testés	Nombre de pousses enracinées	Enracinement %
0,50 + 0,10 + 0,00	50	31	62
0,50 + 0,25 + 0,00	25	16	64
0,50 + 0,10 + 0,10	57	41	72

Tableau IV. Enracinement du caroubier. Influence de l'induction et du milieu de développement. Les résultats sont relevés après 5 semaines de culture.

Obscurité	7 jours	7 jours	14 jours	14 jours
IBA (mg/l)	1	2	1	2
M. gélosé	40 %	15 %	40 %	0 %
M. liquide + V	80 %	80 %	80 %	86,7 %
M. gélosé + V	85 %	85 %	90 %	95 %

M· milieu.
V: vermiculite.

Conclusion

La mise en culture et la multiplication du caroubier n'a pas posé trop de problèmes. Les taux de multiplication se situent entre 2 et 5 après 4 semaines de culture. Les concentrations en BAP supérieures à 1 mg/l n'augmentent pas le nombre de pousses axillaires, mais à l'inverse, elles entraînent la formation de cal et l'apparition de la vitrification.

L'utilisation de l'ancymidol ou du paclobutrazol a donné les meilleurs taux de multiplication. C'est une voie très intéressante pour obtenir rapidemment un nombre très élevé d'arbres sélectionnés. Ces deux substances ont été utilisées avec succès par Ziv [9] sur *Gladiolus* et *Nerine*. Dans notre laboratoire, les agglomérats méristématiques sont induits chez l'*Eucalyptus* par Ossor et Boxus [4] même en absence de cytokinines et d'antigibbérillines. De telles structures méristématiques ont aussi été obtenues sur *Pinus radiata* par Aitken-Christie *et al.* [1] sans antigibbérelline mais en présence de BAP.

Quant à l'enracinement du caroubier, il se situe entre 62 % et 95 % selon les conditions de milieu et de culture. Sebastian et McComb [6] ont montré l'importance du milieu de multiplication sur l'enracinement. Ils ont obtenu 92 % de pousses enracinées si le milieu de prolifération ne contenait que la zéatine ; à l'inverse, en présence de 1 mg/l GA_3 dans le milieu de multiplication, le taux d'enracinement chutait à 33 %. Sur le milieu d'enracinement aéré, gélose et vermiculite, proposé par Jay-Allemand *et al.* [2], nous obtenons jusqu'à 95 % d'enracinement.

A l'avenir, nous chercherons à optimaliser les techniques de propagation par bourgeonnement axillaire ou agglomérats méristématiques, et à bien maîtriser l'acclimatation de matériel issu d'arbres sélectionnés adultes.

Références

1. Aitken-Christie J, Singh AP, Davies H (1988). Multiplication of meristematic tissue : a new tissue culture system for radiata pine. In : Hanover JW, Keathley DE, eds. *Genetic manipulation of woody plants.* Basic Life Science 44, Plenum, New York : 413-432.
2. Jay-Allemand C, Capelli P, Cornu D (1992). Root development of *in vitro* hybrid walnut microcuttings in a vermiculite-containing gelrite medium. *Scientia Horticulturae* 51 : 335-342.
3. Martins-Louçao MA, Rodriguez-Barrueco C (1981). Establishment of proliferation callus from roots, cotyledons and hypocotyls of carob *(Ceratonia siliqua* L.) seedlings. *Z Pflanzenphysiol* 103 : 297-303.
4. Ossor A, Boxus P (1992). Des agglomérats de dômes méristématiques, une nouvelle alternative dans la multiplication clonale d'*Eucalyptus camaldulensis.* In : *Production de variétés génétiquement améliorées d'espèces forestières à croissance rapide,* AFOCEL-IUFRO, Bordeaux, 14-18 septembre : 203-211.
5. Quoirin M, Lepoivre P (1977). Étude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus. Acta Horticulturae* 78 : 437-442.
6. Sebastian KT, McComb JA (1986). A micropropagation system for carob. *Scientia Horticulturae,* 28 : 127-131.
7. Vinterhalter D, Grubisic D, Bojovic-Cvetic D, Budimir S (1992). Lenticel hypertrophy in shoot cultures of *Ceratonia siliqua* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 31 : 111-114.
8. Walkey DG (1972). Production of apple plantlets from axillary bud meristems. *Can J Plant Sci* 52 : 1085-1087.
9. Ziv M (1990). Morphogenesis of *Gladiolus* buds in bioreactors – Implication for scaled-up propagation of geophytes. In : VII International Congress on Plant Tissue and Cell culture, Amsterdam, June 24-29 : 119-124.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1995, pp. 233-239.

25

Étude de l'expression transitoire des gènes marqueurs CAT et GUS dans les protoplastes de tournesol

HÉLÈNE LAPARRA, GÜNTHER HAHNE

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Louis Pasteur, 12, rue du Général-Zimmer, 67084 Strasbourg, France.

Le tournesol, *Helianthus annuus* L., appartient à la famille des Composées. Peu de travaux ont porté sur le transfert direct de gènes dans les protoplastes de cette espèce. Jusqu'à présent, seuls Moyne *et al.* [8] et Kirches *et al.* [4] ont étudié le transfert direct de gènes dans les protoplastes de tournesol, les premiers en obtenant une transformation stable, les seconds en étudiant l'expression transitoire.

L'expression transitoire de gènes est mise en évidence par la mesure de l'activité de la protéine codée par un ADN étranger, suite à son transfert dans les cellules cibles (cet ADN reste extra-chromosomique et son expression est de nature transitoire). Cette technique peut être utile pour un certain nombre d'études. C'est une méthode rapide : les résultats peuvent être obtenus seulement quelques heures après la transfection des protoplastes. Elle permet d'optimiser les conditions de transfert de gènes, d'étudier le contrôle de la régulation génique par des paramètres physiques, d'identifier les séquences régulatrices des gènes.

Nous avons appliqué cette méthode aux protoplastes d'hypocotyle de tournesol. Dans nos conditions, ils sont aisés à isoler, avec des rendements élevés (5-6.10^6 protoplastes/g d'hypocotyle frais). Leur taux de viabilité est important. Ce système permet donc au sein d'une même expérience de travailler sur un grand nombre d'individus.

Afin de mettre au point un système d'expression transitoire dans les protoplastes d'hypocotyle de tournesol, nous avons testé en parallèle trois méthodes de transfert direct de gènes, en vue de choisir et d'optimiser celle qui donnait les meilleurs résul-

tats. Les méthodes utilisées sont : l'électroporation, l'utilisation du polyéthylène glycol (PEG) ou du dioctadécylglycylspermine (DOGS).

Les deux premières méthodes, couramment utilisées sur les protoplastes, sont efficaces sur de nombreuses espèces végétales aussi bien en expression transitoire qu'en transformation stable. En revanche, la troisième méthode n'a jamais été testée sur des protoplastes d'origine végétale. Elle repose sur l'utilisation d'une polyamine et a été initialement mise au point sur des systèmes animaux.

L'intensité de l'expression transitoire est analysée à l'aide de deux gènes rapporteurs codant pour la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) et pour la β-D-glucuronidase (GUS). Pour chaque technique, 4 essais indépendants sont réalisés.

Matériels et méthodes

Isolement et culture des protoplastes

Les protoplastes sont isolés à partir d'hypocotyles, provenant de plantules cultivées en conditions axéniques pendant 7 jours [2].

Les protoplastes transformés et les témoins non-transformés sont cultivés en milieu liquide [5] à une densité finale de 5. 10^4 / ml.

Vecteur de transformation

Le plasmide pCG35S de 8,3 kb [6] contient les gènes *kan*, *uidA* et *cat* sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV. Ces gènes codent respectivement pour les protéines NPTII (néomycine phosphotransférase II), GUS (β-D-glucuronidase) et CAT (chloramphénicol acétyltransférase).

Techniques de transformation

• ***Électroporation***

Les protoplastes sont incubés pendant 30 minutes à 4° C dans une solution composée de mannitol (0,6 M) et de $CaCl_2$ (0,1 mM). L'électroporation est ensuite effectuée avec 10^6 protoplastes/ml, 40 µg d'ADN plasmidique et 80 µg d'ADN entraîneur à l'aide d'un électroporateur Gene Pulser de Biorad. La distance entre les électrodes des cuvettes d'électroporation est de 4 mm. Différentes conditions de voltage (de 0 à 1400 volts (V)/cm) sont testées. Les impulsions sont données par une décharge de la capacité à 125 µF.

• ***Polyéthylène glycol (PEG)***

Le protocole suivi est celui de Lepetit *et al.* [6], à l'exception de la première étape, dans laquelle les protoplastes sont placés pendant 30 minutes à 4° C dans une solution de KCl (100 mM), $CaCl_2$ (125 mM), MES (0,7 g/l) à pH 5,7.

• ***Dioctadécylglycylspermine (DOGS)***

C'est une polyamine de synthèse constituée de deux molécules d'acide stéarique liées à une molécule de spermine *via* une molécule de glycine [1]. Elle nous a été aimablement fournie par Dr Behr (Laboratoire de Chimie Génétique, CNRS URA 1386, Facul-

té de Pharmacie de Strasbourg). En solution aqueuse, le DOGS forme spontanément des liposomes cationiques. Après le mélange avec une solution diluée d'ADN plasmidique, le DOGS se complexe avec l'ADN. Dans le cas de la transformation des cellules animales, on pense que les complexes ADN-DOGS pénètrent dans la cellule par endocytose [7].

Le protocole de transformation est extrêmement simple (mélange des solutions de complexes ADN-DOGS et de protoplastes suivi d'une incubation). Nous en avons étudié les paramètres clefs.

Dosage des activités GUS et CAT

L'activité GUS est dosée par fluorimétrie selon le protocole décrit par Jefferson [3]. Les résultats sont exprimés en pmoles de Méthyl Umbelliférone (MU)/min/µg de protéines extraites des protoplastes.

L'activité CAT est mesurée selon le protocole de Lepetit *et al.* [6]. Les résultats sont exprimés en cpm/heure (h)/µg de protéines extraites des protoplastes.

Résultats

Électroporation

L'activité de la GUS a été détectée à partir d'un voltage de 375 V/cm (seuil de perméabilisation de la membrane des protoplastes). Elle était maximale à 700 V/cm et diminuait aux voltages supérieurs à cause de la mort des protoplastes (Figure 1).

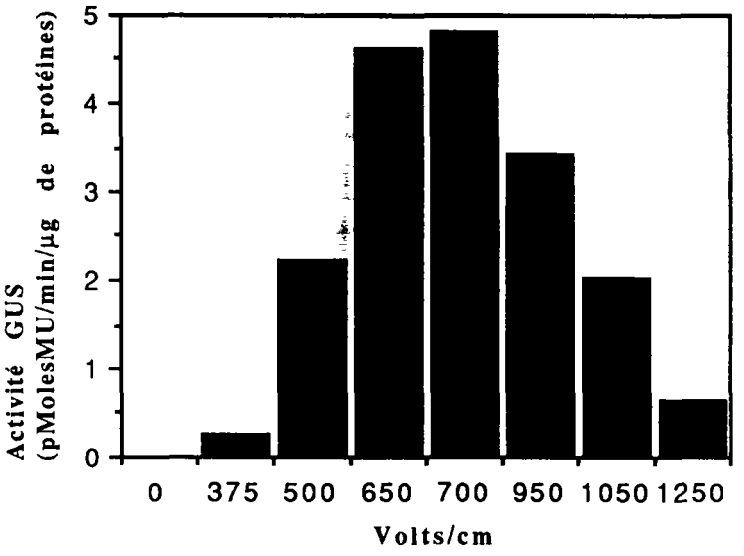


Figure 1. Résultats de l'électroporation exprimés par l'activité de la GUS (10^6 protoplastes, 40 µg d'ADN plasmidique, 80 µg d'ADN entraîneur).

PEG (polyéthylène glycol)

Nous avons étudié différents paramètres influant sur l'expression transitoire : la masse moléculaire du PEG, la présence d'ADN entraîneur, la concentration d'ADN plasmidique.

Quelle qu'ait été la masse moléculaire du PEG, le pourcentage de protoplastes viables était de l'ordre de 40 %. Le PEG 6 000 est le plus efficace (Figure 2) et a donc été utilisé pour les expériences suivantes.

Les activités CAT et GUS étaient deux fois plus élevées en présence d'ADN entraîneur qu'en son absence (Tableau I). Les expériences suivantes contiennent donc de l'ADN entraîneur.

Tableau I. Mesure des activités CAT et GUS, 24 heures après l'application de différentes techniques de transfert direct de gènes.

Technique de transfection	Quantité d'ADN plasmidique (µg)	ADN entraîneur	CAT (cpm/h/µg de prot.)	GUS (pMolesMU/min/µg de prot.)
PEG 6 000	20	+	310	18
	20	–	165	10
PEG 6 000	40	+	850	45
Électroporation	40	+	92	5

Les activités CAT et GUS étaient proportionnelles à la quantité d'ADN plasmidique (Figure 3).

En utilisant les conditions définies précédemment (PEG 6 000, présence d'ADN entraîneur), nous avons suivi la cinétique de l'activité CAT (Figure 4). Elle n'a été détectée qu'après 6 heures de culture. Elle augmentait très vite jusqu'à 30 heures. A la suite de ce pic d'activité, elle diminuait progressivement et restait toujours exprimée après 4 jours de culture.

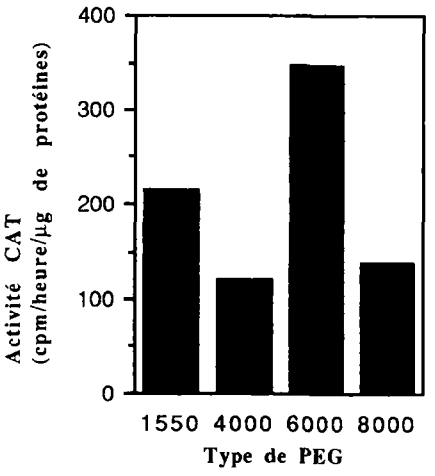


Figure 2. Influence de la masse moléculaire du PEG sur l'activité CAT (10^6 protoplastes, 20 µg d'ADN plasmidique, 40 µg d'ADN entraîneur).

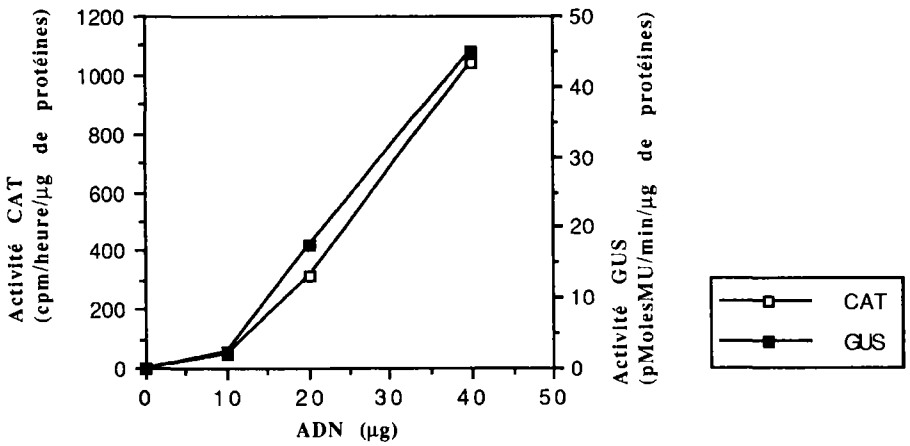


Figure 3. Influence de la quantité d'ADN plasmidique sur les activités CAT et GUS (PEG 6000, 10^6 protoplastes, pour chaque point la quantité d'ADN entraîneur est double de celle de l'ADN plasmidique).

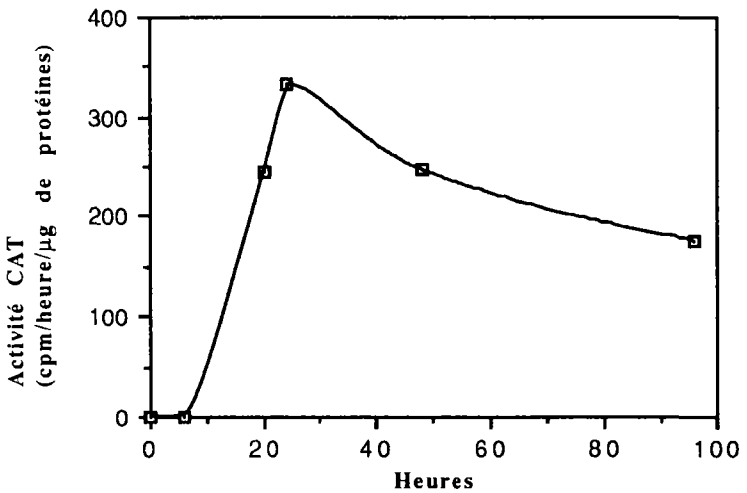


Figure 4. Cinétique de l'activité CAT (PEG 6 000, 10^6 protoplastes, 20 µg d'ADN plasmidique, 40 µg d'ADN entraîneur).

DOGS (dioctadécylglycylspermine)

Différents protocoles ont été mis en œuvre pour la transformation des protoplastes par le DOGS. Les facteurs importants (Behr, communication personnelle) sont le rapport entre la concentration en ADN et en DOGS, la concentration en calcium lors de la formation des complexes ADN-DOGS, le temps d'incubation des cellules avec ces complexes avec ou sans agitation.

Par ailleurs, nous avons remarqué l'effet très agglutinogène du DOGS sur les protoplastes de tournesol. Cet effet est accru lorsque les protoplastes sont agités après transformation avec les complexes ADN-DOGS. Cela pourrait expliquer la mort cellulaire observée et les résultats négatifs de l'expression transitoire obtenus.

Conclusion

Après optimisation et évaluation de plusieurs approches, la méthode retenue pour le transfert direct de gènes est la transformation par le polyéthylène glycol. Cette technique de transformation a conduit à un niveau d'expression transitoire élevé pour les gènes marqueurs utilisés. Le niveau est comparable à celui obtenu avec le même plasmide sur les protoplastes de tabac [6]. De plus, c'est une technique reproductible, rapide, facile à mettre en œuvre et peu onéreuse.

Comme la plupart des méthodes de transfert direct de gènes, les conditions optimales de transformation par le PEG s'accompagnent de la mort d'une partie de la population cellulaire (60 % dans notre cas). Une mort plus importante (80 %) est observée par Kirches *et al.* [4] sur les protoplastes de mésophylle de tournesol. Par ailleurs, ces auteurs ont également comparé la transformation par le PEG et l'électroporation sur des protoplastes de mésophylle de tournesol. L'expression transitoire obtenue après électroporation dans leur cas est plus faible que celle obtenue après traitement au PEG. Cela correspond bien à nos observations.

Le DOGS est une molécule qui a été testée avec succès sur les systèmes animaux et dont les avantages sont réels (simplicité et efficacité du protocole et non-toxicité du DOGS). Il permet également d'encapsuler l'ADN et donc de le protéger vis-à-vis des endonucléases cellulaires. Néanmoins, nous n'avons pas réussi à détecter une expression transitoire dans les protoplastes de tournesol. Dans nos conditions, le DOGS est une molécule très agglutinogène et nous n'avons pu contourner cet effet.

En vue de réaliser des transformations stables, il est intéressant de disposer d'un système permettant l'expression maximale, la détection précoce d'un événement génétique et la mise en place d'une sélection efficace des cellules transformées.

Nous disposons maintenant d'un outil pour l'étude des constructions géniques dans le tournesol. Par exemple, l'étude comparative de promoteurs forts (promoteur 35S du CaMV et promoteur du gène d'actine) et l'analyse du rôle des séquences *enhancers* peuvent être envisagées en expression transitoire.

Références

1. Behr J-P, Demeneix B, Loeffler J-P, Perez-Mutul J (1989). Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipoplyamine-coated DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 6982-6986.
2. Fischer C, Klethi P, Hahne G (1992). Protoplasts from cotyledon and hypocotyl of sunflower *(Helianthus annuus* L.) : shoot regeneration and seed production. *Plant Cell Rep* 11 : 632-636.
3. Jefferson RA (1987). Assaying chimeric genes in plants : the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rept* 5 : 387-405.
4. Kirches E, Frey N, Schnabl H (1991). Transient gene expression in sunflower mesophyll protoplasts. *Act Bot* 104 : 212-216.
5. Lenée P, Chupeau Y (1986). Isolation and culture of sunflower protoplasts *(H. annuus* L.) : factors influencing the viability of the cell colonies derived from protoplasts. *Plant Sci* 43 : 69-75.
6. Lepetit M, Ehling M, Gigot C, Hahne G (1991). An internal standard improves the reliability of transient expression studies in plant protoplasts. *Plant Cell Rep* 10 : 401-405.
7. Loeffler J-P, Behr J-P(1993). Gene transfer into primary and established mammalian cell lines with lipopolyamine-coated DNA. *Methods Enzymol* 217 : 599-618.
8. Moyne A-L, Tagu D, Bergounioux C, Freyssinet G, Gadal R (1988). Transformed calli obtained by direct gene transfer into sunflower protoplasts. *Plant Cell Rep* 8 : 97-100.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 241-249.

26

Polymorphisme de l'ADN total chez des plantes régénérées à partir de protoplastes de pomme de terre

OUMEMA ELLOUZ [1], LILIA LAKHOUA [1], ALI GARGOURI [2]

1. École Nationale d'Ingénieurs de Sfax, BP W, 3038 Sfax, Tunisie.
2. Centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie.

La pomme de terre est une plante d'une grande importance économique pour la Tunisie. Malheureusement les problèmes de contamination, par des viroses (le PVY étant le plus redoutable) principalement, sont à l'origine d'une baisse conséquente de la production dans certaines régions de Tunisie.

Pour résoudre ce problème, et connaissant les limites de la sélection traditionnelle, on peut s'adresser aux techniques de culture *in vitro* et de génie génétique. Outre les méthodes d'éradication de virus (par thermothérapie, chimiothérapie et culture d'apex), ces nouvelles techniques et en particulier celles utilisant les protoplastes offrent des perspectives prometteuses :

– la possibilité d'induire une variation somaclonale importante [3] par régénération *in vitro* à partir d'explants y compris de protoplastes. Cette variation peut toucher des caractères quantitatifs obéissant à des facteurs polygéniques ;

– la production d'hybrides somatiques par fusion intraspécifique entre des clones dihaploïdes de pomme de terre [2] ou interspécifique avec des espèces sauvages diploïdes compatibles, susceptibles d'apporter des caractères intéressants, notamment de résistance [10] ;

– l'introduction de caractères mono ou oligogéniques (en particulier la résistance à une maladie, à un prédateur) par transfert d'ADN dans des protoplastes ou dans des explants à l'aide d'agrobactéries.

Notre objectif est actuellement de maîtriser les différentes étapes d'une stratégie

visant à cumuler, dans un même individu, les caractéristiques intéressantes des deux parents, l'un d'eux possédant des caractères de résistance à des virus. Il s'agit là d'un transfert de certaines techniques de pointe qui ont déjà été mises au point chez cette plante. Nous décrirons, dans cette article, la production de plantes régénérées à partir de protoplastes, mais aussi à partir de feuilles de vitroplants ainsi que les variations observées au niveau de l'ADN total chez ces plantes régénérées.

Matériel végétal et méthodes

Nous nous sommes servis de vitroplants appartenant à deux variétés (4x) de consommation, demi-précoces, largement utilisées en Tunisie (Spunta et Claustar) et au génotype Aminca H6 (2x), aimablement fourni par l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) de Landerneau (France) hypersensible au virus x et résistant au nématode doré (*Globodera rostochiensis* pathotype RO1). Ces génotypes ont été multipliés *in vitro* sur milieu de Murashige et Skoog (MS) [8] additionné des vitamines de Morel [7], de 20g/l de saccharose et de 7,5g/l d'agar. Le bouturage des apex de vitroplants a lieu dans des tubes non scellés, placés à 22 °C ± 1, sous une photopériode de 13 h de lumière par jour, et une intensité lumineuse de 80 $\mu E\ m^{-2}\ sec^{-1}$. Après 3 semaines de culture, les apex des jeunes plantes obtenues sont à nouveau excisés et repiqués sur le même milieu durant une période de trois semaines et ainsi de suite...

Les méthodes employées sont les suivantes :
- l'isolement de protoplastes et leur purification,
- la production de plantes régénérées à partir de divers explants,
- l'analyse moléculaire de ces plantes.

L'isolement et la purification des protoplastes

Les protoplastes sont préparés chez les divers génotypes mentionnés à partir de vitroplants âgés de 3 semaines.

La face inférieure des feuilles est dilacérée à l'aide d'un scalpel. La macération des feuilles (30 mg de matière fraîche/ml de solution enzymatique) a lieu en boîtes de Pétri, à l'obscurité pendant une nuit et à 27° C. La solution enzymatique est composée de la solution minérale CPW [4] additionnée de 0,5 M de mannitol, 1 % (m/v) de cellulase R10, 0,2 % (m/v) de macérozyme (Yakult – Tokyo – Japon) et de 0,05 % (m/v) d'acide 2-N morpholino éthanesulfonique (MES). Le pH = 5,5.

Les protoplastes ont été purifiés en adoptant la méthode décrite par Chaput *et al.* [2].

La production de plantes régénérées à partir de divers explants

La régénération de plantes a été effectuée de trois façons différentes :

a) A partir de disques foliaires de vitroplants provenant des deux variétés Spunta et Claustar en utilisant le milieu C3 et les conditions de cultures décrites par Quraishi *et al.* [9].

b) A partir de protoplastes isolés appartenant à ces deux mêmes variétés.

Les protoplastes de Spunta et de Claustar ont été mis en culture à l'obscurité à 27° C, à raison de 10^4 à 10^5 protoplastes/ml sur le milieu de culture VKM [1] addition-

né de 250 mg/l de polyéthylène glycol 6 000 (PEG), 0,2 mg/l d'acide 2-4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), 0,5 mg/l de zéatine, 1mg/l d'acide naphthalèneacétique (ANA), 3,3 % (m/v) de glucose, 3,2 % (m/v) de mannitol et de 0,05 % (m/v) de MES.

Vingt-quatre heures après l'isolement, les protoplastes commencent à former leur paroi et, au bout de 3 à 4 jours, la première division est observable. Après 7 jours, les cultures sont passées progressivement à la lumière.

Au bout de 15 jours, on voit se former des microcals d'environ 0,5 mm de diamètre. Ces microcals sont transférés sur un milieu de croissance identique au précédent, sauf pour la composition en régulateurs de croissance (2,4-D 0,1 mg/l et benzylaminopurine (BAP) 2 mg/l). Quinze à vingt jours après, on a des cals de 1 à 3 mm de diamètre. Le transfert de ces cals sur un milieu de base MS [8] additionné de vitamines [5], de saccharose 20g/l, de 0,5 mg/l d'ANA et de zéatine permet leur croissance (Figure 1).

L'initiation des bourgeons est obtenue sur le même milieu, mais différent par la composition en régulateurs de croissance (l'acide indolacétique (AIA) 0,1mg/l et zéatine 2 mg/l). Les jeunes pousses obtenues (Figure 2) sont ensuite multipliées par microbouturage successifs *in vitro*.

c) A partir de protoplastes fusionnés entre Claustar (4x) et Aminca H6 (2x).

Après isolement, les protoplastes de deux génotypes Claustar (4x) et Aminca H6 (2x) en suspension sont mélangés à volume égal dans une solution contenant du PEG 6 000 (30 % à 40 % selon la technique de Kao et Michayluck [5] (Figure 3).

Après la fusion, on suit le même protocole que pour la régénération à partir de protoplastes isolés.

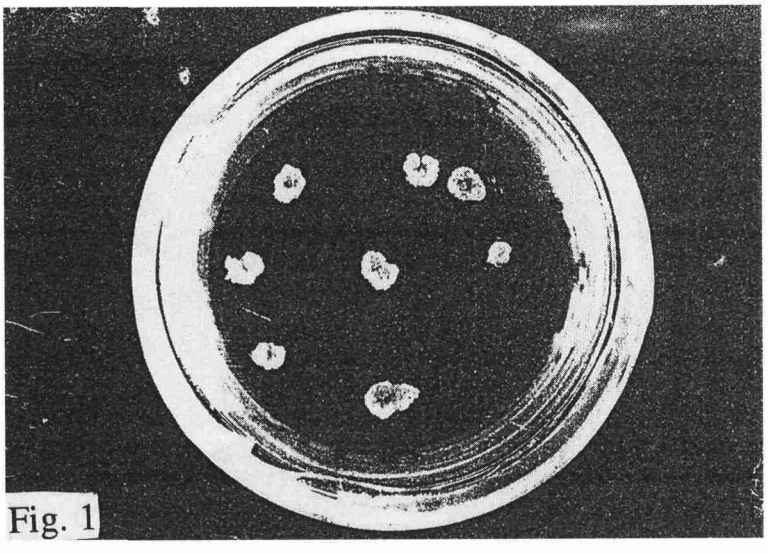


Figure 1. Cal issu de la prolifération de protoplastes sur le milieu de croissance.

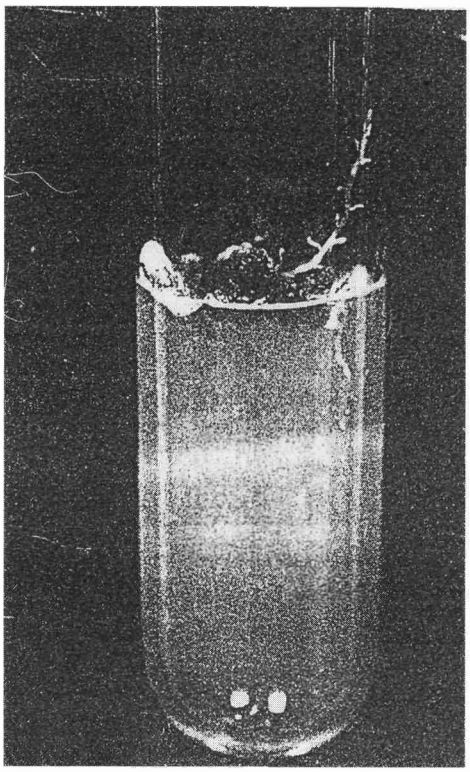


Figure 2. Initiation de bourgeons évoluant en tiges.

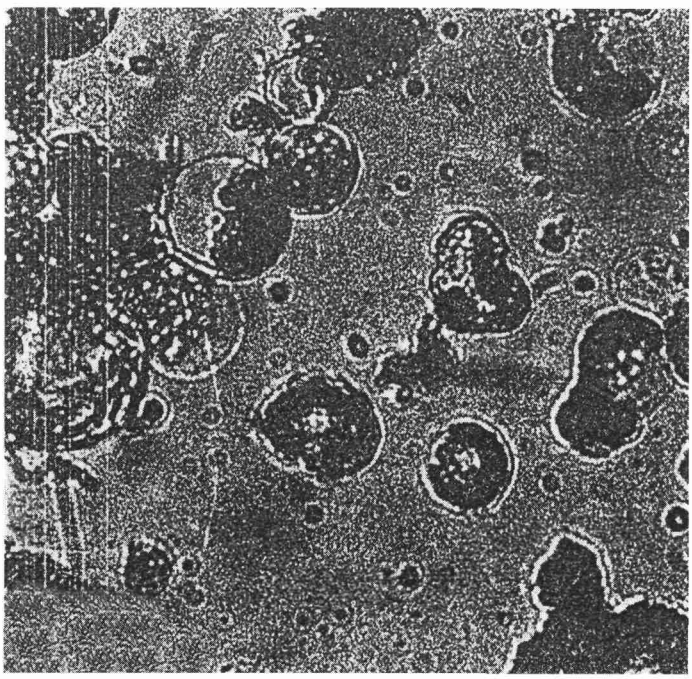


Figure 3. Fusion de protoplastes des 2 variétés Aminca (2x) et Claustar (4x).

L'analyse moléculaire des plantes

Elle a comporté plusieurs étapes :

• ***Extraction de l'ADN total***

– 2 grammes de tissu végétal sont mis à congeler à - 70° C pour au moins une heure,
– broyage dans un mortier prérefroidi,
– choc osmotique avec l'addition de 5 ml d'eau stérile,
– continuer le broyage,
– immédiatement après, addition de 5 ml phénol saturé au Tris-HCl pH 8,
– mélanger 5 minutes et centrifuger 10 minutes à 8 000 rpm (rotor Sorvall, 20° C) dans des tubes Corex,
– refaire un traitement au phénol,
– à la phase aqueuse ajouter 5 ml de chloroforme,
– mélanger 5 minutes et centrifuger 10 minutes à 8 000 rpm (rotor Sorvall) dans des tubes Corex,
– à la phase aqueuse, ajouter 1/10 volume AcNa 3 M et 1 volume Isopropanol (ou 2,5 volumes Éthanol),
– mélanger (sans vortexer) et laisser l'ADN précipiter au moins une heure à - 70° C (sinon la nuit),
– centrifuger 10 minutes à 8 000 rpm à froid,
– jeter le surnageant, sécher le culot et resuspendre du TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM),
– analyser la qualité et la quantité par migration d'une aliquote sur gel et par mesure de la DO à 260 nm et 280 (protéines contaminantes). Le rapport 260/280 doit se situer entre 1,7 et 2,
– (si besoin est, on peut éliminer encore l'ARN et les protéines contaminantes par un traitement à la RNase et à la Protéinase K, suivi par un traitement au phénol-chloroforme et précipitation à l'éthanol/AcNa).

• ***Digestion par une enzyme de restriction***

Environ 5 µg d'ADN sont digérés par l'enzyme BamHI ou HindIII dans le tampon approprié pendant une nuit dans une étuve à 37° C. La digestion est déposée sur un gel d'agarose 0,7 % à côté d'un marqueur de poids moléculaire. Après électrophorèse dans un tampon TAE (ou TBE), et coloration au BET, le gel, avec une règle à côté, est photographié sous UV. La digestion était totale car on n'observe pas d'ADN de haut poids moléculaire (de taille supérieure à l'ADN de λ natif) en haut des profils de digestion sur gel coloré au BET.

• ***Marquage de la sonde par*** **Random priming**

– la sonde employée provient de DNA ribosomal de levure *(Saccharomyces cerevisiae),*
– le kit utilisé provient de chez Boehringer,
– l'ADN est dénaturé par chauffage 5 à 10 minutes à 100° C, on lui ajoute :
  – 2 µl de mélange réactionnel (les hexa-nucléotides dans le tampon 10x),
  – 3 µl de (dATP, dGTP, dITP) à 0,5 mM,
  – 3 µl de dCTP radioactif (3 000Ci/mmole),
  – 1 µl de fragment de Klenow d'ADN polymérase (2 unités),
  – volume final : 20 µl ;

– incubation 1 à 3 heures à 37° C,

– arrêt par addition de 2 µl d'EDTA 0,5 M,

– séparation de l'ADN marqué des nucléotides libres par *spin-column* : dépôt sur colonne (seringue 1ml) de Sephadex G50 (déjà remplie et centrifugée 3 secondes à 2 000 rpm) et centrifugation 3 minutes à 2 000 rpm,

– collecte de l'ADN. Avant l'hybridation la sonde est dénaturée (chauffage 10 minutes à 100° C et dépôt immédiat dans la glace).

• ***Transfert sur filtre et hybridation à la sonde***

Le gel est traité comme suit :

– deux fois 15 minutes immergé dans HCl 0,25 N,

– deux fois 30 minutes immergé dans NaOH 0,5 M et NaCl 1,5 M,

– deux fois 30 minutes immergé dans Tris-HCl 1 M et NaCl 1,5 M.

L'ADN, ainsi dénaturé, est alors transféré sur filtre de Nylon (ou de Nitrocellulose) par capillarité ou par transfert sous vide, en présence de 10 x SSC.

L'ADN est fixé au filtre de Nylon par exposition aux UV pendant 3 minutes.

Le filtre est préhybridé, 3 heures sous agitation à 65° C, dans une solution de : 1 x Denhardt, 6 x SSC, 0,1 % SDS et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé.

Le filtre est immergé dans une solution de sonde dénaturée pendant une nuit dans les mêmes conditions.

Le filtre est lavé comme suit :

– deux fois 5 minutes à température ambiante dans 2 x SSC, 0,1 % SDS,

– trois fois 15 minutes à 65° C dans 2xSSC, 0,1 % SDS,

– une fois 15 minutes à 65° C dans 0,1xSSC, 0,1 % SDS.

Le filtre est alors séché, mis en autoradiographie pendant quelques jours, puis le film est développé.

Résultats

Sur l'isolement et la purification de protoplastes

Les travaux de Thomas [11] ayant montré que les protoplastes provenant du mésophylle de plantes cultivées *in vitro* permettraient d'obtenir les résultats les plus reproductibles, nous avons utilisé uniquement ce type de matériel pour isoler les protoplastes.

Cette technique d'isolement jointe à la méthode de purification des protoplastes mise au point par Chaput *et al.* [2] nous a permis d'obtenir 7.10^6 protoplastes par gramme de matière fraîche.

Sur la production de plantes régénérées

Nous n'avons pas encore réussi à initier des régénérations à partir des protoplastes fusionnés de Claustar et d'Aminca.

Des plantes régénérées ont été obtenues :

– à partir de petits cals friables verts apparus au niveau des blessures sur feuilles de vitroplants de Spunta et de Claustar,

– à partir de cals provenant de la culture de protoplastes provenant de ces deux mêmes variétés.

On peut noter que la morphologie des plantes issues de cals est particulière : les feuilles sont plus petites et les racines moins importantes que chez les vitroplants témoins ou les plantes régénérées à partir de feuilles de ces vitroplants.

Sur l'analyse moléculaire des plantes obtenues

Nous avons extrait l'ADN total de plantes cultivées *in vitro* de Spunta et Claustar et des régénérations obtenues chez ces 2 mêmes variétés, soit à partir de feuilles, soit à partir de cals provenant de la culture de protoplastes.

Les digestions par Bam HI où Hind III ont été complètes.

Après hybridation à la sonde, les résultats avec Bam HI ont été plutôt décevants : on n'a pas observé de bandes nettes.

Avec Hind III les bandes sont bien visibles et conduisent à des informations intéressantes. Le même profil est obtenu pour les plantes *in vitro* de Spunta (Figure 4, piste 1) et Claustar (Figure 4, piste 4) et pour les plantes régénérées à partir de feuilles de ces deux mêmes variétés (Figure 4, piste 2 et 3). En revanche, les deux régénérations obtenues à partir de cals de protoplastes chez Claustar (Figure 4, pistes 5 et 6) et étudiées quant à leur ADN présentent chacune un profil particulier avec apparition d'une nouvelle bande.

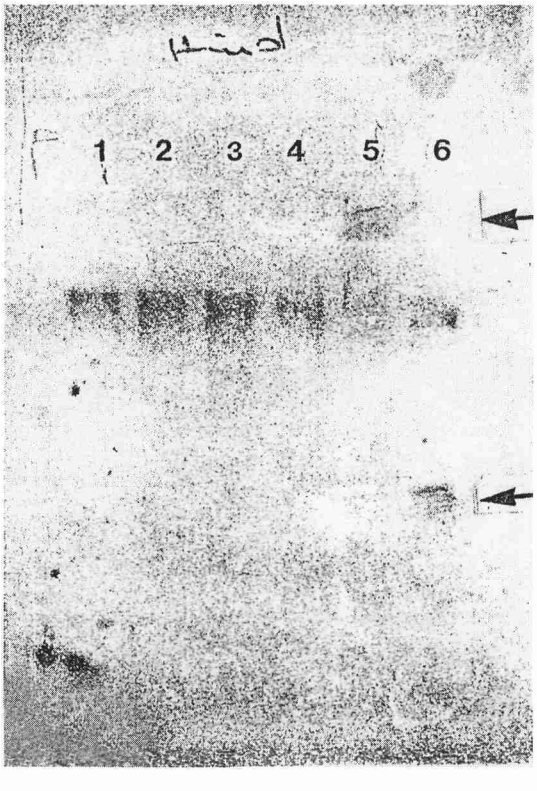


Figure 4. Caractérisation des clones par hybridation moléculaire.

Conclusions et perspectives

Nous avons mis en évidence, au cours de ce travail, chez l'ADN total de 2 plantes régénérées à partir de cals de protoplastes, une bande supplémentaire qui n'existait pas chez les plantes témoins *in vitro* et chez les plantes régénérées à partir de feuilles que nous avons observées. Ce résultat va de pair avec l'aspect morphologique particulier de ces plantes issues de protoplastes.

Une étude de l'ADN cytoplasmique à l'aide d'enzymes de restriction, menée par Kemble et Shepard [6] chez des protoclones de la variété Russet Burbank, a déjà montré des changements au niveau de l'ADN mitochondrial. A l'inverse, l'ADN chloroplastique restait très stable.

A la suite de ces diverses données, il serait intéressant :

– de poursuivre l'étude sur l'ADN total en la réalisant sur un nombre plus élevé de plantes néoformées, à partir à la fois de feuilles et de protoplastes. Cela, afin de pouvoir s'assurer de l'existence d'un polymorphisme de l'ADN pour les plantes de la deuxième provenance citée et, à l'inverse, d'une stabilité de l'ADN pour les plantes de la première origine ;

– d'examiner de façon précise les plantes régénérées présentant un polymorphisme de leur ADN total, pour voir si cette divergence peut être attribuée au DNA cytoplasmique (c'est-à-dire au DNA mitochondrial, puisque le DNA chloroplastique est généralement stable) ou au DNA nucléaire ;

– d'utiliser une sonde mitochondriale précisant le niveau de la variation observé ;

– d'essayer d'autres enzymes de restriction, d'autres sondes, voire même d'autres méthodes d'analyse telles que la RAPD afin de détecter d'autres variations éventuelles ;

– d'effectuer la même analyse par RFLP sur les plantes issues de la fusion de protoplastes, quand celles-ci auront été obtenues.

Références

1. Binding H, Nehls R, Shieder O, Sopory SK, Wenzel G (1978). Regeneration of mesophyll protoplasts isolated from dihaploid clones of *Solanum tuberosum*. *Physiol Plant* 43 : 52-54.
2. Chaput MH, 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.
3. Evans DA, Sharp WR (1988). Somaclonal variation and its application in plant breeding. *Newsletter* 54 : 2-10.
4. Frearson EM, Power JB, Cooking EC (1973). The isolation culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev Biol* 33 : 130-137.
5. Kao KN, Michayluck MR (1975). Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a low population density in liquid media. *Planta* 126 : 105-110.
6. Kemble RJ, Shepard JF (1984). Cytoplasmic DNA variation in a potato protoclonal population. *Theor Appl Genet* 69 : 211-216.
7. Morel G, Wetmore RH (1951). Fern callus tissue culture. *Am J Bot* 38 : 141-143.
8. Murashige T, Skook F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497.

9. Quraishi A, Rossignol-Bancilhon L, Nozeran R (1970). Effet de l'origine du fragment sur la callogenèse et l'organogenèse *in vitro* chez *Solanum tuberosum* L. var. « BF15 ». *Ann Amelior Plants* 29 (6) : 639-663.
10. Serraf I, Sihachakr D, Ducreux G, Brown SC, Allot M, Barghi N, Rossignol L (1991). Interspecific somatic hybridization in potato by protoplast electrofusion. *Plant Sci* 76 : 115-126.
11. Thomas E (1981). Plant regeneration from shoot culture-derived protoplasts of tetraploid potato *(Solanum tuberosum* cv. Maris Bard). *Plant Sci Lett* 23 : 81-88.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 251-261.

27

Embryogenèse somatique chez la patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) : caractérisation et régénération des plantes

D. SIHACHAKR [1], J.M. CAVALCANTE-ALVES [1], S. TIZROUTINE [1], M. ALLOT [1], I. MUSSIO [1], A. SERVAES [1], D. NZOGHÉ [2], G. DUCREUX [1]

1. Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bâtiment 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France.
2. Laboratoire de culture in vitro, *CIAM, BP 2183, Libreville, Gabon.*

La patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., Convolvulacées) est une plante d'intérêt économique considérable dans les zones tropicales et même dans certaines zones tempérées d'Europe du Sud et des États-Unis d'Amérique [22]. La production mondiale de tubercules est estimée à 133,3 millions de tonnes pour l'année 1989, avec un rendement moyen de 14,4 t/ha [5]. La Chine (114,0 Mt), l'Indonésie (2,1 Mt), l'Ouganda (1,8 Mt), l'Inde (1,4 Mt), le Japon (1,3 Mt), le Rwanda (0,8 Mt), le Brésil (0,75 Mt) et les États-Unis d'Amérique sont parmi les plus grands producteurs [5]. Le tubercule de patate douce est très riche en calories et vitamines, ainsi qu'en protéines dont la tenueur varie entre 2 % et 10 % selon les cultivars [11, 25].

La patate douce est originaire d'Amérique du Sud (Colombie, Équateur et Nord Pérou) où existe encore une grande diversité d'*Ipomoea batatas.* Elle a été introduite en Europe par Christophe Colomb au XV[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.

Bien que des progrès aient été obtenus par les méthodes de sélection classique pour l'introduction des caractères de résistance aux maladies, aux nématodes et aux insectes, ainsi que pour l'amélioration de la teneur en protéines et de la qualité du tubercule, le processus de sélection est un travail de longue haleine, et nécessite la manipulation d'un très grand nombre d'individus et des techniques améliorées de croisements. De

plus, l'incompatibilité sexuée et la stérilité de certains génotypes et des hybrides rendent encore plus difficiles les méthodes de sélection classique [22].

Afin de mener le programme de sélection de la patate douce avec efficacité, des nouvelles techniques, comprenant notamment la variation somaclonale, la fusion de protoplastes et la transformation, peuvent être utilisées en conjonction avec les méthodes classiques de sélection. Cependant, l'accès à ces nouvelles techniques nécessite la mise au point de protocoles reproductibles de régénération de plantes à partir de cultures de tissus de patate douce.

Cette plante est considérée comme une espèce récalcitrante en ce qui concerne la régénération. L'objet de cet article est de passer en revue divers systèmes de régénération chez la patate douce. Une attention particulière portera sur l'embryogenèse somatique qui constitue la voie la plus efficace concernant la régénération chez cette plante. En effet, l'embryogenèse somatique permet d'obtenir un taux élevé et inégalable de multiplication, et la capacité de régénération peut être effectivement maintenue pendant longtemps. En plus, le processus de l'embryogenèse aboutit à la production de structures bipolaires, c'est-à-dire comprenant un axe apical et racinaire.

Régénération de plantes à partir de cultures d'explants

Une méthode de propagation accélérée par bouturages successifs de nœuds de tiges a été mise au point afin de disposer d'un grand nombre d'individus sains qui constituent un matériel de départ physiologiquement homogène et juvénile pour des expérimentations *in vitro* [19].

Des investigations concernant la régénération à partir de culture d'organes ou de fragments d'organes de patate douce ont été entreprises par plusieurs auteurs [2, 9, 18, 19]. Ainsi des fragments de tiges repiqués sur du milieu MS additionné de 1 mg/l d'acide indole acétique (AIA) peuvent donner naissance à des régénérations de bourgeons [19]. 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 %) ont été obtenues avec la combinaison de 0,01 mg/l d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) avec 0,01 mg/l de kinétine [2]. Les bourgeons peuvent apparaître *(a)* le plus fréquemment au niveau de cals cicatriciels, *(b)* directement sur les explants à proximité des zones traumatisées, et enfin *(c)* à la base des racines néoformées [19].

La comparaison de capacité organogène de différents organes mis en culture a montré que les explants de tiges sont les plus aptes à régénérer par rapport aux explants foliaires [2, 19]. 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 de fragments de cals organogènes sur du milieu neuf aboutit à la régénération de nouveaux bourgeons. En revanche, le repiquage de cals primaires non organogènes de patate douce, même sur un milieu très favorable, conduit toujours à une callogenèse abondante sans aucune manifestation morphogénétique [2].

Régénération de plantes à partir de protoplastes

Des protoplastes peuvent être isolés à partir de fragments de tiges, de pétioles ou de cals de patate douce, alors que le mésophylle se montre très récalcitrant à la digestion enzymatique. Les premiers travaux sur l'isolement de protoplastes à partir de cals de tige de patate douce remontent à l'année 1979 [24]. Ensuite, Bidney et Shepard [1] ont obtenu des cals à partir de culture de protoplastes issus de germes de tubercules, en utilisant un système de culture comportant un réservoir de milieu. D'autres chercheurs ont abouti également à l'obtention de cals qui ne manifestent aucune organogenèse [13, 17], ou qui produisent seulement des racines [20]. Cependant, des néoformations sporadiques de bourgeons à partir de culture de protoplastes de patate douce ont été signalées pour le cultivar Chugoku N° 25 [16].

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 [21]. En effet, la comparaison de 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 [21]. Ainsi, des plantes ont été régénérées à partir de cals de protoplastes chez 2 cultivars de patate douce, cv. Duclos 11 et Ira. Les plantes régénérées présentent une grande variabilité affectant la morphologie générale de la plante, celle des feuilles, la ramification ainsi que le système racinaire (Figure 1). 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 [22]. Malgré la stabilité du contenu en ADN des clones analysés, leur évaluation en conditions de champs, réalisée au Gabon en collaboration avec Dr Nzoghé, a révélé une variabilité dans la croissance et notamment dans la tubérisation. En effet, certains clones sont très productifs, pouvant donner jusqu'à 2 fois plus de tubercules que le clone témoin, alors que d'autres ne tubérisent pas.

Embryogenèse somatique

Induction

L'embryogenèse somatique chez la patate douce est initiée à partir de cals de culture d'anthères [23], de feuilles, d'apex, de fragments de tiges ou de racines [14], et de bourgeons axillaires notamment [3, 4, 12].

Le milieu d'induction est composé du milieu de base MS [15] additionné de 30 g/l de saccharose, 10 µM d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et solidifié par 7 g/l d'agar. Après 6 à 8 semaines d'incubation à l'obscurité et à 27°C, un certain nombre de bourgeons axillaires, prélevés sur des plantes *in vitro* et mis en culture, produisent des cals mucilagineux blanchâtres à partir desquels émergent des cals compacts

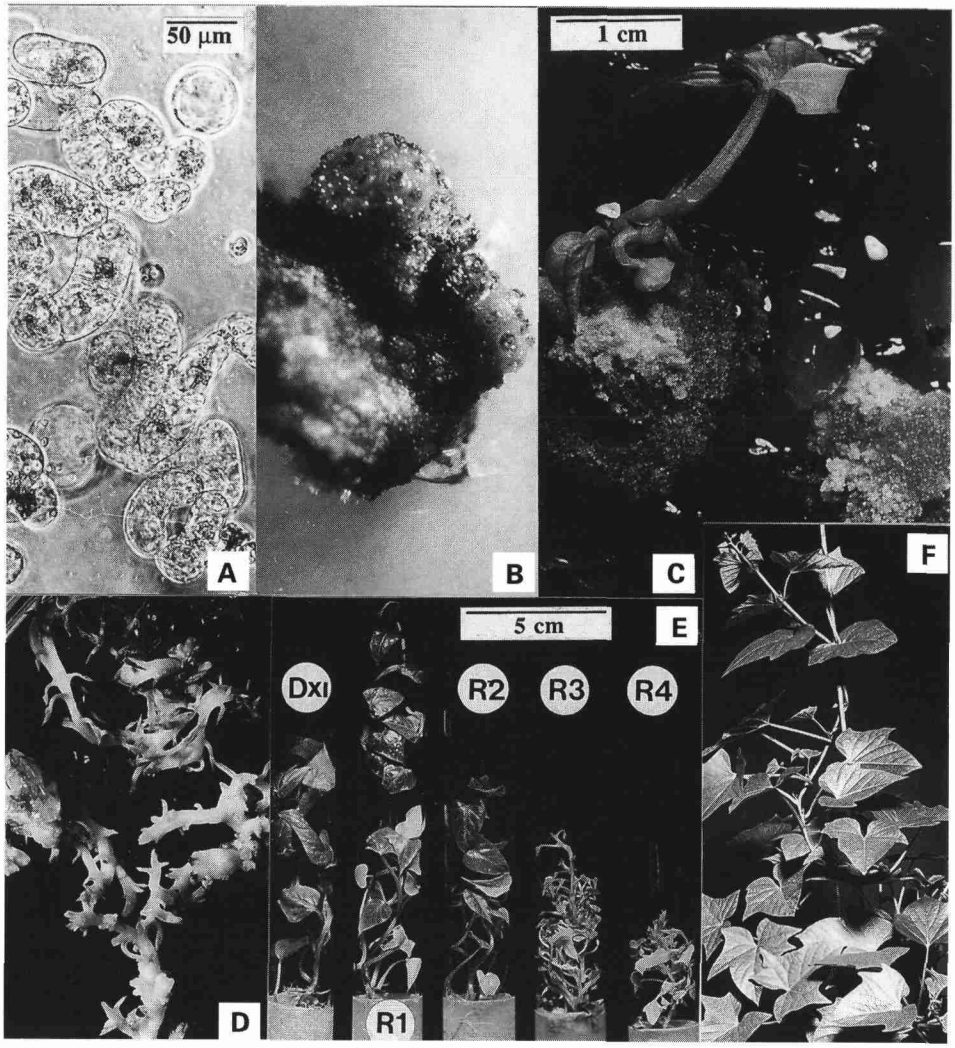


Figure 1. Régénération de protoplastes de patate douce. **A.** Cellules issues de divisions de protoplastes ; **B.** Cals organogènes issus de culture de protoplastes ; **C.** Régénération de plantes ; **D.** Régénération à partir de cals organogènes ; **E.** Plantes régénérées montrant une grande variabilité, DXI (clone témoin), R1 à R4 (clones régénérés) ; **F.** Une plante régénérée plantée en serre.

embryogènes (Figure 2 A). D'autres bourgeons mis en culture donnent naissance soit à des cals de plus petite taille (mais qui brunissent et meurent au bout de quelques semaines), soit à des cals friables non embryogènes et à croissance rapide. Ce dernier type de cals est d'un aspect translucide, d'une couleur variant du blanc au brun, et ne devient jamais embryogène. Les cals compacts embryogènes sont d'une couleur jaune clair et comportent quelquefois des zones plus ou moins anthocyanées chez certains cultivars (Figure 2 B) [3].

L'évaluation du potentiel embryogène chez 10 cultivars de patate douce montre un effet « génotype » très hautement significatif (Tableau I A). Parmi les génotypes testés, les cultivars 90, Zho et 865 donnent les meilleures réponses embryogènes avec respectivement 10 %, 15 % et 17 % de cals embryogènes (Tableau I A). Il est intéressant de noter que le cultivar Duclos 11 n'a donné aucune réponse embryogène quelle que soit la concentration en 2,4-D utilisée (2,5 à 15 µM), alors que ce génotype a produit quelques régénérations de bourgeons à partir de culture de protoplastes [21].

Tableau I. Réponses de l'embryogenèse somatique de 10 cultivars de patate douce. 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/génotype ; l'effet « génotype » est très hautement significatif pour P = 0,001.

Génotype	**D 11**	**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

Les cals embryogènes sont multipliés par repiquages successifs sur du milieu MS contenant 10 µM de 2,4-D et maintenus à l'obscurité. Cependant, après plusieurs repiquages, certains secteurs du cal deviennent friables et non embryogènes (Figure 2 C). 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 [3]. La comparaison des fréquences de réversion montre un effet « génotype » très hautement significatif avec une probabilité de P = 0,001 (Tableau I B). En effet, les cultivars Quangshu, Yulciboi et 953 sont parmi les génotypes qui ont le taux (0,5 % à 1 %) le plus faible de réversion, alors que le cultivar 90 présente le taux le plus élevé (12 %) (Tableau I B).

Les cals embryogènes et non embryogènes sont maintenus à l'obscurité sur du milieu MS contenant 10 µM de 2,4-D pour l'analyse ultérieure des isoenzymes.

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 par repiquage de cals embryogènes dans du milieu MS additionné de 10 µM de 2,4-D et de 1 µM de benzylaminopurine (BAP). La culture est d'abord maintenue à l'obscurité pendant une semaine puis exposée à la lumière. Les embryons globulaires apparaissent après 4 semaines de culture (Figure 2 D). Des exigences nutritionnelles similaires, comprenant notamment des concentrations élevées en auxines, sont requises pour l'induction et la formation d'embryons somatiques chez l'aubergine. Seule la phase de développement d'embryons matures en plantules ne nécessite pas la présence d'auxines [7]. Chez d'autres espèces, telles que la carotte [10] ou le maïs [8], la formation d'embryons somatiques comprend une courte phase d'induction sur un milieu riche en auxines, suivie d'un transfert sur un milieu qui en est dépourvu, ou en contient, mais à faibles concentrations.

Dans cette étude, moins de 5 % d'embryons globulaires de patate douce sont capables de se développer en plantules à la suite de leur transfert dans un milieu dépourvu d'hormones. Cette observation semble indiquer que la plupart des embryons globulaires n'ont pas suffisamment évolué vers des stades plus développés, y compris en particulier les stades cotylédonnaires qui sont plus aptes à germer sur le milieu sans régulateur de croissance. Ainsi, le repiquage des embryons globulaires sur du milieu MS additionné d'une combinaison de 0,01 µM de 2,4-D avec 0,01 µM de kinétine pendant 3 semaines, suivi d'un transfert dans un milieu sans hormones améliore efficacement leur développement en embryons cotylédonnaires (Figure 2 E). Mais la réponse dépend du génotype testé. En effet, pour le cultivar 953, la fréquence de développement d'embryons globulaires en embryons cotylédonnaires est de 95 % ; elle n'est que de 24 % pour le cultivar 90. Les embryons somatiques au stade cotylédonnaire verdissent à la lumière. Ils sont plus aptes à former des plantules à raison de 3-5 plantules par cal comportant des embryons mis en culture (Figure 2 F). Les cals embryogènes ainsi obtenus chez plusieurs cultivars de patate douce, et leur capacité à régénérer des plantes sont constamment maintenus depuis plus de 3 ans de culture.

Caractérisation par 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. C'est pourquoi, dans cette étude, nous avons utilisé 4 systèmes d'isoenzymes 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 peroxydases (Prx, E.C.1.11.1.7), les phosphatases acides (Acp, E.C.3.1.3.2) et les glutamates oxaloacétates transaminases (Got, E.C.2.6.1.1).

Quatre types de matériel végétal (la feuille, les cals embryogènes et non embryogènes, et les embryons somatiques au stade globulaire) issus de 3 génotypes (les cultivars 90, 953 et Quangshu) ont été caractérisés à l'aide des isoenzymes.

Chacun des 4 systèmes d'isoenzymes analysés permet de distinguer les 3 génotypes étudiés. De plus, ils montrent des différences dans leurs activités entre les différents types d'organisation, et en particulier entre les cals embryogènes et non embryogènes.

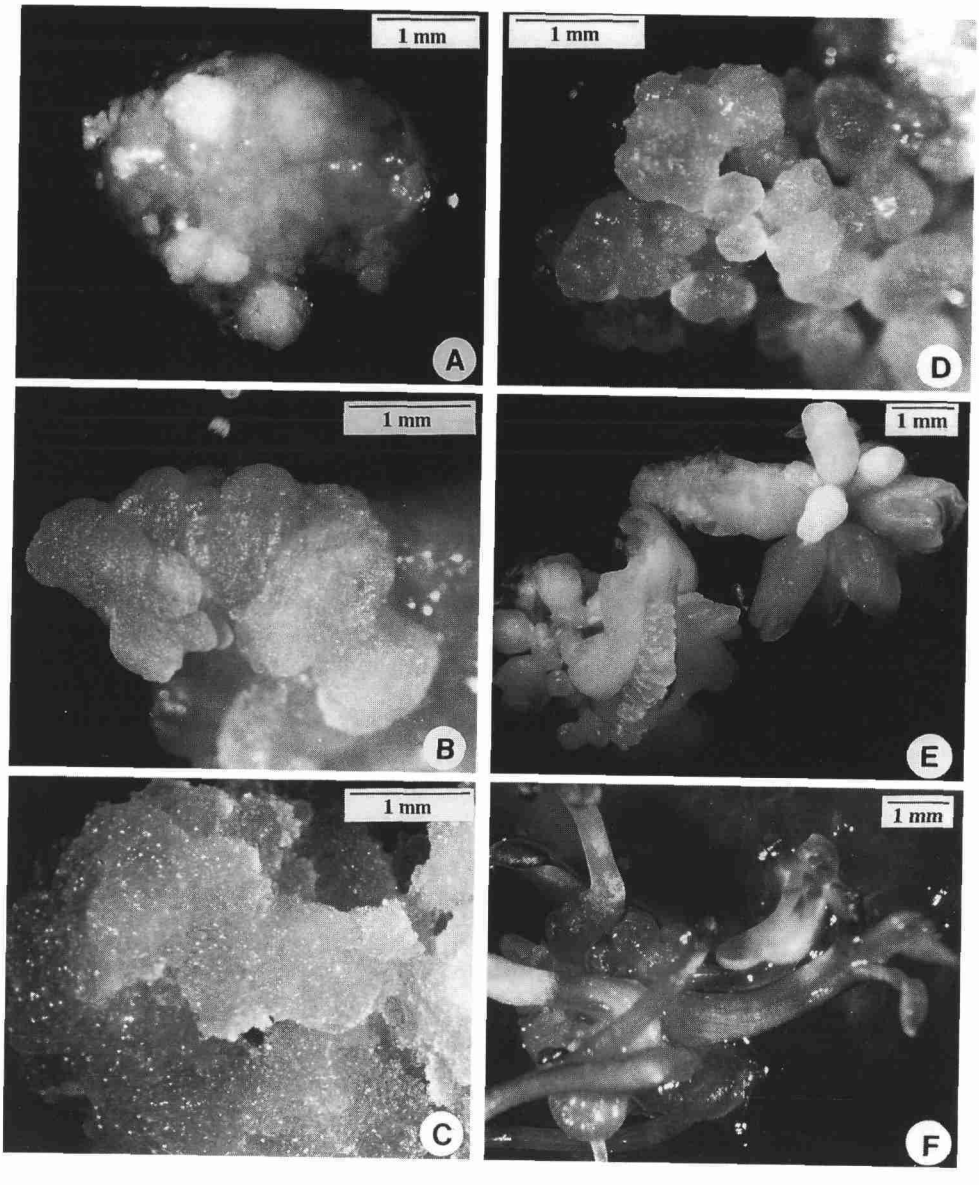


Figure 2. Embryogenèse somatique chez la patate douce. **A.** Cal mucilagineux à partir duquel émergent des cals compacts embryogènes ; **B.** Cal compact embryogène ; **C.** Cal friable non-embryogène ; **D.** Embryons somatiques globulaires ; **E.** Embryons somatiques cotylédonnaires ; **F.** Germination des embryons somatiques.

Le profil de bandes des estérases est complexe. Il comprend un très grand nombre de bandes, sans doute lié à l'état allohexaploïde de la patate douce (Figure 3 A). La feuille est caractérisée essentiellement par des bandes situées dans la zone de migration lente, c'est-à-dire les plus proches de la cathode. Les cals friables non embryogènes, à croissance rapide se distinguent des cals embryogènes par l'absence d'activité des estérases. Cependant, des activités sont observées au niveau de la zone de migration rapide chez les cals non embryogènes du cultivar 953. Elles sont toutefois différentes de celles des cals embryogènes du même génotype (Figure 3 A) par un nombre moins élevé de bandes. Peu de différence existe entre les cals embryogènes et les embryons globulaires, sauf pour le cultivar Quangshu dont le profil des estérases des cals embryogènes se distingue de celui des embryons globulaires par la présence de plus de bandes au niveau de la zone de migration rapide.

Pour les peroxydases, les cals friables non embryogènes se distinguent des cals embryogènes essentiellement par la présence d'activités au niveau de la zone de migration lente (Figure 3 B). Il y a peu de différence entre les cals embryogènes et les embryons globulaires. Ils sont essentiellement caractérisés par des bandes de migration rapide (Figure 3 B).

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 du cultivar Quangshu ne présentent aucune activité. En revanche, les génotypes 90 et 953 ont respectivement une faible et une intense activité au niveau de la zone de migration lente (Figure 3 C). Par ailleurs, les cals embryogènes et les embryons globulaires ont le même profil isozymique pour les 3 génotypes étudiés (Figure 3 C).

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 chez le cultivar 953. Il y a peu de différence entre les cals embryogènes et les embryons globulaires. Les feuilles ont des activités intenses dans la zone de migration lente.

Dans cette étude, l'analyse des isozymes montre de grandes différences dans leurs activités entre les cals embryogènes et non embryogènes. 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 isozymes 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 isozymes 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 (Tableau II), mais elle peut être aussi liée à une activité faible ou nulle des isozymes dans les cals non embryogènes. Des résultats similaires ont été constatés chez les cals embryogènes et non embryogènes de maïs [6].

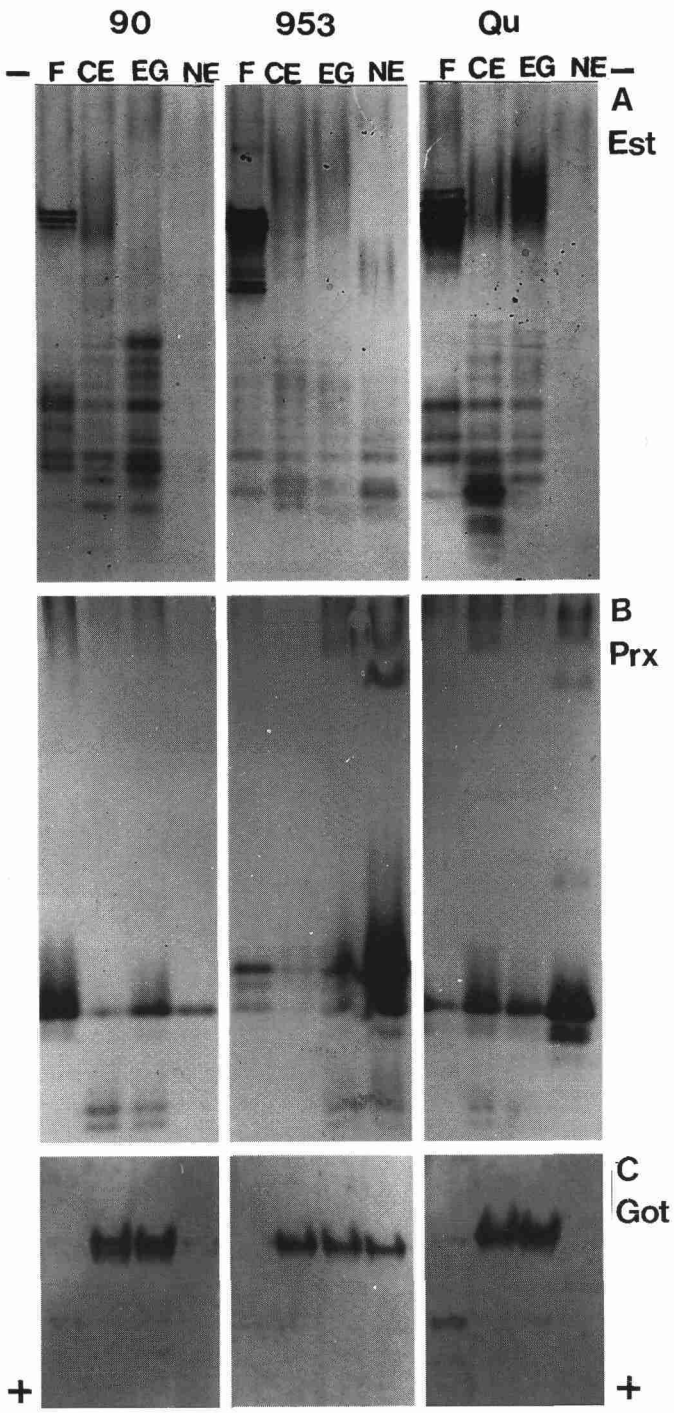


Figure 3. Les profils isozymiques de feuille (F), de cals embryogènes (CE), non embryogènes (NE), et d'embryons globulaires (EG) de 3 cultivars de patate douce (90, 953 et Quangshu). **A.** Les estérases (Est) ; **B.** Les peroxydases (Prx) ; **C.** Les glutamates oxaloacétates transaminases (Got).

Tableau II. Teneur en protéines (mg / 100 mg de MF) dans la feuille (F), les cals embryogènes (CE), non embryogènes (NE), et les embryons globulaires (EG) chez les cultivars 90, 953 et Quangshu.

Génotype	90				953				Quangshu			
Organes	F	CE	EG	NE	F	CE	EG	NE	F	CE	EG	NE
Teneur en protéines	1,5±0,2	1,5±0,3	1,3±0,2	1,1±0,2	1,3±0,2	1,4±0,2	1,6±0,3	1,2±0,1	1,3±0,2	1,6±0,3	1,5±0,4	1,0±0,2

Conclusion

Cette étude présente divers systèmes de régénération chez la patate douce. Bien que la micropropagation soit très bien maîtrisée, la régénération chez cette plante montre encore des difficultés affectant la culture des cals secondaires ou des protoplastes. La voie de l'embryogenèse somatique paraît alors la plus reproductible et efficace pour la régénération chez la patate douce, car elle permet d'assurer en permanence un taux élevé et inégalable de multiplication d'individus sains, juvéniles et homogènes. En plus, les tissus embryogènes constituent sans doute un matériel compétent, possédant un potentiel organogène élevé pour la régénération des protoplastes. Cette potentialité morphogénétique devrait faciliter l'accès à de nouvelles techniques, notamment la fusion cellulaire et la transformation, qui doivent être désormais incluses dans les programmes de sélection de patate douce.

Remerciements : Les auteurs remercient la Communauté Européenne et l'AUPELF pour l'intérêt porté à ce travail et le soutien financier.

Références

1. Bidney DL, Shepard JF (1980). Colony development from sweet potato petiole protoplasts and mesophyll cells. *Plant Sci Lett* 18 : 335-342
2. 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, Université Paris-Sud, Orsay, 167p.
3. Cavalcante Alves JM, Sihachakr D, Allot M, Tizroutine S, Mussio I, Servaes A, Ducreux G (1993). Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato *(Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Plant Cell Rep* 13 : 437-441.
4. Chée RP, Cantliffe DJ (1988). Somatic embryony patterns and plant regeneration in *Ipomoea batatas* Poir. *In vitro Cel Dev Bot* 24 : 955-958.
5. FAO (Food and Agriculture Organization) (1989). *Production yearbook,* Rome, Italy : 139.
6. Fransz PF, De Ruijter NCA, Schel JHN (1989). Isozymes as biochemical and cytochemical markers in embryogenic callus cultures of maiz *(Zea mays* L.). *Plant Cell Rep* 8 : 67-70.
7. Gleddie S, Keller WA, Setterfield G (1986). Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Solanum melongena* (eggplant). *Can J Bot* 64 : 355-361.

8. Green CE, Phillips RL (1975). Plant regeneration from tissue cultures of maiz. *Crop Sci* 15 : 417-421.
9. Gunckel JE, Sharp WR, Williams SB, West WC, Dinkwater WO (1972). Root and shoot initiation in sweet potato explants as related to polarity and nutrient media variation. *Bot Gaz* 133 : 254-262.
10. Halperin W, Wetherell D (1964). Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. *Am J Bot* 51 : 274-283.
11. 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 Mol Biol* 5 : 313-320.
12. Jarret RL, Salazar S, Fernandez ZR (1984). Somatic embryogenesis in sweet potato. *Hort Science* 19 : 397-398.
13. Kokubu 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.
14. Liu JR, Cantliffe DJ (1984). Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweet potato *(Ipomoea batatas* Poir.). *Plant Cell Rep* 3 : 112-115.
15. Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
16. Murata T, Hoshino K, Miyazi Y (1986). Plant regeneration from protoplasts of sweet potato. *Japan Breed* 36 : 236-237.
17. Otani M, Shimada T, Niizeki H (1987). Mesophyll protoplast culture of sweet potato *(Ipomoea batatas* L.). *Plant Sci* 53 : 157-160.
18. Sehgal CB (1978). Regeneration of plants from anther cultures of sweet potato *(Ipomoea batatas* Poir). *Z Pflanzenphysiol* 88 : 349-352.
19. Sihachakr D (1982). Premiers résultats concernant la multiplication végétative *in vitro* de la patate douce *(Ipomoea batatas* Lam., Convolvulacées). *Agr Trop* 37 : 142-151.
20. Sihachakr D, Ducreux G (1987). Isolement et culture de protoplastes de deux variétés de patate douce *(Ipomoea batatas* Lam.). *Can J Bot* 65 : 192-197.
21. Sihachakr D, Ducreux G (1987). Plant regeneration from protoplast culture of sweet potato *(Ipomoea batatas* Lam.). *Plant Cell Rep* 6 : 326-328.
22. Sihachakr D, Ducreux G (1993). Regeneration of plants from protoplasts of sweet potato *(Ipomoea batatas* (L.) Lam.). In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnoloy in agriculture and forestry* Vol. 23, Plant protoplast and genetic engineering IV, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg : 43-59.
23. Tsay HS, Tseng MT (1979). Embryoid formation and plantlet regeneration from anther callus of sweet potato. *Bot Bull Acad Sinica* 20 : 117-122.
24. Wu YW, Ma TP (1979). Isolation, culture and callus formation of *Ipomoea batatas* protoplasts. *Acta Bot Sinica* 21 : 335-338.
25. Yang TH, Tsai YC, Hseu CT, Ko HS, Chen SW, Blackwell RQ (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.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 263-274.

28

Propagation *in vitro* du pêcher-amandier GF-557

A. GHORBEL, A. CHATIBI, A. MLIKI, M.E. KCHOUK, H. ZEMNI

INRST, Laboratoire de Culture in vitro, *BP 95, Hammam-Lif. 2050, Tunisie.*

Résumé

L'hybride pêcher-amandier GF-557 est employé en Tunisie pour la culture du pêcher. Il présente une bonne compatibilité en pépinière, nécessite un greffage tardif et résiste aux nématodes de type méloïdogyne, à la chlorose et surtout à la sécheresse. La multiplication végétative conforme par bouturage ligneux, semi-ligneux et herbacé présente deux problèmes majeurs, à savoir :

– le faible pourcentage de réussite du bouturage suite à la difficulté d'enracinement des boutures,

– une importante dissémination de maladies d'origine fongique, bactérienne et surtout virale par la diffusion de matériel contaminé.

Ces deux difficultés au moins ont justifié le recours à la technique de culture in vitro. *La maîtrise de la production à petite échelle puis à grande échelle du GF-557* in vitro *a nécessité la mise au point de milieux de prolifération et d'enracinement. En dépit des phénomènes de vitrification et de jaunissement des pousses, le taux de multiplication demeure satisfaisant et atteint la valeur moyenne de 8. Les pousses issues des bourgeons axillaires se ramifient très rapidement par débourrement des axillaires de deuxième ordre. L'obscurité améliore la qualité et la quantité des racines. En effet, en absence de lumière, l'auxine paraît plus active en phase de préinitiation et d'initiation des racines. Le passage à la lumière en absence d'hormone permet d'améliorer la vigueur des vitroplants après l'apparition de signes d'étiolement. L'étude du comportement des vitroplants en serre d'acclimatation a révélé des difficultés d'ordre patholo-*

gique et physiologique. Les tests sérologiques par ELISA ont permis de démontrer l'absence totale des virus connus chez l'hybride GF-557.

Le porte-greffe GF-557 est un hybride pêcher-amandier obtenu à partir d'un amandier de semis et « shalil », un pêcher originaire du Pakistan [7, 12]. Employé pour la culture du pêcher, le GF-557 présente une bonne compatibilité en pépinière et nécessite un greffage tardif. Il est nettement plus vigoureux que le pêcher franc, il est résistant aux nématodes de type méloïdogyne *(M. incongnita, M. javanica, M. arenaria)*, à la chlorose ferrique et surtout à la sécheresse. Cet hybride est très conseillé pour l'Afrique du Nord [7, 12].

En Tunisie, une enquête effectuée auprès des pépiniéristes révèle un besoin pressant en porte-greffe pêcher-amandier GF-557. C'est ainsi que les demandes s'élèvent à 200 000 plants par an. Le GOVPF (Groupement obligatoire des viticulteurs et producteurs de fruits) importe à lui seul par an 50 000 vitroplants d'un autre porte-greffe, le GF-677, dont 20 000 sont aussi produits localement par bouturage. C'est dire que les besoins sont importants en quantité, mais aussi en qualité, puisque les plants importés sont des GF-677 et non des GF-557 très appréciés par les pépiniéristes tunisiens.

Le mode de multiplication du GF-557 par semis est très rarement employé en raison de la grande hétérogénéité qu'il peut induire. En revanche, la mise en place d'une multiplication végétative conforme a retenu l'attention des pépiniéristes. C'est ainsi que ce porte-greffe a été multiplié par bouturage ligneux, semi-ligneux et herbacé [2]. Toutefois, deux problèmes majeurs peuvent découler de ce mode de multiplication :

– d'une part, un faible pourcentage de réussite du bouturage, suite aux difficultés d'enracinement des boutures,

– d'autre part, le risque de dissémination de maladies d'origine fongique, bactérienne et surtout virale par suite d'une propagation végétative de matériel infecté.

L'objectif de notre travail consista d'abord à améliorer les taux de multiplication et d'enracinement. La réussite de l'étape d'enracinement et la qualité des racines obtenues sont déterminantes dans la valeur économique du produit obtenu. Par ailleurs, nous serons amenés à maîtriser tous les aléas de la production industrielle *in vitro* du porte-greffe fruitier.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Le pêcher-amandier GF-557 est un hybride entre le pêcher (*Prunus persica* Batsch L.) et l'amandier *(Prunus amygdalus)*. Le plant de départ est un pied-mère pêcher-amandier GF-557 certifié conforme.

Désinfection

Des baguettes de ± 20 cm sont prélevées sur le pied-mère pendant le mois de mai, période où le GF-557 est physiologiquement actif. Elles sont débarrassées de leurs feuilles et nettoyées à l'eau savonnée. Elles sont ensuite frottées à l'aide d'un coton imbibé d'alcool à 70° puis de Mercryl Laurylé pur. Après morcellement, les fragments contenant 4 à 5 nœuds sont trempés dans une solution d'hypochlorite de sodium à 8°

de Chlore additionnée de Tween 20 à 0,1 % pendant 15 minutes et sous agitation continue. Enfin, trois rinçages à l'eau stérile sont effectués pour enlever toute trace d'hypochlorite de sodium. Les boutures et apex sont ainsi prêts à la mise en culture *in vitro* (Figure 1).

Conditions de culture

Le pH des milieux de culture est ajusté à 5,6 par addition d'acide chlorhydrique (1N) ou d'hydroxyde de potasse (1N) avant autoclavage à 116 °C pendant 24 minutes. Les flacons de culture vides, tubes ou bocaux, subissent un autoclavage de deux heures à 116 °C. Après ensemencement sous la hotte à flux laminaire, à raison de 10 pousses (phase de multiplication) à 20 (phase d'enracinement) par bocal, les flacons sont placés dans la chambre de culture sous une intensité lumineuse de 12 $W.m^{-2}$ assurée par des tubes fluorescents. La photopériode est de 12 heures. La température est de 23 °C le jour et de 19 °C la nuit.

Milieux de culture

Prolifération intense

Les petites pousses obtenues à partir des apex ou des boutures implantés sont transférées sur les milieux de multiplication M1 ou M2 (Tableau I). L'utilisation de ces deux milieux de culture s'est effectuée d'une manière alternative tous les 21 jours afin d'éviter le phénomène d'accoutumance et de faire profiter les explants de substances minérales et organiques de nature et de concentration variable. Pour les différents milieux de culture, qu'il s'agisse de l'étape d'initiation ou du stade de prolifération, le sucre

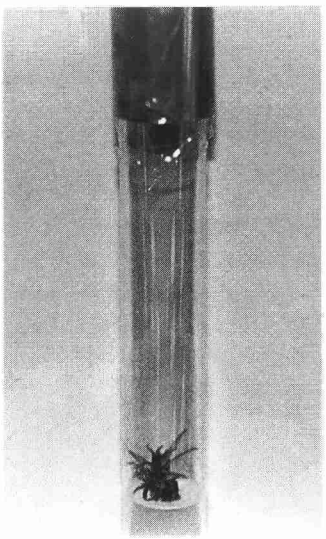


Figure 1. Bourgeonnement obtenu à partir d'une bouture de GF-557 cultivée sur milieu MS contenant 2 $mg.l^{-1}$BAP.

utilisé est soit le saccharose, soit le glucose, et ce, en fonction du comportement des plants *in vitro*.

Enracinement

Pour l'enracinement, les plants sont individualisés et repiqués sur le milieu de culture M3 (Tableau II). Ils sont placés à l'obscurité totale pendant 5 jours, comme phase d'induction et d'initiation des racines. Les plants sont ensuite transférés sur le milieu de culture M4 dépourvu d'hormones, à la lumière avec une photopériode de 12 heures.

Acclimatation

Dans le but d'adapter progressivement les plantules au milieu *ex vitro*, nous avons mis au point une étape de préacclimatation. La technique consiste à ouvrir légèrement les couvercles des bocaux de culture dès la fin de l'étape d'enracinement. Les plantules sont extraites de leurs bocaux de culture et séjournent trois à quatre jours en chambre de culture dans des cristallisoirs contenant un coton imbibé de solution nutritive composée des sels minéraux de MS [11], le cristallisoir demeurant couvert d'une feuille de cellophane (cellofrais). Les plantules bien développées passent à la serre d'acclimatation. Elles sont lavées et débarrassées de leur gélose puis traitées par deux fongicides : le benlate à 0,6 $g.l^{-1}$ et l'aliette à 2,5 $g.l^{-1}$. Elles sont empotées sur un substrat terreux composé de 30 % de tourbe, 30 % de sable et 40 % de terreau contenant de la laine de roche. A l'intérieur de la serre, la température est fixée à 22° C. L'ombrage est assuré par une toile tendue sous le vitrage. Les conditions de croissance des plantes dans la serre sont progressivement rapprochées des conditions naturelles. Des traitements préventifs par des insecticides (karaté à 0,75 $mg.l^{-1}$) sont administrés tous les 15 jours durant toute la phase d'endurcissement.

Résultats et discussion

Prolifération intense *in vitro*

Tous les 21 jours de culture, une partie des pousses obtenues est transférée dans des bocaux de 250 ml contenant 70 ml de milieu de culture M1 à raison de 8 à 10 pousses par bocal, et ce, tout au long de la phase d'instauration de l'état juvénile qui dure 70 jours, soit trois à quatre subcultures. Nous avons remarqué que les pousses ont des difficultés à s'adapter à l'environnement des bocaux, comme en témoigne la rapide diminution de leur croissance. De plus, le nombre de pousses vitreuses augmente et la formation de cal est très marquée. Paradoxalement, on constate un léger allongement des pousses et un feuillage dense à l'image de ce que nous observons chez le pied-mère. Après trois ou quatre repiquages successifs sur M1, et en prenant soin d'éliminer à chaque fois les pousses vitrifiées, nous avons constaté que les pousses se différencient de plus en plus, présentant une miniaturisation des feuilles qui prennent une forme lancéolée caractéristique. Le taux de multiplication s'améliore progressivement. Ainsi, après le quatrième repiquage, les plants présentent à leur base deux à quatre pousses de taille très variable allant jusqu'à 2 cm de longueur. Ces pousses correspondent au développement des bourgeons axillaires. A partir de ce stade, nous procédons à la culture des nœuds et

Tableau I : Composition des milieux de culture, phase de multiplication.

Milieux Substances	M1 mg.l^{-1}	M2 mg.l^{-1}
Macro-éléments	LQ	MS*
Micro-éléments	LQ	MS
Vitamines	MS	MS
Fe-EDTA (Koch-Light)	20	20
Myo-inositol	100	100
BAP	0,6	0,3
AIB	0,2	0,1
GA3	0,2	0,1
Sucre (saccharose/glucose)	30 000	30 000
Agar	8 000	8 000

LQ : Lepoivre et Quoirin, 1977.
MS : Murashige et Skoog, 1962.
MS* : La concentration en NH_4NO_3 est diluée au quart.

Tableau II : Composition des milieux de culture, phase d'enracinement.

Milieux Substances	M3 mg.l^{-1}	M4 mg.l^{-1}
Macro-éléments	MS	MS
Micro-éléments	MS	MS
Vitamines	MS	MS
Fe-EDTA (Koch-Light)	20	20
Myo-inositol	100	100
ANA	0,5	–
Saccharose	30 000	30 000
Agar	8 000	8 000

ce, dans le but d'améliorer de façon significative le taux de multiplication qui varie alors entre 6 et 8. Dans ces conditions, une pousse composée de 4 à 6 nœuds est subdivisée en 4 à 6 explants, correspondant chacun à un nœud. Pour cette culture, l'emploi du glucose comme source de carbone est préférée au saccharose. Notons qu'avec un bocal contenant au départ 25 nœuds, nous avons obtenu, au bout de trois semaines, l'équivalent de 6 à 7 bocaux, soit 170 nœuds. Les pousses issues des bourgeons axillaires se ramifient très rapidement par débourrement des axillaires de deuxième ordre (Figure 2).

Au cours de cette phase de multiplication, les problèmes liés aux phénomènes de jaunissement des pousses, de callogenèse à la base des explants, et de vitrification des plants ont été contournés par l'utilisation de dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) à raison de 90 mg/l et par l'alternance des milieux de culture MS [11] et LQ [8].

Figure 2. Prolifération intense dé GF-557 *in vitro* (à droite) et apparition de jaunissement des pousses cultivées sur M2 (à gauche).

Phase d'enracinement

Le but principal est d'obtenir des racines qui donnent satisfaction tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif.

A la fin de la phase de prolifération, les pousses de taille égale ou supérieure à 1,5 cm sont individualisées et repiquées sur le milieu d'enracinement M3 contenant 0,5 $mg.l^{-1}$ ANA (Tableau III). Les concentrations élevées en ANA donnent naissance à un gros cal à la base des pousses. Les racines obtenues sont longues et ramifiées (Figure 3).

Figure 3. Phase d'enracinement de plants de GF-557 sur milieu M4 riche en ANA (0,5 $mg.l^{-1}$).

En dépit du fait que le pourcentage d'enracinement avoisine les 100% à la lumière ou à l'obscurité lorsque la concentration en ANA est égale à 0,5 $mg.l^{-1}$, l'apparition des racines est plus rapide à l'obscurité. Celles-ci sont courtes, très épaisses et présentent des signes d'oxydation en lumière continue (Figure 4). Toutefois, la qualité des pousses est légèrement affectée à l'obscurité en raison de leur étiolement. Ce phénomène est réversible dès le passage à la lumière.

Contrairement aux observations effectuées par plusieurs auteurs [4, 5], la lumière ne semble pas déterminante dans l'induction ou l'initiation des racines du GF-557. Au contraire, un passage de 5 jours à l'obscurité permet l'induction et l'initiation rapide des racines chez le porte-greffe GF-557. Ces résultats rejoignent globalement ceux mentionnés par Mosella *et al.* [10], Moncousin [9] et Gaspar [6]. Il apparaît donc que l'auxine pourrait être plus active lorsque les plantules séjournent pendant 5 jours à l'obscurité. Le passage, ensuite, sur milieu M4 dépourvu d'hormones éviterait la rétroinhibition des racines par les auxines [6, 10].

Le meilleur pourcentage d'enracinement obtenu en utilisant de l'AIB comme auxine dans le milieu de culture ne dépasse pas 60% (Tableau III). Cette étape d'enracinement était fondamentale pour la suite de nos travaux concernant la reprise en terre des vitroplants. Ainsi, l'obtention d'un système racinaire développé pourrait lever toute ambiguïté quant à la reprise des plants en serre d'acclimatation.

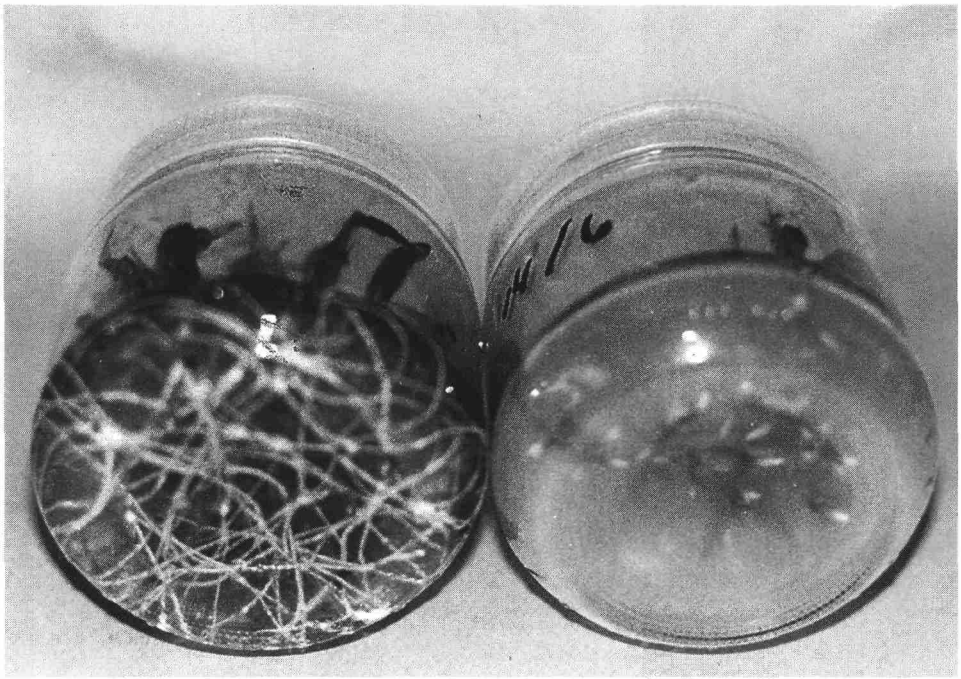


Figure 4. Influence de la lumière sur la qualité des racines obtenues lorsque les pousses sont cultivées cinq jours à l'obscurité totale (à gauche) ou en lumière continue (à droite).

Tableau III : Influence de la nature des hormones sur le pourcentage d'enracinement du GF-557.

Hormones	Conc. mg.l^{-1}	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1,0	1,5
AIB	N*	0	0	0	18	**18**	2	1
	%	0	0	0	60	**60**	7	3
ANA	N*	0	6	15	21	**29**	18	12
	%	0	2	52	72	**96**	60	40

N* : nombre de pousses racinées sur 30 plantules testées.
% : pourcentage de pousses racinées.

Phase d'acclimatation

• ***Préacclimatation***

Après environ un mois de séjour sur le milieu d'enracinement, les plantules atteignent une taille de 7 à 8 cm avec un système racinaire bien développé. Ces plantules sont

ensuite retirées des bocaux, puis soigneusement débarrassées de la gélose, afin d'éviter le développement des micro-organismes pathogènes. L'ouverture graduelle de la feuille de cellophane permet aux plantules de s'adapter à l'air ambiant, ce qui se traduit par un verdissement significatif et un allongement important des plantules (10 à 12 cm) au bout de trois à quatre jours de séjour *ex vitro*. Ainsi, la plantule se prépare à un fonctionnement autotrophe. Nous avons également remarqué l'apparition de nouvelles racines indispensables pour la réussite de l'étape d'acclimatation en serre (Figure 5).

• ***Acclimatation en serre***

Globalement, les pertes les plus sensibles ont été remarquées en serre deux à trois semaines après transfert des plantules en serre sur substrat terreux. Elles commencent d'abord par flétrir, puis se nécrosent, laissant des signes indicateurs de la pourriture du collet et des lésions sur la tige. Dans certains cas, malgré le traitement anti-botrytis à base de bénomyl ou de thiophanate au moment et après l'empotage des plants, ces signes de dépérissement persistent. Nous avons également noté le problème du blocage de croissance des plants (Figure 6).

Nos recherches ont été orientées pour mettre en évidence les causes principales des pertes constatées lors du transfert du GF-557. Nous avons étudié :

– la qualité des racines ainsi que la vigueur des plants sortis des bocaux de culture,
– les facteurs abiotiques comme le substrat terreux, la température et l'humidité,
– les facteurs biotiques tels que les micro-organismes (champignons et bactéries).

Nous avons constaté que, lorsque le sevrage est réalisé en période chaude, aux mois de juin, juillet et août (Tableau IV), les taux de reprise sont considérablement affectés (60 %). Cela est esentiellement lié aux températures élevées (≥ 25° C) favorables au développement excessif des champignons pathogènes (botrytis et rhizoctonia). Les pertes sont supérieures lorsque les plantules présentent une certaine fragilité ou sensibilité causée par les cassures involontaires des racines au moment du rempotage.

Tableau IV : Variation des pourcentages de reprise du porte-greffe GF-557 en fonction de la date de sortie des plantules.

Mois	**Nb. vitroplants empotés**	**Nb. de vitroplants ayant repris**	**Pourcentage de reprise**
Décembre	150	145	97
Janvier	150	125	83
Juin	4 000	2 380	**59**
Juillet	8 000	4 964	**62**
Août	6 000	3 636	**61**
Septembre	2 000	1 368	68

Figure 5. Étape de préacclimatation avant le transfert des vitroplants à la serre.

Figure 6. Comportement des plants de GF-557 en serre d'acclimatation.

Assainissement viral

A côté des bactéries et des champignons, les virus sont à l'origine de nombreuses maladies et anomalies présentant des symptômes variables et qui sont généralement incurables.

Ces virus entraînent rarement la mort de la plante mais provoquent le plus souvent un affaiblissement des rendements et une dégénérescence de la plante virosée [3].

L'assainissement par voie méristématique du GF-557 demeure une voie longue (6 mois) et dépend étroitement de la taille du méristème prélevé. C'est pourquoi nous avons été amenés à tester le clone produit *in vitro*.

Par des tests ELISA, effectués au laboratoire de protection des plantes de l'Université de Bari, nous avons recherché les cinq virus les plus répandus chez les arbres fruitiers, à savoir : Sharka (Plum pox virus), ApCLSV *(Apple Chlorotic Leaf Spot Virus)*, PNRSV *(Prunus Necrotic Ring Spot Virus)*, PDV *(Prune Dwarf Virus)* et ApMV *(Apple Mosaic Virus)*. Les tests révèlent que tous les échantillons GF-557 sont indemnes de ces virus. Ce résultat montre l'intérêt de l'emploi des méristèmes pour la production de plants indemnes de virus.

Conclusion

La maîtrise de la production à petite échelle de GF-557 *in vitro* a nécessité la mise au point de milieux de prolifération ou d'enracinement et l'amélioration de la qualité des pousses racinées. L'obscurité semble obligatoire pour améliorer la quantité et la qualité des racines. Elle devient alors inutile, voire nocive lors de la phase de post-initiation, d'où l'intérêt d'utiliser un milieu de culture dépourvu d'hormones. Le passage à la lumière permet d'améliorer la vigueur des vitroplants après l'apparition des signes d'étiolement.

L'étude des vitroplants en serre d'acclimatation a révélé des difficultés d'ordre pathologique et physiologique. Les températures dépassant les 22 °C provoquent une diminution considérable du pourcentage de reprise des vitroplants.

Les tests sérologiques par ELISA ont permis de confirmer le maintien d'un bon état sanitaire des plants de pêcher-amandier GF-557 produits *in vitro*. Les cinq virus les plus répandus chez les arbres fruitiers n'ont pas été révélés sur les vitroplants régénérés *in vitro*.

Toutefois, le problème crucial demeure toujours l'établissement d'un calendrier de production industrielle qui tiendra compte aussi bien de la date de livraison aux pépiniéristes que de la période d'acclimatation des vitroplants. Ainsi, l'amélioration de la production *in vitro* ne justifie l'extension du système de multiplication à une échelle industrielle que si le calendrier de production répond aux exigences techniques et commerciales. Dans ces conditions, la technique de culture *in vitro* devient rentable. Il serait intéressant de suivre le comportement de ces plants en plein champ et d'évaluer l'incidence de l'état sanitaire sur l'augmentation de la vigueur et du rendement des clones régénérés.

Références

1. Barghchi M, Alderson PG (1989). Pistachio (*Pistacia vera* L.). In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in agriculture and forestry.* Vol. 5 : Trees II, 68-98.
2. Bernard R, Grassely C (1981), Le pêcher-amandier. INRA, Bordeaux. *Arboriculture fruitière,* n° 328 : 38-43.
3. Bigre JP, Morand JC, Tharoud T (1986). *Pathologie des cultures florales et ornementales.* Tech. et Doc. JB Baillère, Paris, 237 p.
4. Côte F, Domergue R, Folliot M, Bourrin J, Marte F (1991). Micropropagation *in vitro* de l'ananas. *Fruits,* II. Vol. 46.
5. Escalant JV (1987). Les bananiers diploïdes en culture *in vitro (Musa acuminata* et *Musa balbisianna)* : étude du comportement et recherche de variabilité. Thèse de 3e cycle. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, France, 174 p.
6. Gaspar T (1988). Aspects physiologiques de l'organogenèse *in vitro.* In : *Culture de cellules, tissus et organes végétaux.* Presses Polytechniques Romandes, Suisse.
7. Gautier M (1982). Le pêcher et sa culture. CTIFL. Documentation n°340 (1re partie) : 49-54.
8. Lepoivre P, Quoirin M (1977). Étude des milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus. Acta Hort* 78 : 437-442.
9. Moncousin C (1982). Contribution à la caractérisation biochimique et physiologique de la phase juvénile de l'artichaut *(Cynara scolymus* L.) au cours de sa multiplication végétative conforme et accélérée en culture *in vitro.* Thèse de Doctorat Ingénieur. Université Paris-Sud. Centre d'Orsay, 209 p.
10. Mosella CL, Macheix JJ, Jonard R (1980). Les conditions du microbouturage *in vitro* du pêcher *(Prunus persica* Batsch.) : influences combinées des substances de croissance et de divers composés phénoliques. *Physiol Veg* 18 : 597-608.
11. Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
12. Vidaud J, Jacoutet I, Thiveno J (1987). *Le pêcher : références et techniques.* CTIFL, 445 p.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 275-282.

29

Les effets de la phytohémagglutinine (PHA) dans la culture *in vitro* végétale

M. KHOSROWCHAHLI, S.A. GAÈM-MAGAMIE

Laboratoire de Génétique, Faculté des Sciences, Université de Tabriz, Iran.

Résumé

Les effets mitogènes de la phytohémagglutinine (PHA) ont déjà été démontrés sur les cellules animales et quelques espèces végétales (Phaseolus). *Dans nos études, ces effets sur les tissus du tabac,* Nicotiana tabacum *L. var. Basmacerisse 31, en culture* in vitro, *en utilisant le milieu de culture de Murashig et Skoog n'ont pu être démontrés. En revanche, nous avons constaté une interaction positive entre la forme P de la phytohémagglutinine avec le 2,4-dichlorophénoxyacétic acide (2,4-D), et la benzyladenine (BA) aux concentrations : 0,1 ppm BA ; 0,1 ppm 2,4-D et 1 ou 2 ppm PHA (P) ; pour les poids frais et secs des cals. De plus, on a constaté chez les explants une potentialité supérieure à la formation du cal et à l'organogenèse pour les concentrations ci-dessus par rapport aux autres concentrations utilisées.*

La lectine est le nom généralement attribué aux glycoprotéines qui peuvent agglutiner les globules rouges sanguins. Ces produits diffèrent les uns des autres par le poids moléculaire, le type des acides aminés, les métaux qu'ils contiennent et la conformation spatiale. On les extrait, à partir des différentes espèces végétales, de la graine, de la racine et de la partie corticale des plantes adultes. On peut encore les extraire des bactéries, des champignons, des œufs de poissons et des membranes cellulaires des mammifères, etc. La lectine extraite du germe du blé a été utilisée pour distinguer les cellules normales des cellules malignes [2, 4].

Les effets mitogènes de la PHA ont été démontrés pour la première fois en 1960 [10].

La PHA est une lectine extraite du haricot à graines rouges. Les effets les plus importants de la PHA sont la stimulation de la division des leucocytes aux taux de concentration situés entre 1 à 5 µg/lit dans le milieu de culture *in vitro* [12]. En ajoutant ce produit au milieu de culture des leucocytes, on constate un changement dans la structure de la membrane cytoplasmique, ce qui conduit à une modification dans la perméabilité de celle-ci ; de plus, d'autres changements se produisent, comme l'augmentation de la synthèse des phospholipides, l'acétylation et la phosphorylation des histones et d'autres protéines nucléaires. En général, dix à vingt heures après l'introduction de la PHA dans le milieu de culture, la synthèse de l'ARN et des protéines augmente ; la synthèse de l'ADN commence après 48 heures et la cellule entre alors dans la phase de division [12].

Le poids moléculaire de la PHA a été estimé à environ 115 000 + 4 500 daltons où les hydrates de carbone présentent une proportion de 10 % [12].

Les données concernant les effets des lectines sur les cellules et les tissus végétaux sont rares. Sous les effets de la PHA, on a constaté une accélération de la germination chez *Phaseolus coccineus* L. tandis qu'elle n'agit pas sur *P. vulgaris* L. Chez *Allium cepa* L., aux températures en dessous de 20 °C, la PHA accélère la croissance des racines. On a constaté que, chez cette espèce, l'augmentation des pourcentages de divisions cellulaires est en relation avec la concentration de la PHA. La production des fruits parthénocarpiques chez la tomate mâle stérile et la poire (variété Bartelette) a été constatée sous l'effet de la PHA [3]. On a également mis en évidence une différence significative pour la vitesse de la germination des grains de pollen chez *Lolium longiflorum* L. sous l'effet de la PHA [13].

La lectine extraite du soja augmente le nombre, le poids des cellules et la synthèse de l'ADN dans les tissus de cette espèce. Ces trois paramètres donnent une idée des effets mitogénétiques des lectines [5]. La relation entre le niveau de la lectine intracellulaire et la différenciation cellulaire au niveau de la culture des tissus est aussi démontrée [8]. De plus, on a constaté que le niveau de la lectine intracellulaire au stade de la formation du cal est plus faible qu'au stade de l'organogenèse [8].

Comme les effets de la PHA ont été généralement étudiés sur les cellules et les tissus du genre *Phaseolus*, nous avons donc repris ce travail pour étudier ces effets sur un autre genre végétal.

Matériel et méthodes

Nous avons utilisé les tissus provenant du tabac *Nicotiana tabacum* L. var. Basmacerisse 31 reçu du centre d'amélioration du tabac de l'Ourmieh (Azerbaidjan de l'ouest/Iran). Les explants des feuilles ont été prélevés à partir des feuilles situées au niveau de la deuxième ou de la troisième feuille des plantes cultivées en serre. Le poids des explants était de 0,02 g pour un diamètre d'un centimètre. Utilisant le milieu de culture de M.S. [14], le 2,4-D et la BA ont été supplémentés en tant que sources d'auxines et de cytokinine, ainsi que deux formes de la PHA. Les concentrations choisies sont indiquées dans le Tableau I.

Tableau I. Niveau de la concentration des produits utilisés.

Produits	Concentrations
2,4-D	0,1 ppm 1 ppm
BA	0,1 ppm 1 ppm
PHA (M)	0, 1, 2 , 3, ppm
PHA (P)	0, 1, 2, 3, 4, ppm

Comme la PHA est un produit thermosensible, on a donc utilisé une membrane de 0,2 µ pour la stériliser. Le pH des milieux de culture a été ajusté à 5,7 ± 0,1.

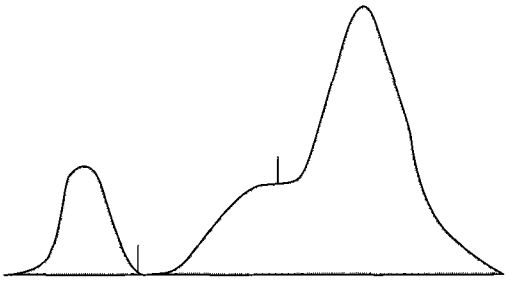
Le poids frais, le poids sec, ainsi que la potentialité de formation du cal et de l'organogenèse ont été étudiés six semaines après la mise en culture des explants. Pour avoir recours à la PHA (P) fraîche, nous l'avons extraite à partir des graines du haricot rouge de la variété NAZ en utilisant la méthode de Rigas [11] ; on a ensuite comparé les bandes électrophorétiques de la PHA (P) extraites avec celles de la PHA (P) Sigma et Difco pour s'assurer de la fiabilité de l'extrait (Figure 1). Nous avons utilisé la méthode de Folin-Lowry [7] pour estimer la concentration de la PHA (P) dans l'extrait.

Résultats

Les poids frais et secs du cal et les organes obtenus ont été analysés par le dispositif expérimental *split-plot*. L'analyse statistique des différents niveaux de concentrations du 2,4-D et de BA, et leurs combinaisons au seuil de 1 % montrent une différence significative (Tableau II). Pour les concentrations de 0,1 ppm 2,4-D et 0,1 ppm de BA, nous avons obtenu le poids frais et sec maximum. Pour les différentes concentrations de la PHA (M), une différence significative n'a pas été observée aux seuils de 5 % et 1 % (Tableau II). Pour les effets d'interaction hormone x PHA (M), nous n'avons observé aucune différence significative (Tableau II).

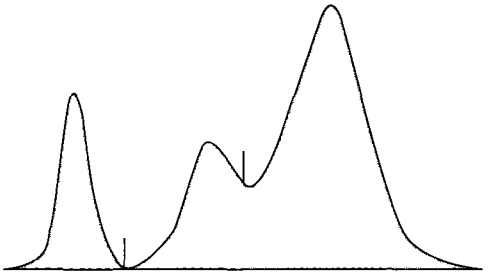
Tableau II. Analyse de la variance pour poids frais et poids secs.

		Poids frais			Poids secs		
S.V.	**DDL**	**SCE**	**CM**	**F**	**SCE**	**CM**	**F**
				**			**
Hormones	3	166 3895	55 4930	269 99	0 2351	0 0784	247 47
Erreur 1	12	2 4651	0 2054		0 0038	0 0003	
Niveaux				ns			ns
PHA(M)	3	16 7904	5 5968	2 5859	0 0154	0 0051	2 318
Hormones X				ns			ns
PHA(M)	9	21 2170	2 3563	1 0887	0 0158	0 0018	0 820
Erreur 2	36	77 9146	2 1643		0 0792	0 0022	
Totale	**63**	**284 7667**			**0 3493**		



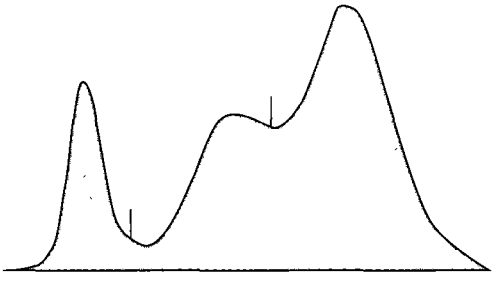
%

01	15,2	A
02	15,1	
03	39,7	



%

01	17,7	B
02	20,1	
03	62,2	



%

01	16,7	C
02	27,4	
03	55,9	

Figure 1. Comparaison des pics électrophoréthiques : A = PHA (P) Sigma, B = PHA (P) extraite, C = PHA (P) Difco.

L'analyse statistique des poids frais et secs du cal et des organes pour les différentes concentrations du 2,4-D et de BA et les cinq niveaux de la PHA (P), ainsi que les différentes combinaisons de ces produits montrent une différence significative pour le 2,4-D et la BA comme dans l'analyse précédente (Tableau III). En même temps, aucun effet significatif pour les différentes concentrations de la PHA (P) n'a été observé (Tableau III). Dans cette expérience, l'interaction hormone x PHA (P) montre une différence significative au seuil de 1 %. La comparaison des moyennes par la méthode de Duncan indique que les combinaisons de : 0,1 ppm 2,4-D, 0,1 ppm BA et 1 ppm PHA (P) ; 0,1 ppm 2,4-D, 0,1 ppm BA et 2 ppm PHA (P) ont un effet positif significativement différent des autres concentrations (Figure 2).

Tableau III. Analyse de la variance pour poids frais et poids secs.

		Poids frais			Poids secs		
S.V.	**DDL**	**SCE**	**CM**	**F**	**SCE**	**CM**	**F**
				**			**
Hormones	3	97 3871	32 4624	22 505	0 1838	0 0619	28 74
Erreur 1	20	28 8482	1 4424		0 0431	0 0020	
Niveaux				ns			ns
PHA(P)	4	10 3509	2 5877	2 4700	0 0120	0 0051	2 500
Hormones X				**			**
PHA(P)	12	31 4704	2 6225	2 5080	0 0536	0 0045	3 750
Erreur 2	80	83 6494	1 0456		0 0974	0 0012	
Totale	**119**	**251 7060**			**0 3919**		

ns : non significative
** : différence significative p = 1 %

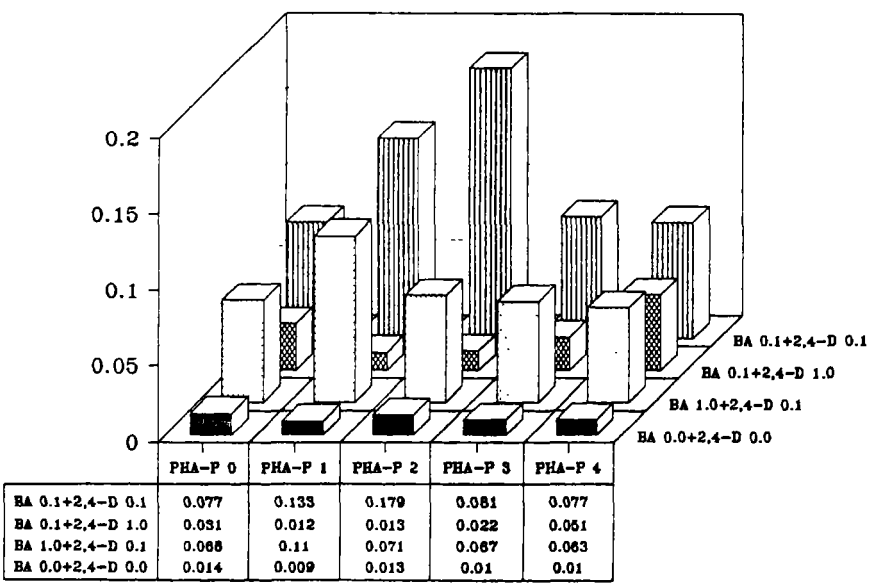
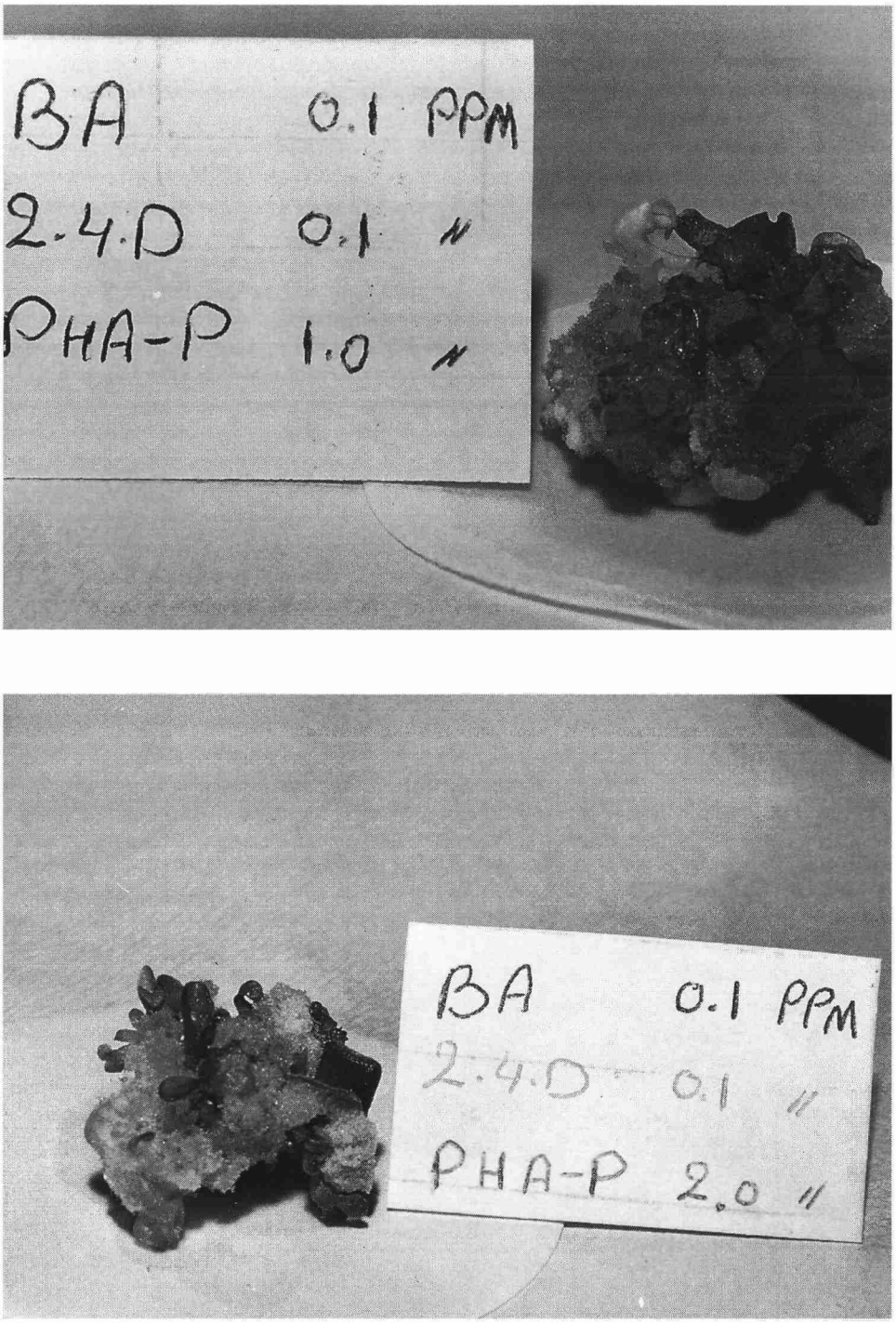


Figure 2. Effet des différentes concentrations du 2 4-D, de la BA et de la PHA (P) sur le poids sec.

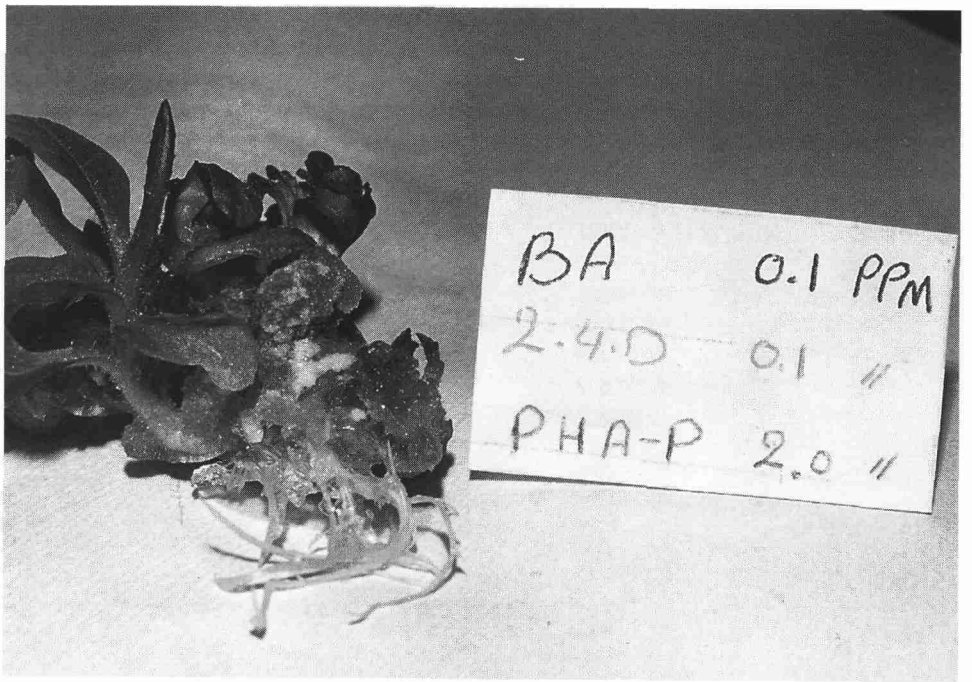


A

B

Figure 3. A et B : Cal et points de différenciations quatre semaines après la mise en culture sous l'effet de la PHA (P) à 1 et 2 ppm.

A



B

Figure 4. A et B : Formation des racines et de la tige six semaines après la mise en culture sous l'effet de la PHA (P) à 1 et 2 pmm.

Discussion

Les analyses des résultats obtenus montrent que la PHA sous ses formes M et P et ses différentes concentrations n'ont aucun effet sur la production du cal et la potentialité d'organogenèse du cal. Cela peut être dû en partie à l'existence de la barrière formée par la paroi des cellules végétales. En revanche, la combinaison de PHA (P), 2,4-D et de BA montre un effet net sur la production du cal et sa potentialité d'organogenèse (Figure 3 : A et B, Figure 4 : A et B). L'absence des radicaux d'hydrate de carbone dans la PHA (P) a dû faciliter la pénétration de celle-ci dans la cellule en présence de l'auxine et de la cytokinine, ce qui a probablement augmenté le taux des divisions cellulaires.

De plus, en introduisant la PHA (P) et la PHA (M) dans le milieu de culture, nous avons constaté une nette augmentation de l'intensité des couleurs des feuilles des explants par rapport aux témoins, durant les deux premières semaines de l'expérience. Les effets de la PHA (P) chez les cellules végétales comme chez les cellules animales ont été plus significatifs que les effets de la PHA (M) ; cela est sûrement dû à l'élimination des radicaux glucidiques dans la PHA (P). Comme les protoplastes végétaux sont dépourvus de paroi cellulaire, on pourrait les utiliser pour mieux vérifier ces effets des lectines.

Références

1. Asen S, Larson RE (1951). *Agr Exp Sta Progress Rep* 40 : 1-4.
2. Aub JC, Tieslan C, Lankester A (1963). *Proc Natl Acad Sci USA* 50 : 613-619.
3. Bangerth F, Gotz G, Buchlon G (1972). *Z Planzenphysiol* 66 : 357-377.
4. Burger MM, Goldberg AR (1967). *Proc Natl Acad Sci USA* 57 : 359-366.
5. Howard J, Shannon L, Oki L, Murashig T (1977). *Exp Cell Res* 107 : 448-450.
6. Lis H, Sharon N (1981). In : ed Abraham Marcus *Lectins in higher plants.* Academic press N.Y. : 371-448.
7. Lowry OH, Rosenbrough NY, Farr AL, Randall RJ (1951). *J Biol Chem* 193 : 265-275.
8. Meimeth T, Than van KT, Marcotte J, Trinn TH, Clarke AE (1982). *Plant Physiol* 70 : 579-584.
9. Nagel W (1972). *Planta* 106 : 269-272.
10. Nowell PC (1960). *Cancer Res* 20 : 462-466.
11. Rigas DA, Li JG, Osgood EE (1951). *Am J Med* 10 : 776.
12. Sharon N, Lis H (1989). *Lectins.* Chapman and Hall, NY.
13. Southworth D (1975). *Nature* 258 : 600-602.
14. Torres KC (1989). *Tissue culture techniques for horticultural crops.* Von-Nostrand, Reinhold, N.Y.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 283-295.

30

Étude précoce des effets morphologiques et physiologiques du rapport sodium/calcium *in vitro* sur une population d'*Atriplex halimus*

Y. POURRAT, P. DUTUIT

Équipe d'Écotechnologie, Université de Paris-Sud, Tour E1, 92296 Châtenay-Malabry, France.

Résumé

*L'*Atriplex halimus *est une plante fourragère importante des zones arides méditerranéennes. L'ensemble de cette étude a pour objectif de repérer, dans la diversité génétique naturelle d'une population, les types pouvant se comporter de façon optimale dans certaines conditions. Dans un premier temps nous avons centré nos observations sur le comportement* in vitro *de jeunes plantes vis-à-vis de faibles concentrations de* Na^+ *et de* Ca^{++} *dans le milieu. Vingt milieux différents par leur contenu en NaCl et en* $CaCl_2$ *ont été utilisés : cinq concentrations différentes de* Na^+ *(entre 0,1 et 1 mM) et, pour chacune, quatre concentrations de* Ca^{++}*, donnant les rapports Na/Ca de 3, 2, 1 et 0,5. Il a été observé que le rapport Na/Ca a un effet significatif sur tous les critères biométriques étudiés (longueur de la tige, longueur de la racine la plus longue et nombre des feuilles). Le rapport Na/Ca égal à 2 a produit les valeurs les plus faibles. En revanche, c'est le rapport 1 qui a donné les valeurs les plus fortes. Le dosage de l'activité enzymatique de la GS et de la GDH montre que, pour une même concentration de* Na^+*, ces deux enzymes sont significativement sensibles aux variations de la concentrations de* Ca^{++} *du milieu. Ces résultats sont remarquables si on tient compte de ce que nous étudions les incidences des variations de ces deux éléments à très faibles concentrations. En utilisant des concentrations de* Na^+ *plus élevées (entre 1 et 10 mM), tout en respectant les mêmes rapports avec la concentration du* Ca^{++} *du*

milieu de 3, 2, 1 et 0,5, les variations observées sur des paramètres biométriques, telles que les longueurs de la tige et de la racine la plus longue et le poids de la matière sèche de la partie aérienne, sont significativement dépendantes de la quantité de Na^+ à elle seule. Au contraire, le nombre de feuilles ne varie significativement qu'avec le rapport entre le Na^+ et le Ca^{++}. La concentration de Na^+ dans les tissus de la plante reste stable quand le Na^+ du milieu augmente. En revanche, la concentration de Ca^{++} dans les tissus augmente fortement quand le Ca^{++} dans le milieu augmente.

L'*Atriplex halimus* est un arbuste halophile fourrager des steppes arides, important dans l'économie d'élevage des pays de l'Afrique du Nord et du Moyen-Orient. Bon rétenteur des sols, cette plante a aussi une importance écologique. Or, les formations à *Atriplex halimus* sont de plus en plus dégradées.

Le besoin est apparu de disposer de clones dont les caractéristiques de tolérance à la salinité du sol soient connues, les plantes les plus tolérantes étant repérées au sein des populations naturelles qui présentent une grande diversité génétique. C'est avec cet objectif que la culture *in vitro* a été entreprise. Il s'est avéré nécessaire d'analyser les mécanismes d'action de certains éléments minéraux dans la construction de la plante dès les premiers stades de développement. C'est ainsi que nous avons observé que la composition minérale (macroéléments) du milieu avait une importance déterminante sur l'organogenèse des jeunes plantes même à des concentrations faibles [1].

Dans cette étude, il nous a paru intéressant d'élucider quels sont les effets, sur la croissance et le développement des jeunes plantes, de différentes concentrations de sodium et de calcium dans le milieu de culture. Le Saos et Binet [3] ont déjà montré un effet de l'interaction sodium/calcium sur la croissance d'une autre plante halophile, le *Suaeda maritima.*

Nous avons jugé nécessaire de respecter des valeurs précises des rapports Na^+/Ca^{++} pour différents niveaux de concentration du Na^+, mais dans des conditions générales de faible concentration ionique. Ce choix, comme celui de travailler sans apport de substances de croissance, a été fait dans le but de faire ressortir plus clairement les effets de chacun des éléments.

Nous nous sommes intéressés aux paramètres biométriques tels que les longueurs de tige et de racine, le nombre de feuilles, le poids sec des parties aériennes et racinaires. Nous nous sommes également intéressés à la corrélation entre la présence de calcium et de sodium dans les tissus et la valeur des paramètres biométriques.

Nous avons recherché les systèmes enzymatiques impliqués dans les événements morphologiques observés. Les activités enzymatiques des glutamine-synthétase (GS) et glutamate-déshydrogénase (GDH) ont donc été mesurées.

Matériel et méthodes

Les semences d'*Atriplex halimus* ont été récoltées à Djelfa (Algérie). Les semis sont faits à partir de graines stérilisées à l'hypochlorite de sodium (Domestos). Elles sont mises à germer dans des boîtes de Petri, sur du papier filtre imbibé d'eau distillée, à 25 °C constant et sous un éclairement fluorescent de 25 $\mu E.\ s^{-1}.m^{-2}$ (photopériode de 12 h). Le 4^e jour d'imbibition, les plantules ont une longueur moyenne de 1,52 cm. Elles sont repiquées à raison d'une plantule par tube, sur les différents milieux de culture expérimentés. La méthode a déjà été décrite par Pourrat et Dutuit [9].

Vingt-huit milieux de culture sont expérimentés, ils diffèrent seulement par leur contenu en chlorures de Na^+ et de Ca^{++}. Ils possèdent tous 15 mg/l de NaH_2PO_4, $2H_2O$, 300 mg/l de KNO_3, 13,4 mg/l de $(NH_4)_2\ SO_4$, 50 mg/l de $MgSO_4\ 7H_2O$ et les microéléments de Murashige et Skoog [7], les vitamines de Morel [4], 20 g/l de saccharose, 0,1 mM de Fer EDTA et 8 g/l d'Agar (Bactoagar Difco). Le pH final est ajusté à 5,8.

Les mesures sont faites après un mois de culture des plantules. Les paramètres biométriques considérés sont : la longueur de la tige, le nombre de feuilles, la longueur de la plus longue racine et, pour certaines expériences, les poids secs des parties aériennes et racinaires. Les dosages du Na^+ et du Ca^{++} tissulaires sont faits, après minéralisation des tissus, dans une solution chlorhydrique, par spectrométrie atomique, d'absorption pour le Ca^{++} et d'émission pour le Na^+. Les activités enzymatiques de la GDH et de la GS sont suivies par spectrophotométrie d'après la méthode utilisée par Boucaud et Billard [2].

Chaque expérience correspond à un ensemble de 28 milieux. Chaque milieu est testé sur 24 individus et avec 3 répétitions. Les résultats de chaque paramètre ont été analysés d'après le dispositif *split-plot* (traitements et sous-traitements) dont le modèle est :

$$X_{ijk} = \mu + M^i + B_j + \varepsilon_{ij} + T_k + (MT)_{ik} + \delta_{ijk}.$$

$$i = 1...m\ ;\ j = 1...b\ ;\ k = 1...t$$

$$\varepsilon ij = N\ (0\ ,\ \sigma_M)\ ;\ \delta_{ijk} = N\ (0\ ,\ \sigma_T)$$

Les traitements (M) correspondent aux différentes concentrations de Na^+, les sous-traitements (T), aux différentes concentrations de Ca^{++} pour chaque traitement. Le terme B correspond aux répétitions [10].

Toutes les moyennes (de traitement ou de sous-traitement) sont présentées avec l'écart type (σ_{n-1}) correspondant.

Résultats

Concentrations de sodium entre 0,1 et 1,0 mM

L'effet de l'augmentation progressive de la concentration du Ca^{++} pour 5 concentrations différentes de Na^+ (0,1 mM, 0,5 mM, 0,78 mM, 0,87 mM et 1 mM), tout en respectant les rapports Na^+/Ca^{++} de 3, 2, 1, et 0,5, est montré dans le Tableau I. L'analyse globale fait apparaître que, d'une façon très générale, c'est le rapport $Na^+/Ca^{++} = 2$ qui donne les valeurs les plus faibles et le rapport $Na^+/Ca^{++} = 1$ (qui correspond au doublement de la quantité de Ca^{++}), les résultats les plus forts. Un nouveau doublement de la quantité de Ca^{++} (c'est-à-dire le passage du rapport Na/Ca de 1 à 0,5) produit une diminution des valeurs.

• *Longueur de la tige*

L'analyse des résultats montre que, à elle seule, la concentration de Na^+ dans le milieu n'influence pas significativement la longueur de la tige (Figure 1). Néanmoins, l'allongement le plus fort a été obtenu pour la concentration de 0,78 mM (Figure 2). Au contraire, en ce qui concerne les rapports entre la concentration du Na^+ et celle du Ca^{++}, on obtient un effet significatif au risque de 1 %. Sur la Figure 2, on voit que pour chacune des concentrations de Na^+ testées, il y a toujours une augmentation de la longueur de la tige lorsque l'on passe du rapport Na^+/Ca^{++} égal à 2 au rapport 1. L'aug-

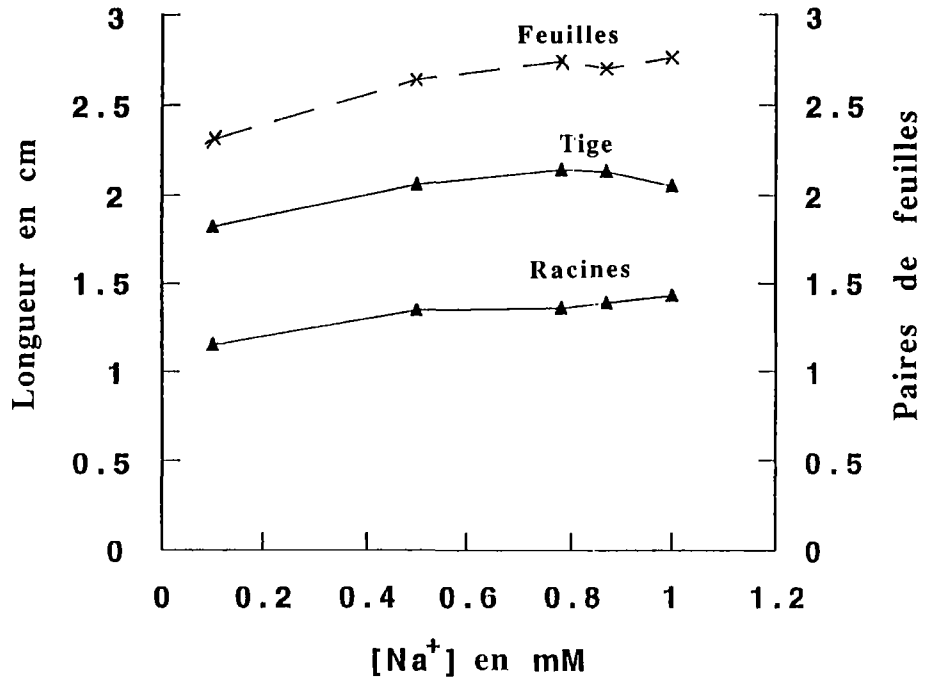


Figure 1. Effet de différentes concentrations de Na^+ sur la croissance de plantules d'*Atriplex halimus*.

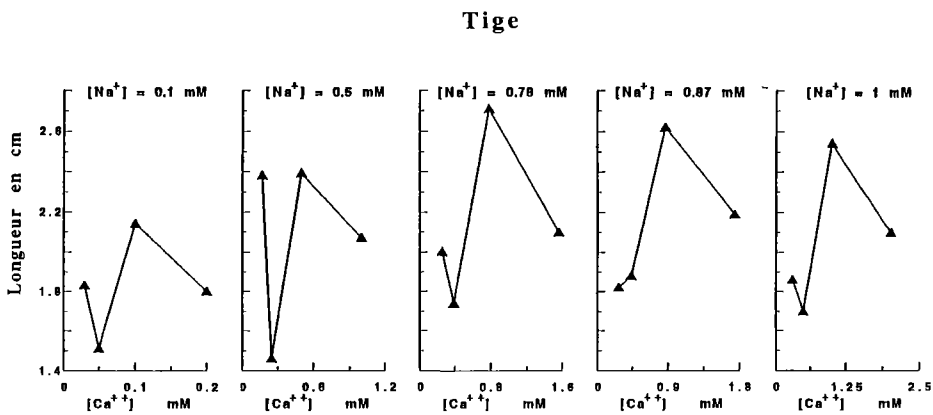


Figure 2. Effet de différents rapports Na^+/Ca^{++} sur la longueur des tiges de plantules d'*Atriplex halimus*.

Tableau I. Effet de différentes concentrations de sodium et de calcium dans le milieu de culture, sur la croissance de plantules d'*Atriplex halimus*.

Traitement	$[Na^+]$ en mM	$[Ca^{++}]$ en mM	$[Na^+]/[Ca^{++}]$	Longueur de tige en cm	Nombre de paires de feuilles	Longueur de la racine la plus longue
1	0,1	0,03	3	1,83 ± 0,25	2,15 ± 0,03	1,11 ± 0,21
2	0,1	0,05	2	1,51 ± 0,29	2,10 ± 0,12	1,13 ± 0,14
3	0,1	0,10	1	2,14 ± 0,40	2,63 ± 0,49	1,21 ± 0,14
4	0,1	0,20	0,5	1,80 ± 0,13	2,35 ± 0,33	1,17 ± 0,22
5	0,5	0,17	3	2,38 ± 0,33	2,67 ± 0,62	1,41 ± 0,25
6	0,5	0,25	2	1,46 ± 0,16	2,32 ± 0,25	1,13 ± 0,15
7	0,5	0,50	1	2,39 ± 0,09	2,95 ± 0,54	1,50 ± 0,08
8	0,5	1,00	0,5	2,02 ± 0,30	2,64 ± 0,35	1,37 ± 0,11
9	0,78	0,26	3	2,00 ± 0,07	2,50 ± 0,29	1,18 ± 0,08
10	0,78	0,39	2	1,74 ± 0,58	2,51 ± 0,07	1,24 ± 0,10
11	0,78	0,78	1	2,71 ± 0,67	3,37 ± 0,86	1,51 ± 0,03
12	0,78	1,56	0,5	2,10 ± 0,13	2,58 ± 0,11	1,53 ± 0,23
13	0,87	0,28	3	1,82 ± 0,03	2,39 ± 0,41	1,29 ± 0,31
14	0,87	0,44	2	1,88 ± 0,23	2,39 ± 0,27	1,29 ± 0,14
15	0,87	0,87	1	2,62 ± 0,58	3,21 ± 0,97	1,48 ± 0,14
16	0,87	1,74	0,5	2,19 ± 0,66	2,82 ± 0,46	1,50 ± 0,48
17	1,00	0,30	3	1,86 ± 0,11	2,37 ± 0,55	1,24 ± 0,29
18	1,00	0,50	2	1,70 ± 0,06	2,69 ± 0,73	1,32 ± 0,04
19	1,00	1,00	1	2,54 ± 0,09	3,22 ± 0,48	1,64 ± 0,05
20	1,00	2,00	0,5	2,10 ± 0,26	2,75 ± 0,10	1,54 ± 0,37

Longueur en cm

mentation relative la plus forte (+ 63,7 %) a été obtenue à 0,5 mM de Na^+. Tandis que le passage du rapport 1 au rapport 0,5 produit une diminution des valeurs dont les plus importantes correspondent à 0,78 mM Na^+ (- 22,5 %) (Tableau II).

Pour toutes les concentrations de Na^+, les valeurs de longueur de tige les plus fortes sont obtenues pour un rapport Na/Ca de 1. Les valeurs les plus faibles correspondent au rapport Na^+/Ca^{++} de 2. Pour chaque concentration du Na^+, l'augmentation progressive du Ca^{++} produit une diminution de la longueur de la tige quand le rapport Na^+/Ca^{++} passe de 3 à 2, puis une augmentation quand il passe de 2 à 1 et une nouvelle diminution quand on passe de 1 à 0,5. La seule exception à ce comportement se situe entre le rapport 3 et 2 pour 0,87 mM de Na^+.

• ***Nombre de feuilles***

Les différentes concentrations de Na^+ ont un effet significatif au risque de 5 % sur le nombre de feuilles. La valeur la plus forte a été obtenue pour 1mM (Figure 1). En ce qui concerne les rapports entre la concentration du Na^+ et celle du Ca^{++}, on obtient un effet significatif au risque de 1 %. Sur la Figure 3, on voit que, pour chacune des concentrations de Na^+ testées, il y a toujours une augmentation du nombre de feuilles lorsque l'on passe du rapport Na^+/Ca^{++} égal à 2 au rapport 1. L'augmentation relative la plus forte (+ 34,3 %) a été obtenue à 0,78 et 0,87 mM de Na^+. Tandis que le passage du rapport 1 au rapport 0,5 produit une diminution des valeurs dont la plus importante (- 23,4 %) correspond à 0,78 mM Na^+ (Tableau II).

Tableau II. Variation relative (en %) de la longueur de la tige et de la racine la plus longue, ainsi que du nombre de paires de feuilles, après le doublement de la quantité en calcium et la décroissance du rapport $[Na^+]/[Ca^{++}]$ de 2 à 1 et de 1 à 0,5 et cela pour toutes les concentrations de sodium testées.

$[Na^+]$ en mM	Variation en % du paramètre quand $[Na^+]/[Ca^{++}]$ change de 2 à 1			Variation en % du paramètre quand $[Na^+]/[Ca^{++}]$ change de 1 à 0,5		
	Longueur de tige	Nombre de feuilles	Longueur de racine	Longueur de tige	Nombre de feuilles	Longueur de racine
0,10	+ 41,7	+ 25,2	+ 7,1	- 15,9	- 10,6	- 3,3
0,50	+ 63,7	+ 27,1	+ 32,7	- 15,5	- 10,5	- 8,7
0,78	+ 55,7	+ 34,3	+ 21,8	- 22,5	- 23,4	+ 1,3
0,87	+ 39,4	+ 34,3	+ 14,7	- 16,4	- 12,1	+ 1,3
1,00	+ 49,4	+ 19,7	+ 24,2	- 17,3	- 14,6	- 6,1

Pour toutes les concentrations de Na^+, les valeurs du nombre de feuilles les plus fortes sont obtenues pour un rapport Na^+/Ca^{++} de 1. Les valeurs les plus faibles correspondent au rapport Na^+/Ca^{++} de 2, sauf pour la concentration en sodium de 1 mM. Pour chaque concentration du Na^+, l'augmentation progressive du Ca^{++} produit une augmentation du nombre de feuilles quand le rapport Na^+/Ca^{++} passe de 2 à 1, et une diminution quand il passe de 1 à 0,5. Le comportement entre le rapport 3 et 2 n'est pas homogène.

• ***Longueur de la racine la plus longue***

L'analyse des résultats montre que la concentration de Na^+ dans le milieu influence significativement au risque 5 % la longueur de la racine. L'allongement le plus fort a été obtenu pour la concentration de 1 mM de sodium (Figure 1). En ce qui concerne les rapports entre la concentration du Na^+ et celle du Ca^{++}, on obtient un effet significatif au risque de 1 %.

Sur la Figure 4, on voit que pour chacune des concentrations de Na^+ testées, il y a toujours une augmentation de la longueur de la racine lorsque l'on passe du rapport Na^+/Ca^{++} égal à 2 au rapport 1. L'augmentation relative la plus forte (+ 32,7 %) a été obtenue à 0,5 mM de Na^+. Tandis que le passage du rapport 1 au rapport 0,5 produit une diminution des valeurs uniquement pour les concentrations de 0,1, 0,5 et 1mM de Na^+. La décroissance la plus forte (- 8,7 %) est obtenue pour 0,5 mM de sodium (Tableau II).

Pour les concentrations de 0,1, 0,5 et 1mM de Na^+, les valeurs de longueur de racine les plus fortes sont obtenues pour un rapport Na^+/Ca^{++} de 1. Pour les concentrations de 0,78 et 0,87 mM de Na^+, le rapport Na^+/Ca^{++} égal à 0,5 donne un résultat légèrement supérieur au rapport 1.

La longueur la plus forte (1,64 cm) a été obtenue pour des concentrations en sodium et calcium de 1 mM et la valeur la plus faible (1,11 cm) est obtenue pour les concentrations en Na^+ et Ca^{++} respectivement de 0,1 et 0,03 mM.

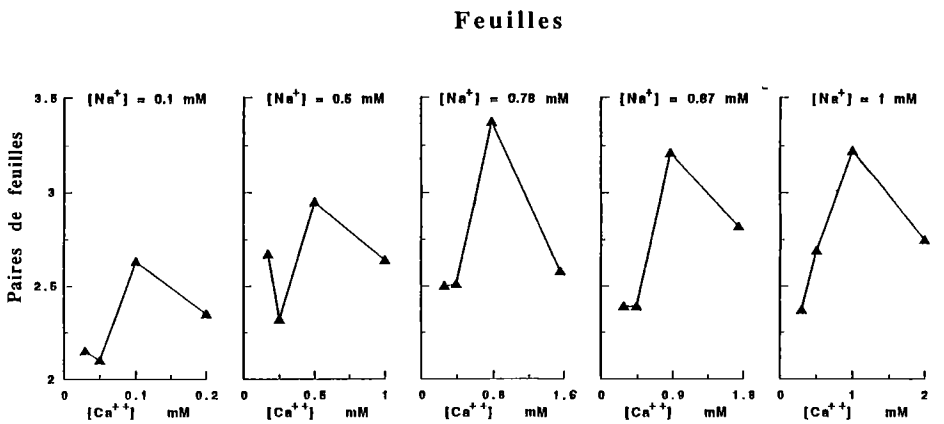


Figure 3. Effet de différents rapports Na^+/Ca^{++} sur le nombre de paires de feuilles de plantules d'*Atriplex halimus.*

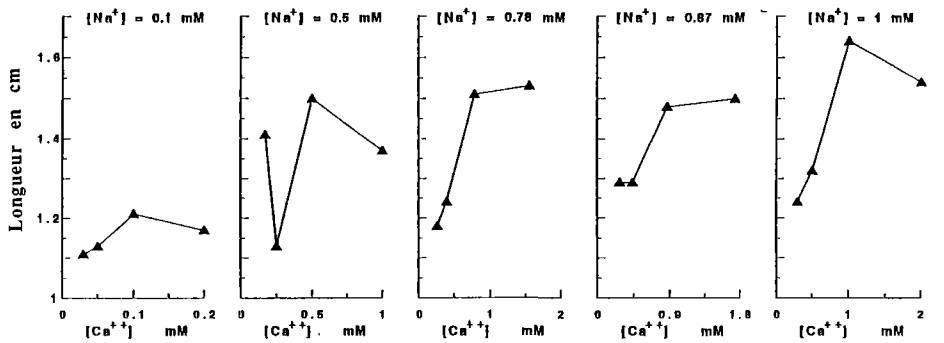


Figure 4. Effet de différents rapports Na^+/Ca^{++} sur la longueur de la racine la plus longue de plantules d'*Atriplex halimus.*

• *Dosage de l'activité enzymatique de la GS et la GDH*

Nous avons choisi la situation de plus faible concentration ionique, c'est-à-dire 0,1mM de Na^+, 0,03 mM, 0,05 mM, 0,1 mM et 0,2 mM de Ca^{++} respectivement pour les rapports 3, 2, 1 et 0,5, pour effectuer les mesures d'activité enzymatique séparément dans les tissus racinaires et aériens. Les résultats obtenus apparaissent sur la Figure 5. Ils montrent que le système enzymatique constitué par ces deux enzymes est sensible à la variation du Ca^{++} du milieu. Dans la partie aérienne, l'optimum de l'activité des deux enzymes est obtenu aux concentrations en Ca^{++} de 0,05 et 0,1 mM alors qu'à ces mêmes concentrations dans les tissus racinaires l'activité enzymatique est inexistante. Tandis que, dans la partie aérienne, l'activité des deux enzymes augmente fortement quand on passe de 0,03 mM à 0,05 mM, dans les racines, ces deux activités diminuent brusquement.

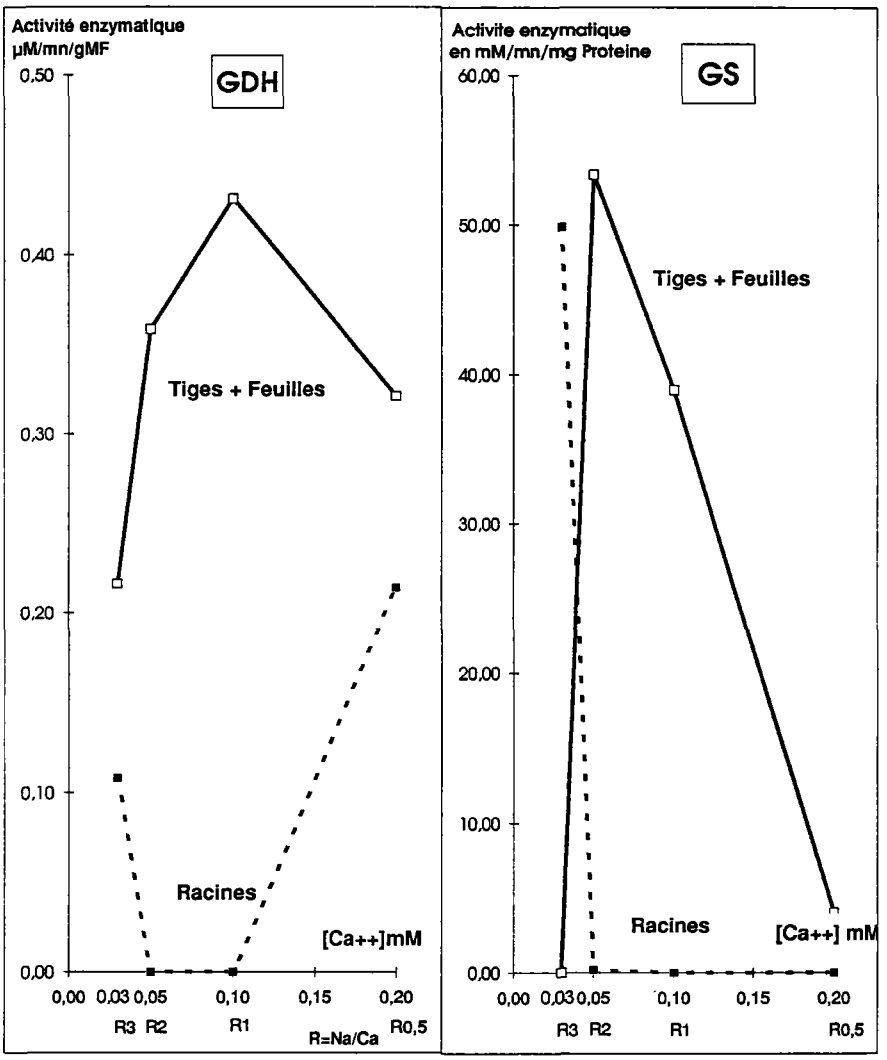


Figure 5. Effet de différentes concentrations en calcium pour une concentration en sodium de 0,1 mM sur l'activité enzymatique de la GDH et de la GS dans les tissus de la racine et de la partie aérienne de plantules d'*Atriplex halimus.*

Concentrations de sodium entre 1,0 et 10,0 mM

Dans le cas des concentrations de sodium entre 1,0 et 10,0 mM (Tableau III), l'effet de l'augmentation progressive de la concentration du calcium (rapports Na^+/Ca^{++} de 3, 2, 1 et 0,5) n'a pas eu d'effet significatif sur les paramètres biométriques : longueurs de la tige et de la racine la plus longue et poids de la matière sèche de la partie aérienne. Au contraire, c'est l'augmentation de la concentration en Na^+ à elle seule qui produit un effet positif significatif sur ces paramètres. En revanche, le nombre de feuilles ne

dépend significativement que du rapport Na/Ca. Sur la Figure 6, on peut observer que la longueur de la tige et de la racine ainsi que le nombre de feuilles augmentent quand le Na^+ passe de 1,0 mM à 10,0 mM. C'est la racine qui montre la plus forte croissance (+ 62 %). En ce qui concerne le poids de la matière sèche des parties aériennes, la Figure 7 montre qu'il progresse, comme les autres paramètres biométriques (+ 47 %), inversement au poids de la matière sèche racinaire qui, lui, diminue legèrement (– 10 %). Si on considère le rapport entre le poids de la matière sèche aérienne et racinaire, celui-ci augmente fortement quand le sodium varie de 2,0 mM à 10,0 mM (+ 64 %).

Les quantités de sodium et de calcium dosées dans les tissus des parties aériennes et racinaires des plantes apparaissent sur la Figure 7. Le Na^+ tissulaire reste inchangé pour les concentrations de 2,0 et 10,0 mM, tant dans les tissus racinaires qu'aériens. Cependant, entre 1 et 2 mM, il est à noter que la concentration en sodium des tissus de la partie aérienne décroît fortement (de 13,79 µg/mg MS à 7,84 µg/mg MS). En ce qui concerne le calcium, il augmente dans les tissus quand la concentration de Na^+ varie de 1,0 à 10,0 mM, ce qui correspond aussi, dans ce protocole expérimental, à une augmentation corrélative du Ca^{++} dans le milieu. L'augmentation dans la partie aérienne est beaucoup plus forte (31,39 µg/mg MS contre 13,65 µg/mg MS dans les racines à 10,0 mM de Na^+).

Tableau III. Longueur de la tige, nombre de feuilles et longueur de la racine la plus longue de jeunes plantes d'*Atriplex halimus* cultivées *in vitro* sur des milieux contenant 1, 2 et 10 mM de Na^+ et différentes concentrations de Ca^{++} (± l'écart type de la moyenne).

Milieu	$[Na^+]$ mM	$[Ca^{++}]$ mM	$[Na^+]/[Ca^{++}]$	Longueur tige (cm)	Nombre de feuilles	Longueur racinaire (cm)
1	1,0	0,3	3	2,0 ± 0,1	3,0 ± 0,3	1,3 ± 0,2
2	1,0	0,5	2	2,1 ± 0,1	2,9 ± 0,3	1,4 ± 0,1
3	1,0	1,0	1	2,0 ± 0,4	2,9 ± 0,3	1,7 ± 0,2
4	1,0	2,0	0,5	2,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1	1,8 ± 0,2
5	2,0	0,6	3	2,1 ± 0,3	2,8 ± 0,3	1,3 ± 0,3
6	2,0	1,0	2	2,0 ± 0,4	2,8 ± 0,2	1,4 ± 0,3
7	2,0	2,0	1	2,1 ± 0,4	2,9 ± 0,1	1,6 ± 0,4
8	2,0	4,0	0,5	2,5 ± 0,5	3,3 ± 0,0	2,4 ± 0,2
9	10,0	3,0	3	3,0 ± 0,4	3,5 ± 0,4	2,6 ± 0,3
10	10,0	5,0	2	3,2 ± 0,4	3,6 ± 0,4	2,7 ± 0,2
11	10,0	10,0	1	3,2 ± 0,6	3,4 ± 0,3	3,1 ± 0,5
12	10,0	20,0	0,5	2,5 ± 0,5	2,9 ± 0,4	2,6 ± 0,5

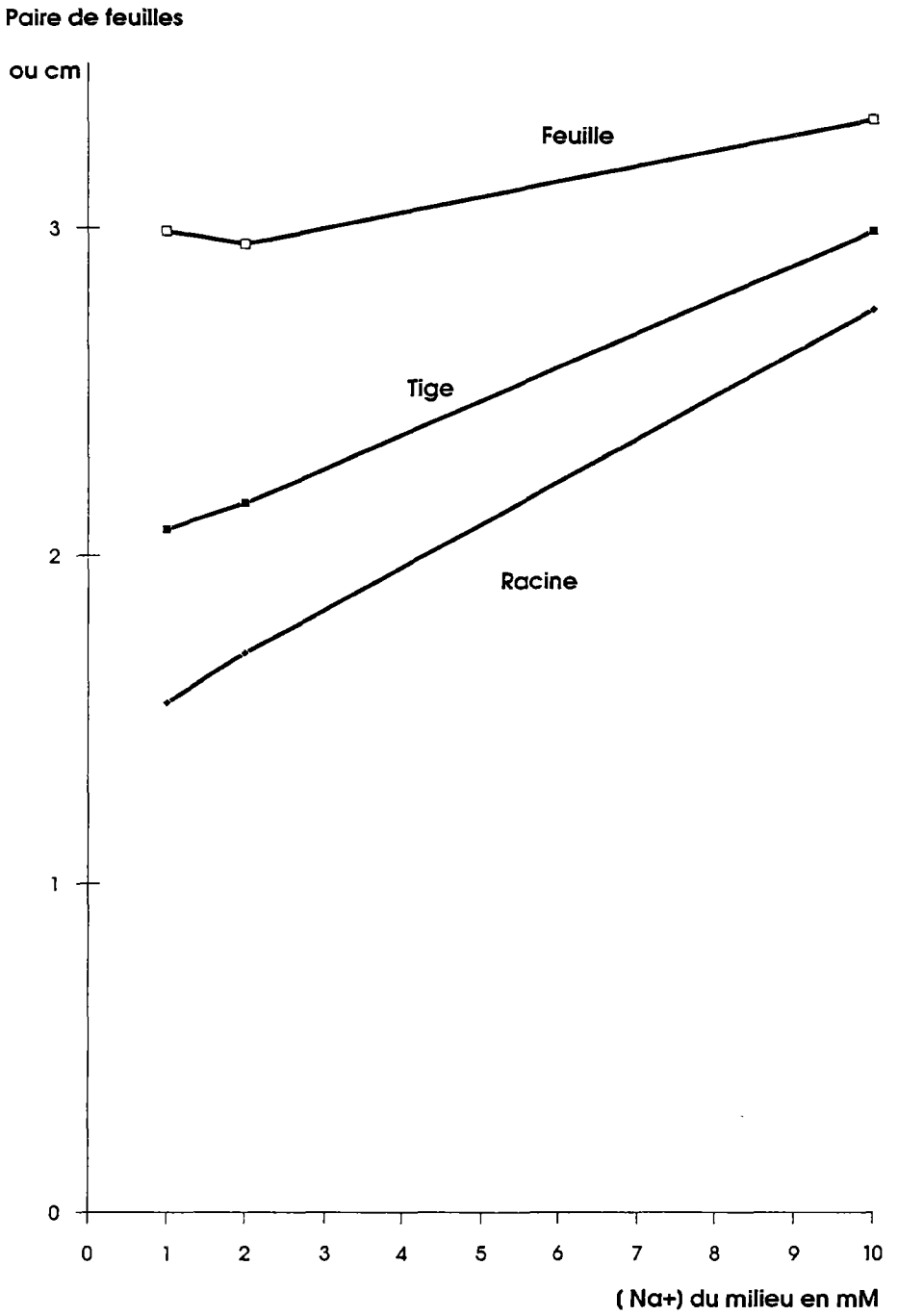


Figure 6. Effet de différentes concentrations en sodium (1,2 et 10 mM) sur les longueurs de la tige et de la racine la plus longue et sur le nombre de paires de feuilles chez des plantules d'*Atriplex halimus.*

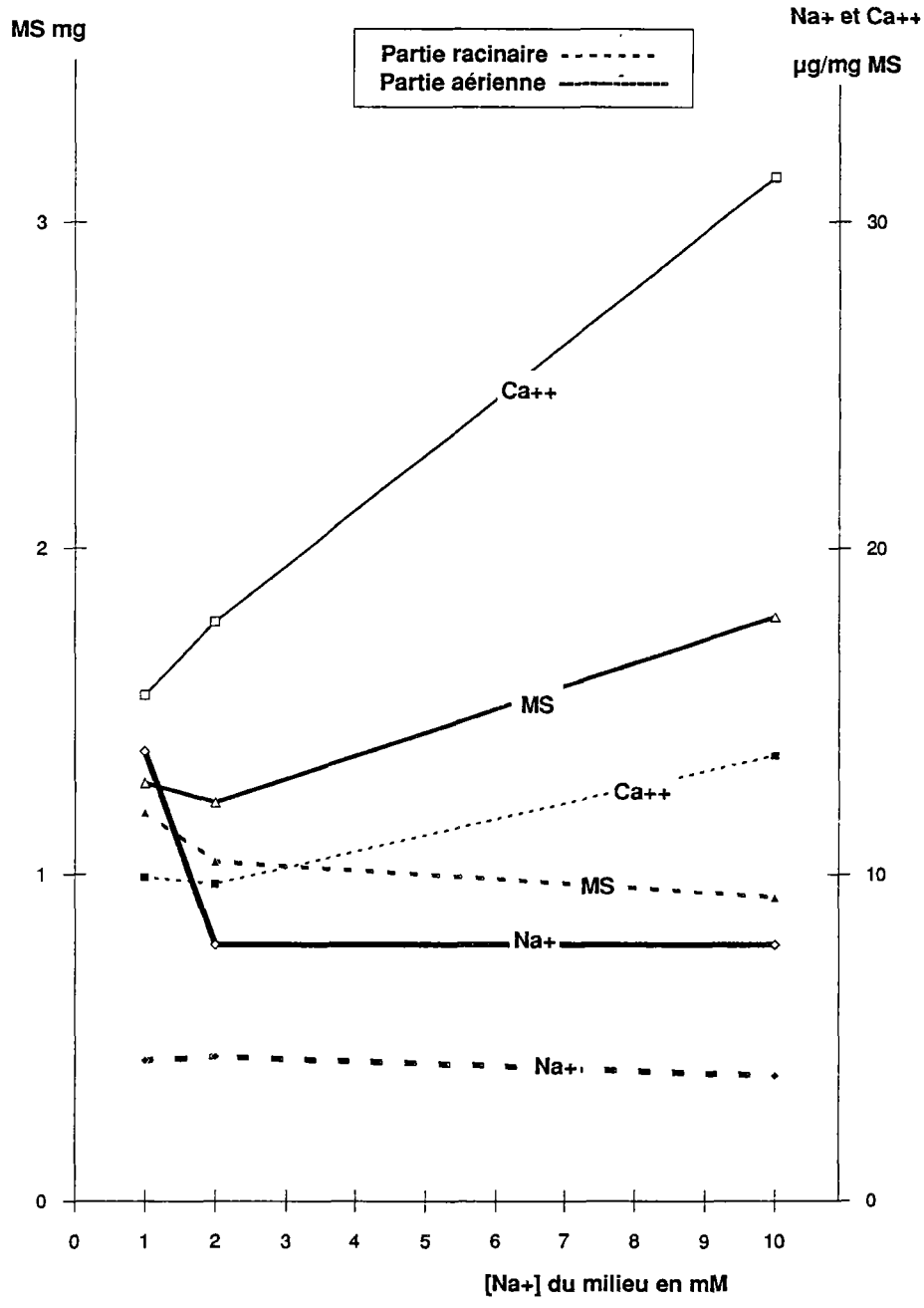


Figure 7. Effet de différentes concentrations en sodium (1,2 et 10 mM) sur le poids de matière sèche et les concentrations en calcium et en sodium des tissus des parties aériennes et racinaires chez des plantules d'*Atriplex halimus.*

Discussion et conclusion

Les résultats montrent que le principal événement est la stimulation des paramètres biométriques quand la concentration de Ca^{++} est doublée et la concentration du sodium inchangée (dans ce cas-là, le rapport Na^+/Ca^{++} varie de 2 à 1). Cela est exact pour toutes les concentrations testées entre 0,1 et 1mM. Un autre phénomène significatif est la diminution de ces mêmes paramètres quand intervient un deuxième doublement de la concentration de calcium (le rapport Na^+/Ca^{++} variant de 1 à 0,5). Ces mêmes résultats montrent que la variation de concentration de Na^+ influe légèrement sur les paramètres comparativement aux effets induits par les variations du rapport Na^+/Ca^{++}.

Afin d'expliquer la reproductibilité de ces phénomènes observés entre 0,1 et 1,0 mM de sodium et la significativité statistique des résultats, nous devons tenir compte du fait que les différences morphogénétiques sont induites par de très faibles variations des concentrations du sodium et du calcium (environ 0,1 mM). Les concentrations utilisées usuellement dans les études sur les halophytes sont beaucoup plus élevées [3, 5, 8]. Par exemple, la longueur de la tige présente une différence de 85 % entre la moyenne la plus faible (1,46 cm) et la plus forte (2,71 cm) obtenue par une augmentation des concentrations de Na^+ et de Ca^{++} de 0,38 mM et de 0,53 mM respectivement (Figure 2). La moyenne la plus faible a été obtenue avec un rapport Na^+/Ca^{++} de 2 et la plus forte avec un rapport de 1.

Mozafar *et al.* [6] ont observé, sur l'*Atriplex halimus* cultivé sur des solutions nutritives avec différents rapports de concentrations de Na^+ et K^+, que les meilleurs résultats de croissance étaient obtenus quand le rapport était égal à 1. Cela serait dû à une interaction positive d'ordre biochimique entre ces deux éléments, peut-être en relation avec un équilibre ionique favorable au fonctionnement de certains systèmes enzymatiques.

Des résultats obtenus sur *Atriplex vesicaria* et *A. spongiosa*, cultivés sur des solutions nutritives, montrent que l'absorption du calcium est modifiée par les concentrations en K^+ et Na^+ [8]. Dans le cas d'une autre halophyte (*Suaeda maritima*), il y a compétition dans l'absorption de ces deux éléments [3].

Dans notre système, il semble difficile de penser à un antagonisme entre le sodium et le calcium, dans la mesure où le rapport entre le sodium et le calcium peut provoquer soit une stimulation, soit une décroissance des valeurs des paramètres (Figures 2, 3 et 4).

La sensibilité des systèmes enzymatiques étudiés (enzymes responsables de la fixation de l'azote) aux variations de la concentration de calcium dans le milieu (Figure 5), pourrait être à la base des modifications morphologiques observées. Cette étude préliminaire mérite d'être approfondie et élargie à d'autres enzymes intervenant dans des fonctions vitales de la plante.

Les résultats obtenus avec 1,0, 2,0 et 10,0 mM montrent que bien que la concentration en Na^+ du milieu augmente, le contenu de Na^+ tissulaire reste très stable. En même temps, on observe que les valeurs de tous les paramètres biométriques augmentent. Cette constatation nous conduit à penser qu'il doit y avoir un système de régulation de la concentration du sodium cellulaire, soit au niveau de l'absorption racinaire, soit au niveau des glandes excrétrices [6, 11]. Si on considère que le Ca^{++} se retrouve dans les tissus plus abondamment quand sa concentration augmente dans le milieu, il est possible de penser que c'est le calcium qui favorise la croissance et qu'il pourrait limiter l'entrée du Na^+ au niveau des racines.

Références

1. Benrebiha F, Pourrat Y, Dutuit P (1992). Induction de la callogenèse chez l'*Atriplex halimus* sur des milieux de culture dépourvus d'hormones de croissance. Rôle des éléments minéraux. *Bull Soc Sot Fr,* 139, Lettres bot : 219-222.
2. Boucaud J, Billard JP (1978). Caractérisation de la glutamate déshydrogénase chez une halophyte obligatoire : le *Suaeda maritima* var. *macrocarpa. Physiol Plant* 44 : 31-37.
3. Le Saos J, Binet P (1987). Halophilie et alimentation calcique chez *Suaeda maritima* L. Dum. variété *macrocarpae* Moq. *Oecol Plant* 8 : 127-134.
4. Morel G, Wetmore RH (1951). Fern callus tissue culture. *Am J Bot* 38 : 141-143.
5. Mozafar A, Goodin JR (1970). Vesiculated hairs : a mechanism for salt tolerance in *Atriplex halimus* L., *Plant Physiol* 45 : 62-65.
6. Mozafar A, Goodin JR, Oertli JJ (1970). Sodium and potassium interactions in increasing the salt tolerance of *Atriplex halimus* L. : II Na^+ and K^+ uptake characteristics. *Agron J* 62 : 481-484.
7. Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
8. Osmond CB (1966). Divalent cation absorption and interaction in *Atriplex. Aust J Biol Sci* 19 : 37- 48.
9. Pourrat Y, Dutuit P (1993). Effects of the sodium and calcium concentrations on the *in vitro* growth of *Atriplex halimus* L. plantlets. *J Plant Nutr* 16, (8) : 1417-1429.
10. Snedecor GW, Cochran WG (1984). Méthodes statistiques. Association de coordination technique agricole ed. (Paris), 6^e édition, 649 p.
11. Uchiyama Y (1987). Salt tolerance of *Atriplex nummularia. Technical Bulletin of Tropical Agriculture Research Center* (Japan), 22 : 69 p.

PARTIE IV

Les haploïdes et l'amélioration des plantes

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 299-303.

31

Contrôle nucléaire et cytoplasmique de la régénération haploïde chez les blés tétraploïdes

A. SARRAFI, M. GHAEMI, N. AMRANI, G. ALIBERT

Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), INP/ENSAT EA DRED 832, 145, avenue de Muret, 31076 Toulouse, France.

Résumé

Le contrôle nucléaire et cytoplasmique de la régénération haploïde par l'androgenèse et par le croisement « blé × maïs » a été déterminé chez 2 génotypes de blé tétraploïde d'origines très éloignées, leurs deux lignées alloplasmiques, et 2 lignées résistantes et sensibles au froid. Le dispositif expérimental consiste en un essai en blocs randomisés avec 4 répétitions, chacune comprenant 2 pots de 3 plantes. Le milieu d'induction concernant l'androgenèse est le milieu « potato-2 » additionné de 0,5 g/l de glutamine, et celui de régénération le milieu « R8 ». Pour le croisement « blé × maïs », les embryons sont mis en culture sur le milieu Difco Orchid Agar additionné de 4 g/l de saccharose. Les résultats concernant l'étude d'un minimum de 1 000 anthères par génotype pour l'androgenèse, et environ 420 fleurs émasculées et pollinisées par le maïs (Seneca 60) par génotype montrent des effets nucléaires et cytoplasmiques, ainsi qu'une interaction nucléo-cytoplasmique pour les deux haplométhodes utilisées. Le fait que certains génotypes répondent seulement à une méthode, et certains autres aux deux permet de penser qu'il existe un système de contrôle génétique différent pour les deux haplométhodes utilisées.

Les haploïdes doublés (HD) ont une importance considérable en amélioration des plantes. L'obtention d'une structure homozygote (HD) en une seule étape permet une réduction de temps appréciable pour la sélection.

Les méthodes d'haploïdisation couramment utilisées chez le blé tendre sont : l'androgenèse [18, 3] et le croisement « blé × maïs » [9].

L'amélioration de la culture *in vitro* des anthères a pour conséquence une augmentation importante du nombre d'haploïdes produits [13, 2, 6, 20]. Cependant, pour le blé tétraploïde, la situation est plus complexe. En effet, la régénération des embryons peut soit être bloquée, soit donner des albinos ou très peu de plantules chlorophylliennes [19, 4]. Les problèmes rencontrés rendent cette technique inapplicable à l'amélioration de cette espèce.

L'obtention des haploïdes peut se faire également par le croisement « blé × maïs ». Le maïs est insensible aux actions des gènes de blé « Krl » et « Kr2 » responsables de l'incompatibilité de fécondation [17, 7]. En effet, après la fécondation, dès les premières divisions cellulaires, les chromosomes de maïs sont éliminés aboutissant à la formation des embryons haploïdes [8]. Cette technique reste inefficace pour le blé tétraploïde puisque les embryons obtenus ne régénèrent pas [12].

Au cours d'un ensemble de travaux de recherche, nous avons tenté de déterminer le contrôle nucléaire et cytoplasmique de la régénération haploïde par l'androgenèse et le croisement « blé × maïs » chez quelques génotypes de blé tétraploïde d'origines très éloignées. Ces deux méthodes sont celles qui sont les plus utilisées pour la production des plantes haploïdes chez le blé hexaploïde.

Matériels et méthodes

Les 6 génotypes de blé dur utilisés dans nos expérimentations sont les suivants :

– ENSAT-508 : une lignée d'origine éthiopienne à grains très riches en protéines [16].

– Opale : une variété créée dans notre laboratoire avec le cytoplasme d'un blé hexaploïde [15].

– « 508-Opale » et « Opale-508 » : deux lignées alloplasmiques provenant de backcross réciproques à partir de l'hybride F1 « ENSAT-508 × Opale », créées dans notre laboratoire.

– ENSAT 2 et ENSAT 3 : des lignées pures, respectivement résistantes et très sensibles au froid.

Le maïs utilisé pour les croisements est l'hybride F1 « Seneca 60 ». Après 6 semaines de vernalisation à 2 °C ± 1, les grains de blé sont semés en pot dans une serre contrôlée (température 25 °C/15 °C jour/nuit, et 16 h de photopériode).

Le dispositif expérimental est un essai en blocs randomisés avec 4 répétitions, et chaque répétition comprend 2 pots de 3 plantes. Dans les expérimentations concernant l'androgenèse, un minimum de 1 000 anthères par génotype a été mis en culture sur le milieu « potato-2 » additionné de 0,5 g/l de glutamine puis incubé à la lumière à 26 °C.

Pour ce qui concerne les croisements « Blé × Maïs », environ 420 fleurs ont été émasculées et pollinisées pour chaque génotype par le pollen de maïs. Un traitement par une solution de 2,4-D (10 mg/l) a été appliqué dans les fleurs 24 h après la pollinisation. Deux ou trois semaines après le traitement, les embryons sont mis en culture sur le milieu Difco Orchid Agar additionné de 4 g/l de saccharose puis incubés à l'obscurité à 20 °C ± 1.

Les embryons provenant de l'androgenèse sont mis sur le milieu « R8 » [5]. Toutes les cultures d'embryons ont été incubées à 25 °C ± 1 avec une photopériode de 16 h.

Une analyse de variance est réalisée sur les données transformées en Arcsin $\sqrt{x}$. Le test de Newman-Keuls est utilisé pour la comparaison des moyennes des paramètres suivants :

- embryons formés pour 100 épis (E/100 EP),
- embryons formés pour 100 épis embryogènes (E/100 EPE),
- plantules vertes pour 100 épis (PV/100 EP),
- ovaires développés pour 100 fleurs pollinisées (OD/100 FP),
- plantules vertes pour 100 embryons (PV/100 E).

Résultats et discussion

L'analyse de variance des données transformées en Arcsin $\sqrt{x}$ concernant les deux expérimentations révèle l'existence d'un effet génotype pour certains paramètres étudiés.

Le test de Newman-Keuls a permis une comparaison des moyennes pour les caractères étudiés (Tableau I).

Dans le cas du croisement « blé × maïs », l'étude des lignées alloplasmiques révèle l'existence d'une différence significative entre ENSAT-508 et Opale avec un supériorité de « Opale » sur « ENSAT-508 », quel que soit le caractère étudié (Tableau I). La lignée « 508-Opale » avec le cytoplasme de « ENSAT-508 » et le noyau de « Opale » dépasse les deux génotypes « ENSAT-508 » et « Opale » alors que « Opale-508 » a une valeur intermédiaire entre ces mêmes génotypes.

Tableau I. Résultats obtenus dans le croisement « blé × maïs » et dans l'androgenèse pour 3 caractères étudiés.

	Croisement « blé × maïs »			Androgenèse		
Génotypes	**OD/100 FP**	**PV/100 EP**	**PV/100 E**	**E/100 EP**	**E/100 EPE**	**PV/100 EP**
Opale	42,41 cde	4,34	6,66	8,152 def	20,25 cde	0
ENSAT-508	22,59 e	0	0	40,44 bc	51,84 abc	1
OP-508	38,12 de	0	0	45,17 b	60,22 abc	1
508-Op	46,96 bcde	7,69	50	23,72 bcd	36,95 cde	0
ENSAT 2	68,76 abc	0	0	0	0	0
ENSAT 3	73,28 ab	10,34	12,50	40,28 bc	79,07 abc	3

Les moyennes suivies des différentes lettres sont significativement différentes au seuil de p = 0,05.
OD / 100 FP : ovaires développés pour 100 fleurs pollinisées.
PV / 100 EP : plantes vertes pour 100 épis.
PV / 100 E : plantules vertes pour 100 embryons.
E / 100 EP : embryons formés pour 100 épis.
E / 100 EPE : embryons formés pour 100 épis embryogènes.

On en déduit qu'il existe un effet favorable du noyau de « Opale » avec une interaction favorable de ce noyau avec le cytoplasme de « ENSAT-508 » pour le nombre d'ovaires développés pour 100 fleurs pollinisées et le nombre de plantules vertes obtenues pour 100 épis.

« ENSAT 3 » est le génotype le plus performant suivi de « ENSAT 2 » pour le nombre d'ovaires développés pour 100 fleurs pollinisées (OD/100 FP). Seuls « ENSAT 3 » et la lignée alloplasmique « 508-Opale » et « Opale » ont produit des plantules vertes (10,34-7,69 et 4,34 pour cent épis ou 12,56-50 et 6,66 pour cent embryons formés respectivement).

Dans le cas de l'androgenèse, la comparaison des moyennes des lignées alloplasmiques met en évidence la supériorité de « ENSAT-508 » par rapport à « Opale » pour le nombre d'embryons formés pour 100 épis (E/100 EP) ainsi que le nombre d'embryons formés pour 100 épis embryogènes (E/100 EPE). Pour les mêmes paramètres, la lignée alloplasmique « Opale-508 » est plus performante et « 508-Opale » a une valeur intermédiaire par rapport au parent. Ces résultats montrent l'existence d'un effet nucléaire favorable de « ENSAT-508 » et une interaction positive entre le noyau de « ENSAT-508 » et le cytoplasme de « Opale ». « ENSAT 3 » est le génotype le plus performant alors qu'« ENSAT 2 » est récalcitrant à l'androgenèse. Des plantules vertes en faible quantité ont été produites par « ENSAT 3 », la lignée alloplasmique « Opale-508 » et « ENSAT-508 ».

L'ensemble de nos résultats montre l'existence des effets nucléaires et cytoplasmiques ainsi qu'une interaction nucléo-cytoplasmique pour les deux haplométhodes utilisées. Ces effets ont été démontrés également par Bercraft et Taylor [1] et Sagi et Barnabas [14] chez les blés hexaploïdes.

Le fait que certains génotypes répondent à une méthode (ENSAT-508 à l'androgenèse et Opale au croisement « blé × maïs ») ou aux deux méthodes (ENSAT 3) prouve qu'il existe un contrôle génétique d'obtention d'haploïdes différent pour les deux systèmes. Pour ce qui concerne la lignée « ENSAT 2 », on peut remarquer l'absence totale d'aptitude à l'androgenèse.

Nous constatons également une variabilité génétique très importante en fonction des deux haplométhodes chez les génotypes étudiés. La variabilité génétique des variétés de blé hexaploïde pour les paramètres androgénétiques a déjà été démontrée par Lazar *et al.* [11] et pour le croisement « blé × maïs » par Laurie et Reymondie [10].

Le taux de plantules vertes obtenu pour un génotype répondant aux 2 systèmes tel que « ENSAT 3 » est nettement plus élevé par le croisement « blé × maïs ». Cependant, d'autres génotypes (« ENSAT-508 » et « Opale-508 ») produisent des plantules vertes mais en plus faible quantité que par androgenèse. Ces résultats rendent difficile la comparaison de ces 2 méthodes quant à leur efficacité en production des plantules vertes.

Nous remercions le Conseil Régional de Midi-Pyrénées (N/Réf. : RECH/9200924) et la société Caussade Semences pour le financement de ce projet.

Références

1. Becraft PW, Taylor GA (1989). Effects of nucleus, cytoplasm and male sterile nucleus-cytoplasm combinations on callus initiation in anther culture of wheat. *Euphytica* 44 : 235-240.
2. Chuang CC, Ouyang TW, Chia H, Chou SM, Ching CK (1978). A set of potato media for wheat anther culture. In : Proc Symp Plant Tissue Culture. Science press, Beijing : 51-56.
3. Foroughi-Wehr B, Wenzel G (1990). Recurrent selection alternating with haploid steps. A rapid breeding procedure for combining agronomic traits in inbreeders. *Theor Appl Genet* 80 : 564-568.

4. Foroughi-Wehr B, Zeller FJ (1990). *In vitro* microspore reaction of different german wheat cultivars. *Theor Appl Genet* 79 : 77-80.
5. Henry Y, De Buyser J (1980). Androgenèse sur des blés tendres en cours de sélection. 2. L'obtention des grains. 2. *Pflanzenzüchtg* 84 : 9-17.
6. Henry Y, De Buyser J (1981). Float culture of wheat anthers. *Theor Appl Genet* 60 : 77-79.
7. Inagaki Tahir MM (1990). Comparison of haploid production frequencies in wheat varieties crossed with *Hordeum bulbosum* L. and maize. *Jpn J Breed* 40 : 209-216.
8. Laurie DA, Bennett MD (1986). Wheat × maize hybridization. *Can J Genet Cytol* 28 : 313-316.
9. Laurie DA, Bennett MD (1988). The production of haploid wheat plants from wheat × maize crosses. *Theor Appl Genet* 76 : 393-397.
10. Laurie DA, Reymondie S (1991). High frequencies of fertilization and haploid seedling production in crosses between commercial hexaploid wheat varieties and maize. *Plant Breeding* 106 : 182-189.
11. Lazar MD, Schaeffer GW, Baenziger PS (1990). The effects of interactions of culture environment with genotype on wheat *Triticum aestivum* anther culture response. *Plant Cell Rep* 8 : 525-529.
12. O'Donoughue LS, Bennett MD (1988). Wide hybridization between relatives of bread wheat and maize. In : Miller TE, Koebner PMD, eds. Proc. Seventh. Int. Wheat Genet. Symp : 397-402. Institute of Plant Science Research, Cambridge, UK.
13. Picard E, De Buyser J (1977). High production of embryoids in anther culture of pollen derived homozygous spring wheat. *Ann Amelior Plant* 27 : 483-488.
14. Sagi L, Barnabas B (1989). Evidence for cytoplasmic control of *in vitro* microspore embryogenesis in the anther culture of wheat *Triticum aestivum* L. *Theor Appl Genet* 78 : 867-872.
15. Sarrafi A, Ecochard R, Planchon C (1984). Genetic gain for some agronomical and physiological characters in F5 lines issued from crosses between tetraploid wheats. In : Geiger HH, Ruckenbauer P, eds. Biometrics in Plant Breeding. Proc Fifth Eucarpia Meeting, Univ. Hohenheim. Vortr. Pflanzenzuchtg 7 : 112-119.
16. Sarrafi A, Ecochard R, Grignac P (1989). Genetic variability for some grain quality characters in tetraploid wheat. *Plant Varieties and Seeds* 2 : 163-169.
17. Snape JW, Chapman V, Mess J, Blanchard CE, Miller TE (1979). The crossabilities of wheat varieties with *Hordeum bulbosum. Heredity* 42 : 291-298.
18. Zhang LJ, Anceau C, Lepoivre P, Seilleur P, Semal J (1987). An efficient method for the regeneration of wheat *(Triticum aestivum)* from anther cultures. *Bull Rech Agron* Gembloux, 22 : 301-314.
19. Zhu ZQ, Wang JJ, Sun JS (1979). The introduction of the albinos pollen plants and preliminary observation of their ploidy in *Triticum durum. Acta Bot Sin* 21 : 295-298.
20. Zhuang JJ, Xu J (1983). Increasing differenciation frequencies in wheat pollen callus. In : Hu H, Vega MR, eds. *Cell and Tissue culture.* Techniques for cereal crop improvement. Science press, Beijing : 431-432.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 305-309.

32

Effet du milieu de culture d'anthères sur l'androgenèse du blé tétraploïde *Triticum turgidum* var.

M. GHAEMI, A. SARRAFI

Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), INP/ENSAT, EA DRED 832, 145, avenue de Muret, 31076 Toulouse, France.

Résumé

L'androgenèse chez le blé dur pose des difficultés majeures et le faible taux de régénération chlorophyllienne reste l'obstacle principal et rend cette technique inapplicable à la sélection de cette espèce. Une expérimentation a été réalisée afin de tester l'effet de 2 substances : l'acide phényl acétique (APA) avec 3 doses différentes (2,5 et 10 mg/l), et l'ancymidol avec 2 doses différentes (0,5 et 1 mg/l), sur l'aptitude à l'androgenèse d'un génotype de blé dur : ENSAT-508 sélectionné par nos travaux précédents. D'après les résultats obtenus, l'utilisation de l'APA à 2 mg/l a permis une augmentation du taux d'embryon par rapport au témoin. Aucune amélioration de régénération verte n'est observée. Les traitements par ancymidol aux doses employées se sont révélés inefficaces.

La production des plantes haploïdes par culture d'anthères offre plusieurs avantages aux améliorateurs de plantes. En effet, l'androgenèse est un moyen de production rapide des lignées homozygotes, pour la création variétale [5, 7].

Le succès de cette technique a été déjà démontré pour le blé hexaploïde *Triticum aestivum* L. [4, 11]. En ce qui concerne le blé tétraploïde *Triticum turgidum* var., l'étape de la régénération des embryons reste l'obstacle majeur. Le développement des embryons est soit bloqué [8], soit donne des plantes albinos [18] et enfin peut aboutir à la forma-

tion d'un faible taux de plantes chlorophylliennes [9, 10]. Plusieurs approches sont utilisées pour améliorer le rendement de l'androgenèse chez le blé tendre : optimisation des conditions de cultures de plantes mères [15], de milieu de culture d'anthères [17] et enfin sélection des génotypes élites par l'étude de la variabilité génétique [2].

Pour ce qui concerne le milieu de culture d'anthères, Ziaudin *et al.* [19] ont trouvé un effet bénéfique de l'acide phényl acétique (APA) sur la régénération verte chez le blé tendre. D'autre part, chez l'asperge, Feng et Wolyn [6] ont réussi à augmenter le taux de régénération des embryons par utilisation de l'ancymidol (substance antigibberellique).

Chez le blé dur, le problème principal reste la régénération des embryons en plantules vertes.

Le but de notre étude consiste à tester l'influence d'APA et de l'ancymidol sur l'androgenèse d'une lignée de blé dur : ENSAT-508 sélectionnée par nos travaux précédents [9].

Matériels et méthodes

Le matériel végétal utilisé dans notre expérimentation est la lignée ENSAT-508, un blé tétraploïde d'origine éthiopienne ayant des grains avec une teneur très élevée en protéines [16].

Les grains germés de cette lignée sont vernalisés pendant six semaines à 2 °C ± 1 dans un réfrigérateur. Les grains germés ainsi obtenus sont semés dans des pots de 18 cm de diamètre contenant un mélange de terreau et du sable (3 : 1) et placés dans une serre contrôlée (la photopériode : 16 h et la température : 25° C le jour et 15 °C la nuit). L'essai comprend 4 répétitions disposées en blocs randomisés. Chaque répétition est composée d'un pot de 3 plantes. Le premier et le deuxième épis de chaque plante sont utilisés pour la culture d'anthères. Les épis sont prélevés au moment où la majorité des microspores sont au stade uninucléé. Les épis prélevés sont entourés de sopalin humide et de papier aluminium, mis dans des bocaux contenant de l'eau, puis placés dans un réfrigérateur à 4 °C ± 1, à l'obscurité pendant 7 jours. Avant la mise en culture des anthères, les épis sont désinfectés par une solution d'hypochlorite de sodium 10 % (v/v) pendant 7 mn. Le milieu de base utilisé est le milieu pomme de terre [3] modifié par addition de 0,5 g/l de glutamine [13] et solidifié par Gelrite (4g/l). Cinq traitements différents ayant pour base le milieu pomme de terre sont testés. Les 3 premiers contiennent l'acide phenyl acétique (APA) à trois concentrations différentes : 2, 5 et 10 mg/l, deux autres traitements ont l'ancymidol à deux concentrations de 0,5 et 1 mg/l et enfin le milieu témoin, sans addition d'aucune substance.

APA et ancymidol sont additionnés au milieu de base après autoclavage par filtration à travers des filtres de 22 µm. Les boîtes de culture contenant environ 40 anthères provenant d'un épi sont incubées à l'obscurité à 28 °C dans un incubateur.

Approximativement, 1 000 anthères par traitement ont été mises en culture. 30 à 40 jours après la mise en culture des anthères, les embryoïdes sont comptés et transférés sur le milieu de régénération « R8 » [12] puis exposés à la lumière (photopériode de 16 h à 26 °C ± 1). Toutes les données ont été transformées en Arcsin $\sqrt{x}$ afin de normaliser leur distribution. Une analyse de variance a été effectuée afin de déterminer l'effet des différents traitements. Le test de Newman-Keuls est utilisé pour la comparaison des moyennes des paramètres suivants :

– épis embryogènes représentant le nombre d'épis donnant au moins un embryoïde pour cent épis (EE/100 E),
– nombre d'embryoïdes pour cent anthères (E/100 A),
– régénération totale (verte + albinos) pour cent anthères (RT/100 A).

Résultats et discussion

L'analyse de variance révèle l'existence d'une différence significative entre les différents traitements pour les paramètres étudiés tandis que l'effet de blocs n'est pas significatif (Tableau I). La comparaison des moyennes des différents traitements est représentée dans le Tableau II. A partir de ce tableau, nous pouvons dégager les informations suivantes :

– pour le nombre d'épis embryogènes pour 100 épis (EE/100 E), aucun traitement ne s'est révélé efficace. En revanche, l'utilisation de 2 mg/l d'acide phényl acétique (APA) a permis une augmentation du nombre d'embryoïdes pour 100 anthères (E/100 A) par rapport au témoin, alors qu'il n'entraîne aucune amélioration quant à la régénération chlorophyllienne. L'indépendance des 2 phases de l'androgenèse, embryogenèse et régénération haploïde, confirme les résultats de Agache *et al.*, [1]. L'effet bénéfique de cet auxine a été démontré par Ziaudin *et al.* [19] sur la régénération verte du blé et de l'orge. La dose de 10 mg/l semble être un seuil toxique pour l'embryogenèse de l'ENSAT-508 ; en effet 10 mg/l de l'APA provoque une diminution du taux d'épis embryogènes entraînant une chute du nombre d'embryoïdes.

L'utilisation d'ancymidol à 0,5 mg/l ne s'est pas révélée efficace pour l'embryogenèse et une dose de 1 mg/l diminue la totalité des paramètres d'androgenèse étudiés par rapport au témoin. Chez l'asperge, en augmentant la fréquence des embryons bipolaires, l'ancymidol améliore le rendement des plantes haploïdes [6]. Le taux de la régénération total (verte et albinos) n'est amélioré par aucun traitement.

L'ensemble de nos résultats nous permet de conclure que l'acide phényl acétique (APA) utilisé à faible concentration (2 mg/l) a un effet favorable sur l'embryogenèse de l'ENSAT-508. D'autres investigations sont nécessaires afin d'améliorer la régénération des embryons haploïdes chez le blé dur. L'utilisation de l'APA sur d'autres génotypes de blé dur est à envisager.

Tableau I. Carré moyen de l'analyse de variance des paramètres androgénétiques (données transformées en Arc sin $\sqrt{x}$) de la lignée ENSAT-508.

Sources de variation	dd1	EE/100 E	E/100 A	RT/100 A
Traitements	5	622.44***	108.77***	22.01***
Blocs	3	38.16 NS	1.41 NS	1.37 NS
Résiduelle	15	73.06	2.85	1.12

*** : significant au seuil de 0.001.
NS : non significatif.

Tableau II. Effet de divers traitements sur les paramètres de l'androgenèse chez la lignée ENSAT-508.

Traitement	EE/100 E	E/100 A	RT/100 A	PV/100 A	PA/100 A
Témoin	58.33 a	2.01 b	0.47 a	0.18	0.27
APA 2 mg/l	54.16 a	10.53 a	0.38 b	0.19	0.19
APA 5 mg/l	54.16 a	2.69 b	0.61 a	0.11	0.5
APA 10 mg/l	20.82 b	1.29 c	0.5 b	0	0.5
Ancymidol 0,5 mg/l	62.49 a	2.31 b	0 c	0	0
Ancymidol 1 mg/l	16.66 b	0.73 d	0 c	0	0

EE/100E : Épis embryogènes pour 100 épis.
E/100A · Embryoïdes pour 100 anthères.
RT/100 : Régénération totale pour 100 anthères.
PV/100A : Plantules vertes pour 100 anthères.
PA/100A : Plantules albinos pour 100 anthères.
APA : Acide phényl acétique.
Les moyennes (correspondant aux valeurs réelles) ayant la même lettre ne présentent pas une différence significative (test de Newman et Keuls).

Nous remercions le Conseil Régional de Midi-Pyrénées (N/Réf. : RECH/9200924) et la société Caussade Semences pour le financement de ce projet.

Références

1. Agache S, De Buyser J, Henri Y, Snape JW (1988). Studies of the genetic relationship between anther culture and somatic tissue culture abilities in wheat. *Plant Breeding* 100 : 26-33.
2. Bullock WP, Baenziger PS, Schaeffer GW, Bottiro PJ (1982). Anther culture of wheat *Triticum aestivum* L. FI'S and their reciprocal crosses. *Theor Appl Genet* 62 : 156-159.
3. Chuang CC, Ouyang JW, Chia H, Chou SM, Ching CK (1978). A set of potato media for wheat anther culture. In : Proc Symp Plant Tiss Cult, Peking. Science Press, Peking : 51-56.
4. Dunwell JW (1985). Anther and ovary culture. In : Jones MGJ, ed. *Advances in agricultural biotechnology : cereal tissue and cell. culture.* Martinus Nijhoff Dordrecht : The Netherlands, 1-44.
5. Dunwell JW (1986). Pollen, ovule and embryo culture as tools in plant breeding. In : Withers LA, Alderson PG, eds. *Plant tissue culture and its agricultural application.* Butterworths London : 375-404.
6. Feng XR, Wolyn DJ, 1993. Development of haploid asparagus embryos from liquid cultures of anther derived calli is enhanced by ancymidol. *Plant Cell Rep* 12 : 281-285.
7. Foroughi-Wehr B, Friedt W (1984). Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant *Hordeum vulgare* lines by anther culture. *Theor Appl Genet* 67 : 377-382.
8. Foroughi-Wehr B, Zeller FJ (1990). *In vitro* microspore reaction of different German wheat cultivars. *Theor Appl Genet* 79 : 77-80.
9. Ghaemi M, Sarrafi A, Alibert G (1993). Influence of genotype and culture conditions on the production of embryos from anthers of tetraploid wheat *(Triticum turgidum). Euphytica* 65 : 81-85.
10. Hadwiger MA, Heberle-Bors E (1986). Pollen plant production in *Triticum turgidum.* In : *Genetic manipulation in plant breeding.* Proc Int Symp organized by EUCARPIA. Berlin, Germany : 303-305.

11. Hassawi D, Qi J, Liang GH (1990). Effects of growth regulators and genotype on production of wheat and triticale polyhaploids from anther culture. *Plant Breeding* 104 : 40-45.
12. Henry Y, De Buyser J (1980). Androgenèse sur des blés tendres en cours de sélection. 2. L'obtention des grains. *Pflanzenzüchtung* 84 : 9-17.
13. Henry Y, De Buyser J (1981). Float culture of wheat anthers. *Theor Appl Genet* 60 : 77-79.
14. Liang GH, Xu A, Tang H (1987). Direct generation of wheat haploids *via* anther culture. *Crop Sci* 27 : 336-339.
15. Piri KH, Anceau C, Seilleur P (1989). Amélioration des techniques androgéniques par modification des conditions de croissance des plantes donneuses d'anthères chez *T. aestivum* L. em. THELL. *Bull Rech Agron* Gembloux 24 (2) : 213-217.
16. Sarrafi A, Ecochard R, Grignac P (1989). Genetic variability for some grain quality characters in tetraploid wheats. *Plant varieties and seeds* 2 : 163-169.
17. Zhou H, Konzak CF (1989). Improvement of anther culture methods for haploid production in wheat. *Crop Sci* 29 : 817-821.
18. Zhu ZQ, Wang JJ, Sun JS (1979). The introduction of the albinos pollen plants and preleminary observation of their ploidy in *Triticum durum*. *Acta Bot Sin* 21 : 295-298.
19. Ziaudin C, Marsolais A, Simian E, Kasha KJ (1992). Improved plant regeneration from wheat barley microspore culture using phenyl acetic acide (PAA). *Plant Cell Rep* 11 : 489-498.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 311-320.

33

Sélection *in vitro* de plantes androgénétiques de blé tendre résistantes à la salinité

K.PIRI, C. ANCEAU, S. EL JAAFARI, P. LEPOIVRE, J. SEMAL

Laboratoire de Pathologie végétale, Faculté des Sciences agronomiques, 5030 Gembloux, Belgique.

Résumé

La faisabilité de la sélection in vitro *de plantules androgénétiques de blé tendre, pour leur tolérance au NaCl, a été étudiée en utilisant l'irradiation gamma et la régénération gamétoclonale comme sources de variation. Les anthères ont été prélevées sur des épis de la variété Sabine, irradiés ou non aux rayons gamma. Les cals et les embryoïdes formés à partir des anthères ont été mis en culture sur milieu de régénération, supplémenté ou non avec 0,75 % ou 0,9 % de NaCl. Les cals survivants, ainsi que les plantules vertes régénérées, ont été ensuite transférés sur milieu de régénération, sans NaCl. Onze dihaploïdes R0 ont été obtenus par traitement à la colchicine. Après autofécondation, les descendants R_1 ont été évalués pour leur tolérance au NaCl. Six lignées R_1, sur les 7 étudiées, ont montré une tolérance à la salinité supérieure à celle du témoin Sabine, sur base de la réduction du chlorure de tétrazolium en formazan par les cellules de rondelles foliaires ayant flotté préalablement pendant 24 h sur 1,6 % de NaCl. Les mécanismes de tolérance développés par les lignées androgénétiques ont été analysés au niveau de la génération R2 et apparaissent associés à la vigueur des plantes, à leur capacité à limiter l'accumulation du NaCl dans les tissus photosynthétiques et à une efficacité accrue dans l'utilisation de K^+.*

Les stress environnementaux, dont la salinité, constituent une limitation sérieuse du rendement des cultures en zones arides et semi-arides.

Il existe cependant des indications chez les végétaux d'un potentiel génétique pour

la tolérance aux stress environnementaux, établies sur la base de critères agronomiques tels que le rendement [24]. En particulier, la variabilité manifestée par les espèces apparentées et les variétés, pour la résistance à la salinité, permet d'envisager la sélection de génotypes de blé adaptés au stress salin.

Un programme d'amélioration nécessite l'exploitation d'une variabilité génétique associée à la mise en œuvre de tests permettant un tri à grande échelle des phénotypes recherchés, lesquels seront soumis à des essais de rendement au champ.

Nous analyserons différents mécanismes de résistance à la salinité, ainsi que les méthodes développées pour les sélectionner, en détaillant plus particulièrement la problématique de la sélection *in vitro* et l'analyse des phénotypes obtenus présentant une résistance améliorée à la salinité.

Mécanismes de résistance à la salinité chez les végétaux

La résistance d'une plante à la salinité s'exprime par sa capacité à survivre et à produire dans des conditions de stress salin. Il existe, en la matière, une large gamme de mécanismes qui ne sont pas exclusifs l'un de l'autre, mais qui peuvent se compléter.

Diverses classifications des mécanismes de tolérance au sel ont été élaborées [28]. Les plantes peuvent être groupées à cet égard en 2 catégories principales, sur la base de leur comportement vis-à-vis des stress salins : (1) les halophytes qui tolèrent des concentrations relativement élevées en sel et (2) les glycophytes qui ne tolèrent que des concentrations peu élevées en NaCl.

Mécanismes de tolérance aux sels chez les halophytes

Chez les halophytes, les types les plus tolérants au sel ont une croissance réduite dans des conditions de faible salinité. Cette adaptation leur permet d'absorber de grandes quantités d'ions tout en maintenant la turgescence cellulaire, et en évitant leur toxicité grâce à une compartimentage cellulaire et l'accumulation dans les vacuoles, l'équilibrage osmotique du cytoplasme étant assuré par une synthèse active de composés organiques solubles [8].

Mécanismes de tolérance aux sels chez les glycophytes

• ***Sensibilité à Na^+***

Les glycophytes les plus sensibles au sel restreignent le transport de Na^+ dans les parties aériennes et maintiennent de la sorte des niveaux de sel relativement bas dans les tissus photosynthétiques. D'autres glycophytes tolérants au sel, comme le cotonnier ou l'orge, transportent et accumulent de grandes quantités de Na^+ dans leurs feuilles.

Cette contradiction apparente provient de l'existence de deux comportements distincts concernant la distribution de Na^+ dans les plantes. Les espèces les plus sensibles à la salinité sont incapables de compartimenter Na^+ dans leurs feuilles, de façon à limiter la concentration cytoplasmique de cet ion. Chez ces espèces, la restriction du transport de sel dans les organes aériens correspond à une protection contre NaCl.

Au contraire, les espèces glycophytes relativement tolérantes se caractérisent par un transport de grandes quantités de NaCl dans les feuilles, rendu possible grâce à un bon compartimentage cellulaire du Na^+. Ces deux comportements s'observent notamment chez le blé et les espèces sauvages apparentées.

Certaines espèces de graminées tolérantes au NaCl, comme *Agropyron scirpeum* et

Aegilops searsii, montrent une concentration élevée en sel dans les tissus foliaires, associée à un compartimentage efficace.

Au niveau variétal, une corrélation entre la tolérance au sel et l'aptitude à limiter le transport de Na^+ dans les feuilles existe chez le blé et les triticales : les variétés les plus résistantes sont habituellement celles qui transportent le moins de Na^+ dans leurs feuilles [1].

• ***Sélectivité ionique : efficacité d'utilisation de K^+***

A l'interface racine/sol, l'excès de Na^+ peut limiter l'approvisionnement de la plante en macroéléments essentiels, tels que K^+.

Une composante de la tolérance à la salinité sera donc l'efficacité avec laquelle K^+ est absorbé et utilisé pour les besoins métaboliques. Une grande variabilité se manifeste à cet égard au sein des espèces et des variétés, ce qui permet d'envisager une sélection pour l'efficacité nutritionnelle en présence de Na^+.

Chez le blé et l'orge, une corrélation existe entre la croissance en milieu salin, la vitesse d'absorption de K^+ et son efficacité d'utilisation [7, 24].

Amélioration des plantes pour la résistance à la salinité

Monneveux [17] a proposé une classification des différentes approches utilisées dans la sélection des blés résistants à la sécheresse ; les grandes lignes de cette classification peuvent être transposées à la problématique de la sélection de plantes tolérantes à la salinité.

Approche empirique descriptive

Une première approche, qui peut être appelée « approche empirique », a été largement utilisée par les améliorateurs avec des résultats appréciables ; elle implique la mise en place d'essais multilocaux comme principaux outils de la recherche. Il s'agit d'une approche descriptive, dans la mesure où l'on s'intéresse essentiellement aux rendements obtenus, la plante étant considérée comme une « boîte noire » dont le fonctionnement n'est pas pris en compte, car il est difficile de caractériser biochimiquement un génotype au travers de l'observation d'un caractère phénotypique complexe et de faible héritabilité, comme le rendement.

Approche analytique et explicative

Cette approche consiste à isoler et à étudier individuellement un mécanisme de résistance donné, en précisant les processus biochimiques et biophysiques qui le déterminent et en mettant au point des méthodes simples d'études de ces mécanismes, en vue de rechercher des tests, si possible précoces, applicables en sélection. Ces critères peuvent être utilisés à différents niveaux d'organisation, de la cellule à la plante (Tableau I).

Une catégorie de mécanismes s'adresse à la plante entière : aptitude à la germination ou à la croissance [4, 6], transport ionique et efficacité d'utilisation du K^+ en présence d'excès de NaCl [1, 7], fluorescence de la chlorophylle [5].

Une autre approche repose sur la corrélation entre des paramètres biophysiques ou biochimiques tels que viabilité des cellules, accumulation d'osmorégulateurs [16, 21, 22], induction de protéines spécifiques [21].

La culture *in vitro*, en permettant de contrôler de manière précise les conditions du milieu et de cribler rapidement un grand nombre de cellules dans un espace réduit,

Tableau I. Tests de sélection pour la résistance des plantes à la salinité.

Test relatifs aux caractères de tolérance cellulaire
– résistance protoplasmique
– perméabilité cellulaire
– marqueurs moléculaires
• synthèse de protéines
• accumulation de proline
• accumulation de sucres
Tests s'appliquant à la plante entière
– germination et émergence
– croissance et survie
– transport ionique
• sensibilité à Na^+
• recirculation du Na^+ dans le phloème
• sélectivité ionique
– fluorescence de la chlorophylle

représente une approche privilégiée pour la mise en œuvre de tests de sélection applicables au niveau cellulaire. Ces critères peuvent cependant conduire à une vue partielle et réductionniste du comportement de la plante, en dissociant les mécanismes biochimiques élémentaires des fonctions globales.

La sélection de génotypes résistant à la salinité par culture *in vitro*

Les grandes étapes suivantes doivent être satisfaites lors de la sélection *in vitro* en vue d'obtenir de nouveaux génotypes de végétaux tolérants vis-à-vis d'un agent de stress : 1) création de la variabilité génétique (à cet égard, la variation somaclonale ou gamétoclonale générée par culture *in vitro* peut être combinée avec l'application d'agents mutagènes) ; (2) mise au point d'un protocole de sélection ; (3) suivi de la descendance des plantes sélectionnées, afin de s'assurer de la stabilité du caractère retenu et de l'absence de variations épigénétiques, non transmissibles par voie sexuée.

L'emploi des techniques de culture *in vitro* s'est avéré efficace pour isoler des lignées cellulaires tolérantes à la salinité. Des plantes entières ont été régénérées à partir de ces cellules et la transmission à leur descendance du caractère de tolérance a été confirmée [3, 12, 26]. Cette démarche s'est cependant avérée inadéquate dans certains cas, car la culture de tissus végétaux en présence de NaCl ne reflète pas toujours la complexité des problèmes liés à la salinité et il n'existe pas de corrélation automatique entre le comportement *in vitro* et celui de la plante entière [2].

Chez le blé, des plantes ont été régénérées à partir de lignées cellulaires diploïdes initiées à partir d'embryons matures ou immatures, et sélectionnées pour leur tolérance à NaCl ou à l'eau de mer. La descendance R_1 des plantes régénérées à partir de cals sélectionnés a été cultivée pendant 4 semaines dans une solution hydroponique contenant 0,5 % NaCl ; les plantes obtenues ont montré un taux de survie supérieur à celui du témoin non sélectionné [13].

Création de la variabilité et sélection des génotypes résistants

Nous avons appliqué une pression de sélection en présence de NaCl à des cals issus d'anthères de la variété de blé Sabine, sensible à la salinité.

Notre étude de la variation gamétoclonale induite par la culture d'anthères a porté sur l'analyse de 2 modalités de régénération privilégiant soit l'organogenèse après une phase de callogenèse [27], soit l'embryogenèse selon la technique de Piri *et al.* [19].

La variabilité induite par la culture d'anthères a été évaluée sur base du rapport entre le nombre de cals ou embryoïdes survivants sur milieux de régénération supplémentés en NaCl (0,75 % et 0,9 % globalisés) et le nombre de cals ou embryoïdes mis en culture sur ces milieux sélectifs (Tableau II).

Tableau II. Fréquence des cals et embryoïdes sélectionnés et des plantules vertes régénérées.

Protocole de régénération (a)	Traitements des anthères	Nombre d'anthères cultivées	Nombre de cals ou embryoïdes placés sur le milieu de sélection contenant		% de cals ou embryoïdes survivants sur le milieu de sélection		Nombre de plantules vertes régénérées (b)	
			0,75 % NaCl	0,9 % NaCl	0,75 % NaCl	0,9 % NaCl	0,75 % NaCl	0,9 % NaCl
A	irradiées	492	24	22	8	4	1	0
	non irradiées	680	53	20	14	3	1	0
B	irradiées	550	25	25	4	0	0	0
	non irradiées	586	30	27	3	1	0	0

(a) : Protocole de régénération :
A : cals induits sur le milieu d'induction initiés à partir d'anthères irradiées ou non (rayons gamma à 0,43 krad), après avoir été prélevées sur des épis de plantes cultivées en serre (var. Sabine).
B : embryoïdes induits à partir d'anthères irradiées ou non (rayons gamma à 0,43 krad), prélevées sur des épis de plantes cultivées en serre (var. Sabine).
(b) : nombre de plantes régénérées après transfert des cals ou embryoïdes survivant sur un milieu de régénération ne contenant pas de NaCl.

Nos résultats indiquent que la proportion de cals survivant après sélection sur les milieux de régénération supplémentés en NaCl (0,75 % et 0,9 %), ainsi que le nombre de plantules obtenues, sont plus élevés avec le protocole A (régénération privilégiant l'organogenèse) qu'avec le protocole B (favorisant l'embryogenèse).

Les variations génétiques induites par la culture *in vitro* peuvent être amplifiées par l'application d'agents mutagènes (dont les rayons gamma) sur les tissus haploïdes ou diploïdes. L'application de rayons gamma sur les anthères de riz, avant leur mise en culture, augmente la fréquence des variations affectant des caractères comme la précocité ou la résistance à certaines maladies chez les plantes régénérées [14].

Dans cette perspective, nous avons associé l'application des rayons gamma à la culture *in vitro*, par irradiation des épis de blé avant le prélèvement des anthères.

Il est reconnu que l'irradiation gamma affecte le comportement des tissus cultivés *in vitro*. Chez le blé, des travaux [25] ont montré qu'une irradiation à 0,1 krad, appliquée sur les épis avant la mise en culture des anthères, augmente la fréquence de la première division des microspores ainsi que la formation de structures multicellulaires, sans toutefois modifier le taux de régénération des plantules. Les mêmes auteurs ont

indiqué que, chez le riz, l'irradiation gamma des épis avec une dose de 0,1 krad augmente de 30 % la fréquence de la callogenèse et de la régénération de plantules vertes, par rapport au matériel non irradié. Les doses plus élevées diminuent la division des microspores, la fréquence d'initiation des cals, et le nombre de plantules vertes régénérées. Des effets analogues ont été observés chez le maïs [18] où le traitement des embryons immatures avec 0,5 krad de rayons gamma, avant la mise en culture *in vitro*, augmente la fréquence des cals embryogènes et la régénération des plantules, tandis que le traitement à 1 krad diminue les valeurs de ces deux paramètres.

Dans nos essais, l'irradiation gamma des épis avec 0,107 ou 0,210 krad a augmenté de 40 % la fréquence de callogenèse (ou d'embryogenèse) des anthères cultivées sur les milieux d'induction. Les doses plus élevées d'irradiation gamma des épis diminuent progressivement la fréquence de callogenèse ou d'embryogenèse. Afin de provoquer une quantité importante de mutations, nous avons choisi d'utiliser un traitement gamma de 0,43 krad, qui réduit la callogenèse à partir des anthères, de 40 % à 60 % selon le milieu d'induction utilisé.

Sur la base de la proportion des cals survivants sur le milieu de régénération supplémenté en NaCl (0,75 % et 0,9 % additionnés), l'irradiation des épis de blé induit une variabilité génétique supérieure à celle du matériel non irradié. Cependant, eu égard à l'effet dépressif de l'irradiation des épis sur l'androgenèse, le nombre de plantules vertes régénérées *in fine* à partir des cals sur le milieu de régénération contenant NaCl, n'est pas significativement amélioré par l'irradiation des épis (Tableau III).

En conclusion de nos essais, 12 plantes vertes androgénétiques R0 spontanément diploïdes et fertiles ont été régénérées à partir de cals sur des milieux de régénération contenant 0,75 % ou 0,9 % de NaCl ; 2 proviennent du milieu supplémenté avec 0,9 % et 9 ont été régénérées en présence de 0,75 % de NaCl.

Tableau III. Effet de l'irradiation gamma des épis sur le nombre de plantes sélectionnées pour leur tolérance à la salinité.

Protocole de sélection (a)	Nombre d'anthères déposées sur le milieu d'induction	% d'anthères callogènes	Nombre de cals androgénétiques déposés sur milieu de sélection NaCl			Nombre de plantes régénérées à partir des cals NaCl			Nombre de plantes/ anthères régénérées sur milieu de sélection (b)
			0 %	0,75 %	0,9 %	0 %	0,75 %	0,9 %	
A	5 600	6,8	120	132	130	8	3	1	4
B	6 000	15,6	280	340	320	66	5	1	6

(a) : protocole de sélection.

A : épis irradiés (0,43 krad) après avoir été prélevés sur des plantes (var. Sabine) cultivées au champ.

B : épis non irradiés prélevés sur des plantes (var. Sabine) cultivées au champ.

(b) : nombre total de plantes vertes régénérées à partir des cals survivant sur les milieux de sélection contenant 0,75 % ou 0,9 % de NaCl.

Évaluation de la descendance des lignées androgénétiques sélectionnées

Un caractère sélectionné *in vitro* ne s'exprimant pas nécessairement au niveau des plantes régénérées ou de leur descendance, nous avons évalué la tolérance à la salinité des R_1 obtenus à partir des dihaploïdes. Six lignées R_1 sur 7 ont montré une tolérance à la salinité supérieure à la variété Sabine d'origine, sur la base de la réduction du chlo-

rure de tétrazolium en formazan [11] par les cellules de rondelles foliaires ayant préalablement flotté pendant 24 h sur 1,6 % NaCl.

Après autofécondation des individus R_1, les descendants (R_2) de 5 lignées (1 à 5) ont été cultivés dans des bacs d'hydroponiques contenant la solution de Hoagland additionnée ou non de NaCl (0,9 %). Ces plantes ont été comparées à la variété Sabine d'origine et à une lignée T_3 descendant d'une plante androgénétique provenant de la variété Sabine non soumise à la sélection *in vitro*. La mesure du poids sec des parties aériennes a été effectuée après 16 jours de culture (Figure 1).

Il apparaît qu'en l'absence de NaCl dans le milieu, les lignées sélectionnées 3, 4 et 5, ainsi que la lignée T_3, présentent une croissance plus marquée que la variété Sabine.

En milieu salin, les lignées sélectionnées (à l'exception des lignées 1 et 2) ainsi que la lignée T_3, montrent une plus grande production de matière sèche que Sabine.

La réduction de la croissance en milieu salin, par rapport au témoin sans sel, varie entre 37 % et 45 % pour toutes les lignées étudiées et pour le témoin Sabine. On peut, dès lors, penser que la plus grande tolérance à la salinité développée chez les variants est liée à leur vigueur accrue, ce qui rejoint les résultats obtenus sur pomme de terre (Gutierrez, résultats non publiés).

Afin d'identifier les mécanismes de tolérance développés au cours des protocoles de sélection *in vitro*, nous nous sommes intéressés à l'accumulation des ions Na^+ et K^+, mesurée par spectrophotométrie d'émission de flamme [23]. Les lignées qui maintiennent des niveaux de Na^+ relativement bas sont celles qui, globalement, présentent la meilleure croissance en milieu salin (Figure 2). Ce comportement est propre aux glycophytes et a été observé chez les variétés de blé sélectionnées par hybridation classique.

La deuxième composante nutritionnelle susceptible d'intervenir est l'efficacité avec laquelle le K^+ absorbé est utilisé pour les besoins de la plante. L'efficacité d'utilisation du potassium constitue un paramètre pour lequel on observe une variabilité importante, notamment chez l'orge [9,10]. L'efficacité d'utilisation de K^+ a été définie comme la quantité de biomasse produite par unité de K^+ absorbé [15].

L'application de ce critère montre que la plupart des lignées de blé que nous avons sélectionnées ont une efficacité d'utilisation du potassium significativement plus élevée que Sabine, y compris le variant 1, dont la croissance n'est pas améliorée (Figure 3).

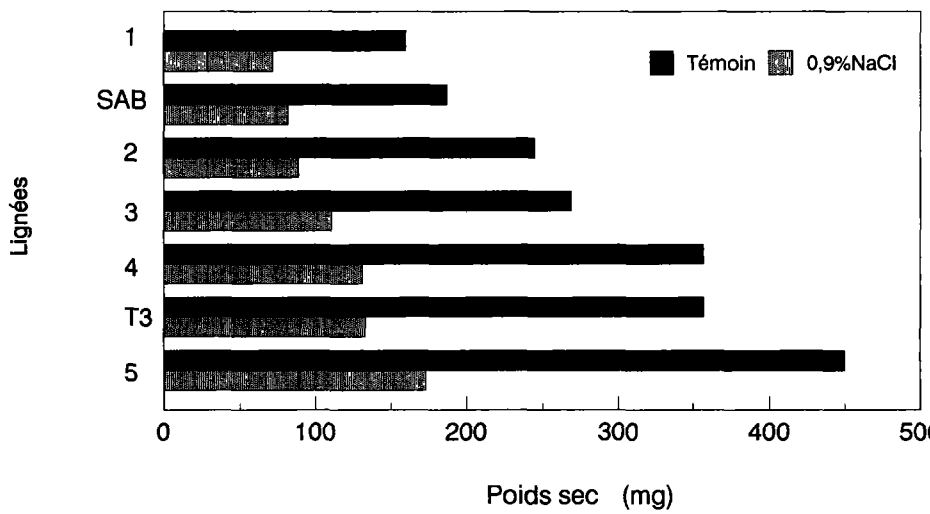


Figure 1. Poids sec de plantes androgénétiques de blé en conditions de stress salin.

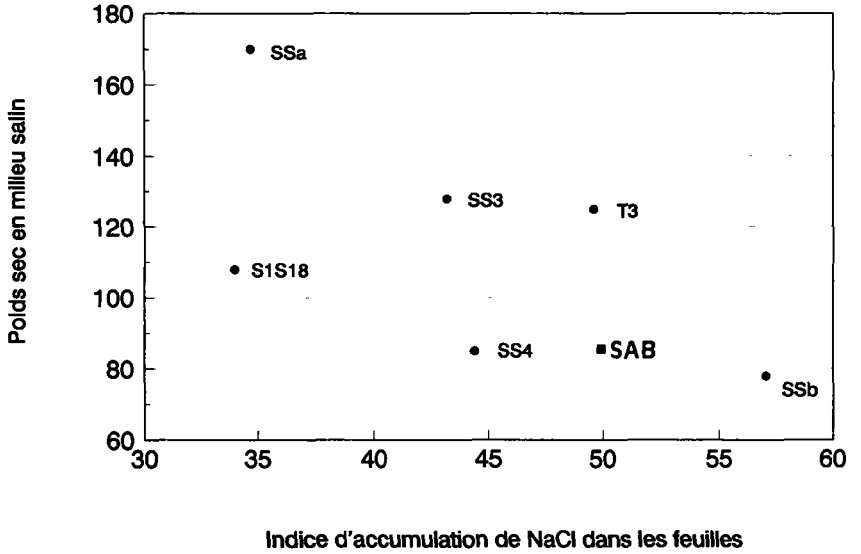


Figure 2. Relation entre le poids sec des feuilles en milieu sain et l'indice d'accumulation de NaCl dans les feuilles.
Indice d'accumulation = rapports des concentrations en NaCl présents dans les feuilles de plantules se développant en milieu salin ou non salin.
S_1S_{18}, SS_a, SS_3, SS_4, SS_b = lignées androgénétiques provenant de plantes regénérées à partir de cals sélectionnés en présence de NaCl.
T_3 = lignée androgénétique provenant d'une plante régénérée à partir d'un cal non sélectionné sur NaCl.
SAB = variété Sabine.

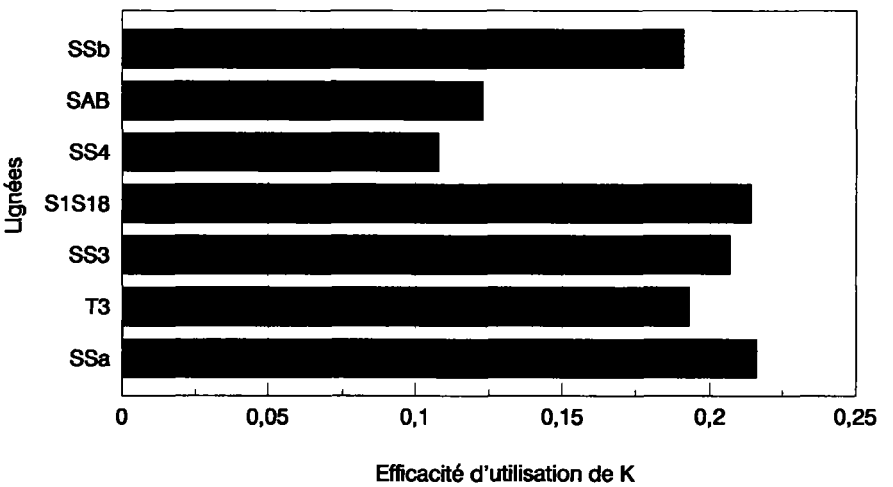


Figure 3. Efficacité d'utilisation du potassium chez les lignées androgénétiques du blé sous stress salin.
Efficacité d'utilisation de K^+ (quantité de biomasse produite par unité de K^+ absorbé) des lignées androgénétiques sélectionnées, comparées à la variété Sabine (SAB).

Conclusion

Par sélection *in vitro* de plantules dihaploïdes issues de culture d'anthères (irradiées ou non aux rayons gamma), en présence de 0,75 % ou 0,9 % de NaCl, nous avons obtenu des lignées plus résistantes au sel que la variété de départ Sabine ayant fourni les épismères. Chez la plupart des lignées, ce caractère a été transmis de façon homogène par autofécondation à la R_1 et à la R_2.

La tolérance à la salinité, développée chez nos variants gamétoclonaux après sélection *in vitro* en présence de NaCl, est liée à une plus grande vigueur des plantes (y compris en l'absence de sel), à une limitation des transferts du sodium vers les tissus photosynthétiques, et à une meilleure efficacité d'utilisation du potassium.

Références

1. Bizid E, Zid E, Grignon C (1988). Tolérance à NaCl et sélectivité K^+/Na^+ chez les triticales. *Agronomie;* 8 : 23-27.
2. Bourgeais P, Guerrier G, Strullu DG (1987). Adaptation au NaCl de *Lycopersicon esculentum :* Étude comparative de cals ou de parties terminales de tiges. *Can J Bot* 65 : 1989-1997.
3. Collin HA, Burton FM, Ibrahim KM, Collins JC (1990). Transmission of salt tolerance from tissue culture to seed progeny in *Coleus blumei.* In : Nijkampa PAH, Vanderplas L, Artrijk J, eds. *Progress in plant cellular and molecular biology.* Abstracts of the VIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam : 151.
4. Dvorak J, Ross K (1986). Expression of tolerance of Na^+, K^+, Mg^+, Cl^- and SO_4^- ions and sea water in the amphiploid of *T. aestivum* L. × *Elytriga elongata* Host. *Crop Sci* 26 : 658-660.
5. El Mekhaoui M (1989). Chlorophyll fluorescence as a predictive test for salt tolerance in cereals. *Rachis,* 8 : 16-19.
6. Forster BP, Miller TE, Lao CN (1988). Salt tolerance of two wheat-*Agropyron junceum* disonic addition lines. *Genome* 30 : 559-564.
7. Glass ADM, Perley JE (1980). Varietal differences in potassium uptake by barley. *Plant Physiol* 65 : 160-164.
8. Greenway E, Munns R (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann Rev Plant Physiol* 31 : 149-190.
9. Jacoby B, Hanson JB (1985). Control of $^{22}Na^+$ influx in corn roots. *Plant Physiol* 77 : 930-934.
10. Jensen P, Petterson S (1980). Varietal variation in uptake and utilization of potassium (rubidium) in high-salt seedlings of barley. *Physiol Plant* 48 : 411-415.
11. Johnston WJ, Yusuf HA, Konsak GF, Naguire JD (1986). Tetrazolium chloride test for spring wheat seedling vigor at low temperatures. *Crop Sci* 26 : 167-169.
12. Kochba ID, Ben-Hayim G, Spiegel-Roy R, Saad S, Newman H (1982). Selection of stable tolerant callus cells lines and embryons. In : *Citrus sinensis* L. and *C. aurantium* L. *Z Pflanzenphysiol* 106 : 11-118.
13. Koradimova MV (1990). Selection for NaCl tolerance in callus of wheat *(T. aestivum* L. and *T. durum* Desf.). In : Nijkampa H, Vanderplas L, Artrijk J, eds. Progress in plant cellular and molecular biology. Abstracts of the VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, 157.
14. Kuo D (1986). Induction of useful mutation by gamma irradiation of anther cultures of rice. *Mutation Breeding Newsletter* 27 : 6.
15. Makmur A, Gerloff GC, Gabelman WH (1978). Physiology and inheritance of efficiency in K^+ utilization in tomatoes grown under K^+ stress. *J Am Hort Sci* 103 : 545-549.

16. Monk RW, Wlebe HH (1961). Salt tolerance and protoplasmic salt hardiness of various woody and herbaceous ornamental plants. *Plant Physiol* 36 : 478-482.
17. Monneveux P (1991). Quelles stratégies pour l'amélioration génétique de la tolérance au déficit hydrique des céréales d'hiver ? In : Chalbi N, Demarly Y, eds. *L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides.* Paris, Aupelf-Uref/John Libbey Eurotext : 165-186.
18. Novak FJT, Hermelin S, Daskalo V, Nestick M (1986). *In vitro* mutagenesis in maize. In : Horn W, Jensen CJ, Odenback W, Schieder O, eds. *Genetic manipulation in plant breeding. de Gruyter.* Berlin : 563-576.
19. Piri K, Anceau C, Seilleur P (1988). Amélioration des techniques androgéniques par modification des conditions de croissance des plantes d'anthères chez *Triticum aestivum* L. *Bull Rech Agro Gembloux*, 24 : 213-217.
20. Ramagopal S (1987). Salinity stress induced tissue. Specific proteins in barley seedlings. *Plant Physiol* 84 : 324-331.
21. Rathert G (1984). Sucrose and starch content of plant parts as a possible indicator for salt tolerance. *Aust J Plant Physiol* 11 : 491-495.
22. Stewart CR, Lee JA (1974). The role of proline accumulation in halophytes. *Planta* 120 : 279-289.
23. Stewart EA, Grimshaw HM, Barkinson JA, Quarmby C (1974). Analysis of vegetation and similar materials. In : *Chemical analysis of ecological materials.* Blackwell Scientific Publications, Oxford : 69-93.
24. Tal M (1984). Physiological genetics salt resistance in higher plants : studies on the level of the whole plant and isolated organs, tissues and cells. In : Steples RC, Toennienssen GA, eds. *Salinity tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement.* Wiley, New York : 301-320.
25. Yin DC, Wei QJ, Yu QC, Wang L (1988). Effect of gamma radiation on anther culture of rice. In : *Proceeding of the International Symposium of Genetic Manipulation in Crops.* Beijing, IRRI, 38-39.
26. Zenk MH (1974). Haploids in physiological and biochemical research. In : Kasha KJ, ed. *Haploids in higher plants : advances and potential.* Ontario, Univ Guelph Press : 339-354.
27. Zhang LJ, Anceau C, Lepoivre P, Seilleur P (1987). An efficient method of regeneration of wheat from anther culture. *Arch Int Physiol Bioch* 96 : B1-70.
28. Zid E, Grignon C (1991). Les tests de sélection précoce pour la résistance des plantes aux stress. Cas des stress salin et hydrique. In : Chalbi N, Demarly Y, eds. *L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides.* Paris, Aupelf-Uref/John Libbey Eurotext : 91-108.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 321-329.

34

Isolement de protoplastes à partir de mésophylle, de cals de feuilles et de cals de racines de *Prunus cerasus* L., var. « Montmorency »

RAOUDHA KAMOUN-MEHRI[1,2], PHILIPPE LEPOIVRE[1], PHILIPPE BOXUS[2]

1. Laboratoire de Phytopathologie, Faculté des Sciences Agronomiques, 5030 Gembloux, Belgique.
2. Station de Recherches des Cultures Fruitières et Maraîchères, 5030 Gembloux, Belgique.

Bien que la technologie des protoplastes fournisse, pour l'amélioration des espèces fruitières, une alternative aux méthodes d'hybridations conventionnelles par la création de nouveaux génotypes : production de variants somaclonaux [8] et d'hybrides somatiques [10], elle reste tributaire de la capacité de ces cellules végétales à régénérer une plante entière. Des systèmes protoplastes-plantes ont été développés pour un grand nombre d'espèces herbacées, alors que pour les ligneux tempérés, les résultats sont limités et récents, les premiers datant de 1986 [7].

L'isolement des protoplastes constitue la première étape de ce protocole et conditionne la réussite de leur culture ultérieure et par conséquent du processus de régénération [1, 2] mais aucune technique d'isolement appliquée à un génotype donné n'est entièrement extrapolable à d'autres espèces ou variétés.

Plusieurs paramètres interviennent dans le processus d'isolement et influencent le rendement et la viabilité des protoplastes dont :

– l'origine et les conditions de prétraitement des tissus utilisés comme source de protoplastes incluant les conditions de leur culture, leur âge, leur état physiologique et le protocole de préparation de ces tissus ;

– la composition des solutions enzymatiques utilisées pour la digestion des tissus et les conditions d'incubation (température, lumière) pendant cette opération.

Chez *Prunus cerasus* L. l'établissement de techniques d'isolement de protoplastes efficaces et reproductibles n'a concerné que 3 porte-greffes clonaux, CAB4D, CAB5H et CAB11E [9] [11]. Le présent travail présente un protocole d'isolement des protoplastes de *Prunus cerasus* L.,var. « Montmorency » à partir de 3 types de tissus : le mésophylle foliaire, des cals de feuilles ou des cals de racines. Les effets du stade physiologique de l'explant, du traitement plasmolysant et du traitement enzymatique sur le rendement, la viabilité et la taille des protoplastes sont étudiés.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Des vitroplants issus de méristèmes de cerisier acide *Prunus cerasus*. L., var. « Montmorency » et micropropagés à la Station de Recherches des Cultures fruitières et maraîchères (Centre de Recherches Agronomiques de Gembloux) ont été utilisés comme source de matériel foliaire et comme explants, pour la production de cals.

Pour un meilleur développement des feuilles, les vitroplants ont été transférés sur le milieu MS_4 constitué de macro-éléments, micro-éléments et vitamines MS [6] additionné de NAA (0,3 mM), BAP (3 mM) et GA_3 (0,13 mM), solidifié avec 0,5 % d'Agar Difco (pH = 5,6). Les cultures ont été maintenues sous une photopériode de 16 heures, à température de 25 ± 1° C. L'énergie lumineuse est de 35 µmol m^{-2} sec^{-1}.

Les cals de feuilles ont été initiés à partir de feuilles bien développées, non vitrifiées, blessées au niveau de la nervure centrale et déposées face supérieure au contact du milieu de callogenèse (MS_3). Ce milieu à base de macro-éléments, micro-éléments et vitamines MS [6] contient NAA (10 mM) et BAP (1 mM) (pH = 5,6).

Les cals de racines ont été initiés, à partir de fragments de racines de 1 à 2 cm de long, sur le même milieu de callogenèse MS_3. Le milieu d'enracinement est constitué de macro-éléments (dilués de moitié) et micro-éléments MS [5] auxquels on ajoute 2 mg/l IBA (pH = 5,3).

Les cals de feuilles ou de racines ainsi obtenus ont été séparés de l'explant et maintenus par repiquages réguliers sur le même milieu MS_3. Les conditions de culture sont les suivantes : photopériode de 16 heures, température de 25 ± 1 °C, et énergie lumineuse de 22 µmol m^{-2} sec^{-1} fournie par des tubes fluorescents *cool white*.

Préparation des protoplastes

Les protoplastes de mésophylle foliaire ont été isolés à partir de feuilles prélevées à différents niveaux des vitroplants (feuilles apicales, médianes et basales) après 10, 30 et 45 jours de culture sur MS_4. Pour les cals de feuilles ou de racines, les protoplastes ont été isolés après 10, 15, 20 et 30 jours de culture sur le milieu MS_4.

Pour tester l'effet de la plasmolyse sur l'isolement de protoplastes, de jeunes feuilles et des cals de feuilles ou de racines ont été finement lacérés et placés à 25° C et à l'obscurité dans la solution plasmolysante CPW [12] additionnée d'un tampon MES 5 mM (acide 2-N morpholino-éthane sulfonique) (pH = 5,6), de 13 % de mannitol et 0,1 M glycine (antioxydant). Cette solution a été préalablement stérilisée par filtration (0,2 µm). L'osmolalité de la solution est de 800 mosmol/kg H_2O.

Les protoplastes isolés ont été dénombrés, leur viabilité déterminée et leur taille

mesurée après 0, 30, 60 et 90 minutes d'incubation des tissus dans le milieu plasmolysant.

Les fragments de limbe foliaire et de cals ont été ensuite transférés dans une solution enzymatique à raison de 1g de poids frais par 10 ml de solution stérilisée par filtration (0,2 µm). Les enzymes (cellulases, hémicellulases et pectinases) utilisées à différentes concentrations ont été dissoutes dans la solution plasmolysante (pH = 5,8) [12]. Les tissus ont été incubés à l'obscurité et à 25 ± 1° C, et soumis à une agitation lente de 40 tours/mn.

Une étude de la cinétique de la libération des protoplastes de mésophylle foliaire, de cals de feuilles et de cals de racines a été réalisée en enregistrant à intervalle de temps régulier le nombre, la viabilité (% de protoplastes fluorescents en présence de diacétate de fluoresceine, FDA) [15] et le diamètre des protoplastes isolés.

A la fin de la phase de digestion, la suspension de protoplastes est filtrée successivement à travers 2 tamis dont les mailles sont respectivement de 100 et 64 µm pour les protoplastes issus de cals de feuilles ou de racines, et à travers un tamis dont les mailles sont de 53 µm pour les protoplastes du mésophylle foliaire. La suspension est lavée avec la solution CPW 13 % de mannitol, puis centrifugée à 120 xg pendant 10 minutes pour les feuilles et à 100 xg pendant 8 minutes pour les cals, afin d'éliminer la solution enzymatique. Deux centrifugations successives sont ensuite effectuées pour la purification des protoplastes [13].

Après l'étape de purification, on procède au comptage et aux mesures de viabilité et de taille des protoplastes [12]. Le nombre de protoplastes par ml de suspension est déterminé sur la lame de Burker et rapporté au poids frais de tissus digérés.

Le diamètre moyen des protoplastes est estimé par la mesure du diamètre de 200 protoplastes à l'aide d'un micromètre oculaire.

Résultats

Les meilleurs résultats en terme de nombre et de viabilité ont été obtenus à partir de mésophylle des feuilles médianes prélevées sur des vitroplants cultivés depuis 10 jours (Tableaux I et II). Le maximum de protoplastes viables a été obtenu à partir de cals, 10 à 15 jours après leur mise en culture (Tableau III).

Tableau I. Effet du niveau d'insertion des feuilles sur le nombre et la viabilité des protoplastes isolés de mésophylle de *Prunus cerasus* L.,var. « Montmorency ».

Niveau d'insertion des feuilles à partir de l'apex	Nombre moyen de protoplastes par g de poids frais	% de protoplastes vivants	Diamètre moyen des protoplastes (µm)
Feuilles apicales	$3,3 \times 10^6$ (0,7)	50 (4,9)	12 (0,9)
Feuilles médianes	$15,2 \times 10^6$ (2,3)	77 (4,5)	15 (1,4)
Feuilles basales	$3,8 \times 10^6$ (0,7)	29 (4)	10 (0,5)

Feuilles de plantules repiquées depuis 10 jours, plasmolysées pendant 1 heure dans CPW et incubées pendant 8 heures dans une solution enzymatique contenant 1 % de cellulase RS, 1 % de hémicellulase et 0,1 % de pectolyase Y-23.
Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions suivies de l'erreur standard.

Tableau II. Effet de l'age des plantules sur le nombre et la viabilité des protoplastes isolés de mésophylle foliaire de *Prunus cerasus* L., var. « Montmorency ».

Nombre de jours après repiquage	Nombre moyen de protoplastes par g de poids frais	% de protoplastes vivants	Diamètre moyen des protoplastes (µm)
10 jours	$15,2 \times 10^6$ (2,3)	77 (4,5)	15 (1,4)
30 jours	$1,5 \times 10^6$ (0,3)	27 (5,8)	11 (0,8)
45 jours	$0,2 \times 10^6$ (0,1)	27 (4,5)	10 (0,9)

Feuilles médianes plasmolysées 1 heure dans CPW 13 % de mannitol et incubées pendant 8 heures dans la solution enzymatique contenant 1 % de cellulase RS, 1 % de hémicellulase et 0,1 % dectolyase Y-23.
Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions suivies de l'erreur standard.

Tableau III. Effet de l'âge des cals de feuilles et de racines sur le rendement et la viabilité des protoplastes isolés de *Prunus cerasus* L.,var. « Montmorency ».

Nombre de jours après repiquage	Types de cals	Nombre moyen de protoplastes par g de poids frais	% de protoplastes vivants	Diamètre moyen des protoplastes (µm)
10 jours	Cf	$3,5 \times 10^6$ (2,7)	86 (3,2)	19 (0,1)
	Cr	$6,8 \times 10^6$ (3,8)	90 (2,6)	28 (0,03)
15 jours	Cf	$2,8 \times 10^6$ (1,1)	52 (3,7)	19 (0,52)
	Cr	$7,9 \times 10^6$ (0,9)	91 (5,4)	28 (0,3)
20 jours	Cf	$0,7 \times 10^6$ (0,2)	49 (0,9)	17 (0,1)
	Cr	$4,9 \times 10^6$ (2,1)	79 (3,6)	25 (0,2)
30 jours	Cf	$0,7 \times 10^6$ (0,5)	20 (0,7)	18 (1,1)
	Cr	$2,1 \times 10^6$ (0,9)	51 (1,8)	25 (0,8)

Cals issus de feuilles (Cf) et cals issus de racines (Cr) incubés pendant 16 heures et à l'obscurité dans la solution enzymatique contenant 2 % de cellulase R-10, 2 % de rhozyme HP-150 et 0,03 % de macérozyme R-10 (pH = 5,8).
Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions suivies de l'erreur standard.

La plasmolyse est une étape améliorant l'isolement des protoplastes de mésophylle foliaire tant en terme de rendement qu'en terme de viabilité (Figure 1) contrairement aux cals chez lesquels ce traitement diminue aussi bien le nombre que la viabilité des protoplastes (Tableau IV). La durée optimale de plasmolyse du mésophylle foliaire est de 1 heure En fin de cette période, les cellules végétales deviennent arrondies et plus volumineuses. Le contenu cellulaire est détaché de la paroi pectocellulosique facilitant ainsi la digestion enzymatique de cette dernière sans altérer le métabolisme de la cellule.

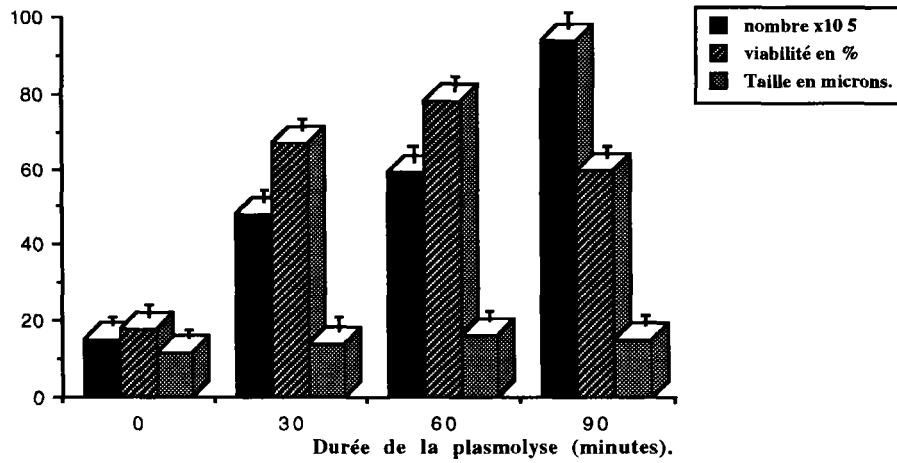


Figure 1. Effet de la durée de la plasmolyse sur le nombre, la viabilité et la taille des protoplastes de mésophylle foliaire de *Prunus cerasus* L., var. « Montmorency ». Les fragments de feuilles ont été plasmolysés dans CPW puis incubés pendant 8 heures dans la solution enzymatique contenant 1 % de cellulase Onozuka RS, 1 % de hémicellulase et 0,1 % de pectolyase Y-23.

Tableau IV. Effet de la plasmolyse sur l'isolement des protoplastes de cals de feuilles et de cals de racines de *Prunus cerasus* L., var. « Montmorency ».

Source	Traitement de plasmolyse	% cellules vivantes des cals avant l'isolement	Nombre moyen/g de matériel végétal	% de protoplastes vivants	Diamètre moyen des protoplastes (µm)
Cals de feuilles (MS3)	Avec	70 %	$1,5 \times 10^6$ (0,3)	46 (1,6)	21 (0,1)
	Sans		$3,5 \times 10^6$ (3,4)	86 (5,1)	19 (0,4)
Cals de racines (MS3)	Avec	80 %	$6,4 \times 10^6$ (7,3)	79 (2,8)	27 (0,01)
	Sans		$7,9 \times 10^6$ (1,9)	91 (3,8)	28 (0,2)

Plasmolyse des cals 1 heure dans CPW et incubation de 16 heures dans la solution enzymatique contenant 2 % de cellulase Onozuka R-10, 2 % de rhozyme HP-150 et 0,03 % de macérozyme R-10.
Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions suivies de l'erreur standard.

La solution enzymatique composée de 1 % de cellulase Onozuka RS, 1 % de hemicellulase et 0,1 % de pectolyase Y-23 a permis l'obtention de 15×10^6 protoplastes/g de feuilles avec une viabilité de 78 %. En remplaçant 1 % de cellulase RS par la même concentration de cellulase R-10, le rendement n'est plus que de $5,5 \times 10^6$ de protoplastes avec 59 % de viabilité (Tableau V). L'utilisation de la macérozyme à 1 % comme pectinase a permis l'obtention d'un rendement de $2,3 \times 10^6$ de protoplastes

avec une viabilité de 49 %. Le rendement maximum de 3,5 × 10 ^{6} et 8 × 10 ^{6} de protoplastes par g de cals de feuilles et de cals de racines avec des pourcentages de viabilité respectifs de 86 et 91 % ont été obtenus avec la solution enzymatique composée de 2 % de cellulase Onozuka R-10, 2 % de rhozyme HP-150 et 0,03 % de macérozyme R-10.

Tableau V. Effet des différentes solutions enzymatiques sur l'isolement des protoplastes isolés de mésophylle foliaire de *Prunus cerasus* L.var. « Montmorency ».

Solution enzymatique	Cellulase Onozuka R-10	Hemi-cellulase (Sigma)	Pectolyase Y-23	Nombre de. proto-plastes/ gMF (x 10^6)	% de proto-plastes vivants	Diamètre moyen (µm)
A	0,5 %	1 %	0,1 %	1,2 (0,1)	15 (4)	12 (0,9)
B	1 %	1 %	0,1 %	5,5 (0,7)	59 (3,5)	13 (0,2)
C	2 %	1 %	0,1 %	3,1 (2,8)	10 (4,3)	12 (1,6)
D	1 %	1 %	0,05 %	0,4 (0,1)	25 (6,4)	10 (0,5)
E	1 %	1 %	0,2 %	6,7 (1,4)	33 (3,2)	13 (1,6)
F	1 %	1 %	0,3 %	2,0 (0,8)	0	12 (0,9)
G	Cellulase Onoz. RS 1 %	1 %	0,1 %	14 (1,7)	78 (2,05)	15 (1,4)

Feuilles de vitroplants cultivées depuis 10 jours sur MS4 et plasmolysées dans CPW 13 % de mannitol pendant une heure.
Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions suivies de l'erreur standard.

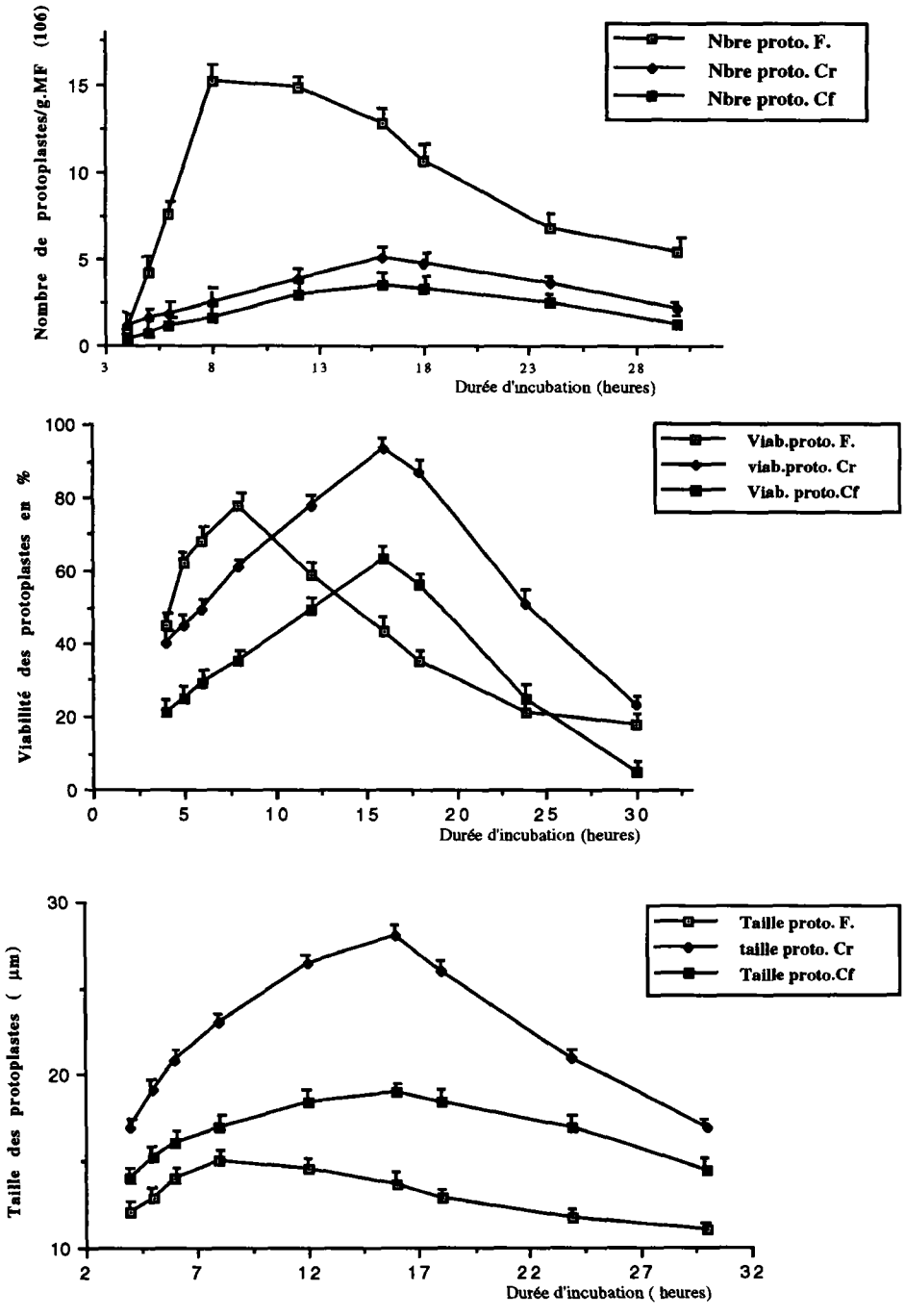
La durée optimum d'incubation enzymatique en terme de rendement et de viabilité des protoplastes a été de 8 heures pour le mésophylle foliaire et de 16 heures pour les cals racinaires et foliaires (Figures 2, 3 et 4).

A la fin de la digestion, la taille moyenne des protoplastes diffère selon l'origine de l'explant. Les protoplastes issus de mésophylle foliaire sont petits (15 microns), riches en chloroplastes et présentent un cytoplasme dense alors que ceux de cals de racines sont plus volumineux (28 microns) et vacuolisés. Les protoplastes issus de cals de feuilles ont un diamètre intermédiaire de 19 microns.

Discussion et conclusions

Les meilleurs résultats en termes de nombre et de viabilité des protoplastes ont été obtenus avec des feuilles de vitroplants, pré-plasmolysées pendant une heure dans la solution saline CPW 13 % de mannitol et incubées pendant 8 heures, à l'obscurité, dans une solution enzymatique composée de 1 % de cellulase RS, 1 % de hemicellulase et 0,1 % de pectolyase Y-23.

Pour les cals de feuilles ou de racines, le maximum de protoplastes viables est enregistré après une incubation de 16 heures, sans plasmolyse préalable, dans une solution enzymatique contenant 2 % de cellulase Onozuka R-10, 2 % de rhozyme HP-150, et 0,03 % de macérozyme R-10.



Figures 2, 3, 4. Évolution du nombre, de la viabilité et de la taille des protoplastes issus de mésophylle foliaire, de cals de feuilles ou de cals de racines en fonction de la durée d'incubation enzymatique. Pour le mésophylle foliaire, la solution enzymatique est composée de 1 % de cellulase RS, 1 % de hémicellulase et 0,1 % de pectolyase. Pour les cals de feuilles ou de racines, la solution est de 2 % de cellulase R-10, 2 % de rhozyme HP-150 et de 0,03 % de macérozyme R-10.

La digestion des tissus foliaires de la variété « Montmorency » nécessite l'utilisation de préparations enzymatiques présentant des activités spécifiques élevées (cellulase RS et pectolyase Y-23) alors que les protoplastes de cals peuvent être isolés avec cellulase Onozuka 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 la cellulase Onozuka R-10 et à la macérozyme R-10. Cela est confirmé par les travaux de James *et al.* [3] qui ont souligné l'effet de la cellulase RS sur le rendement de protoplastes du Ceriser « Colt » (*Prunus avium* × *pseudocerasus*). Selon Johnson *et al.* [4], Grézes *et al.* [3], ces enzymes présentent des activités spécifiques élevées par rapport respectivement à la cellulase Onozuka R-10 et la macérozyme R-10. En effet, la cellulase Onozuka RS contient une activité xylanase 3 fois plus grande que la cellulase R-10, qui, elle, possède plutôt des activités amylase, hémicellulase et protéase. La pectolyase Y-23 est une macérase hautement purifiée d'*Aspergillus japonicus* contenant 2 types de pectinases : une endopolygalacturonase et une endopectine lyase. La macérozyme R-10 dérivée du champignon *Rhizopus* spp est la seule enzyme commerciale contenant à la fois pectinase, cellulase et hémicellulase.

Les taux de viabilité des protoplastes observés (78 % à 91 %) peuvent être considérés comme satisfaisants puisque, chez les ligneux, un bon système d'isolement doit permettre d'enregistrer un taux supérieur à 50-60 % de viabilité [10].

Par ailleurs, les protoplastes issus de mésophylle foliaire de la variété « Montmorency » apparaissent plus petits (15 microns de diamètre en moyenne) que la plupart des rosacées (25 microns en moyenne) [10]. L'importance de ce facteur « taille des protoplastes » a été soulignée aussi bien pour la culture que pour la fusion des protoplastes et la caractérisation des hétérokaryons [12]. Une corrélation a été observée entre la taille des protoplastes et leur capacité à subir des pulsations électriques [14] et entre la taille et la nature des milieux de culture [10]. Plus les protoplastes sont gros, plus ils sont sensibles au voltage et à la durée des pulsations électriques. De plus, les protoplastes de petite taille préfèrent des milieux de culture semi-solides ou solides à ceux liquides.

Références

1. Eriksson TR (1985). Protoplast isolation and culture. In : Fowke LC, Constabel F, eds. *Plant protoplasts.* CRC Press, Boca Raton : 1-20.
2. Evans DA, Bravo JE (1983). Protoplast isolation and culture. In : Evans DA, Ammirato PV, Yamada, eds. *Handbook of Plant Cell Culture.* vol. 1. MacMillan Publishing Co, New York : 124-177.
3. Grèzes J, Thomas D, Thomasset B (1994). Factors influencing protoplast isolation from *Coffea arabica* cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36 : 91-97.
4. James DJ, Passey AJ, Malhotra SB (1984). Organogenesis in callus derived from stem and leaf tissues of apple and cherry rootstocks. *Plant Cell,Tissue and Organ Culture* 3 : 333-341.
5. Johnson LB, Stutteville DL, Higghins RK, Douglas HL (1982). Pectolyase Y-23 for isolating mesophyll protoplasts from several *Medicago* species. *Plant Sci Lett* 26 : 133-137.
6. Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
7. Ochatt SJ, Caso (1986). Shoot regeneration from mesophyll protoplasts of wild pear (*Pyrus communis* var *Pyraster* L.). *J Plant Physiol* 122 : 243-249.

8. Ochatt SJ (1987). Coltora di protoplasti come metodo per il miglinamento genetico nelle piante da frutto. *Frutticoltora* 8 : 58-60.
9. Ochatt SJ, Power JB (1988). An alternative approach to plant regeneration from protoplasts of sour cherry *(Prunus cerasus* L.). *Plant Sci* 56 : 75-79.
10. Ochatt SJ, Power JB(1990a). Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants ; In : Moo-Young M,Warren GS, Fowler MW, eds. *Comprehensive Biotechnology,* Suppl. 2. Pergamon Press, New York : 99-127.
11. Ochatt SJ (1990b). Plant regeneration from root callus protoplasts of sour cherry *(Prunus cerasus* L.). *Plant Cell Reports* 9 : 268-271.
12. Power JB, Davey MR, Wilson D (1989). Laboratory manuel : Plant tissue culture. Plant genetic manipulation group., Dept of Botany, Nottingham UK : 138.
13. Revilla MA, Ochatt SJ, Doughty S, Power JB (1987). A general strategy for the isolation of mesophyll protoplasts from deciduous fruit and nut tree species. *Plant Sci* 50 : 133-137.
14. Shillito RD, Saul MW, Paszkowski J, Muller M, Potrykus I (1985). High efficiency direct gene transfer to plants. *Biotechnology* 3 : 1090-1103.
15. Wildhom JM (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol* 47 : 189-194.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 331-336.

35

Rôle du génome « D » dans la régénération haploïde du croisement « blé x maïs »

A. MOIENI, A. SARRAFI

Institut National Polytechnique, École Nationale Supérieure Agronomique (INP-ENSAT), Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), EA DRED 832, 145, avenue de Muret, 31076 Toulouse, France.

Résumé

L'aptitude à la régénération haploïde dans le croisement intergénique (blé x maïs) de deux variétés de blé tendre (Cheyenne et Wichita) et de leurs 14 lignées substituées pour le génome « D » a fait l'objet de cette étude. L'expérimentation, réalisée dans une serre contrôlée, consiste en un essai en blocs randomisés avec 4 répétitions, chacune comprenant un pot de 3 plantes. Les épis de chaque génotype ont été castrés et pollinisés par les grains de pollen d'un hybride F1 de maïs (Seneca 60). 24 heures après la pollinisation, 0,3 à 0,5 ml d'une solution de 2,4-D (10 mg/l) a été injectée dans la cavité de l'entre-nœud, et une goutte dans chaque fleur. Des embryons et des plantules haploïdes vertes ont été obtenus chez l'ensemble des génotypes. L'étude de plusieurs paramètres de la régénération haploïde montre que :

– le chromosome « 3D » de Cheyenne chez Wichita diminue significativement le nombre d'embryons formés pour 100 fleurs pollinisées, ainsi que le nombre d'embryons formés pour 100 ovaires développés,

– le chromosome « 5D » de Wichita chez Cheyenne diminue significativement les valeurs des deux paramètres : nombre d'ovaires développés pour 100 fleurs pollinisées et nombre d'embryons germés pour 100 embryons formés.

Une des méthodes actuellement utilisée pour l'amélioration des blés est l'haplodiploïdisation. Cette méthode suscite un très vif intérêt parmi les sélectionneurs, car elle permet de raccourcir la période de sélection aboutissant à la production de lignées pures par comparaison aux méthodes classiques de sélection [3, 4, 12].

Le maïs, *Zea mays* L., peut fertiliser le blé tendre *Triticum aestivum* L., [7, 17]. Le zygote issu de croisements entre le blé et le maïs contient une combinaison de 21 chromosomes de blé et 10 chromosomes de maïs, et l'albumen est soit absent, soit fortement anormal [7, 9]. Les 10 chromosomes de maïs montrent des centromères qui présentent une faible affinité pour le fuseau achromatique, ce qui entraîne leur élimination rapide au cours des trois premières divisions cellulaires et la formation d'un embryon haploïde avec des chromosomes en provenance du parent blé [7, 9, 10].

Les deux gènes du blé, *Krl* et *Kr2*, empêchant le croisement avec le seigle, *Secale cereale* [5, 6], et avec *Hordeum bulbosum* [14, 15] n'ont pas un effet significatif sur le croisement « blé × maïs » [8]. Les gènes *Kr* inhibent la croissance du tube pollinique étranger au niveau du style et sa pénétration à l'intérieur de l'ovaire.

Par l'étude des lignées de substitution chromosomiques, on peut identifier des chromosomes porteurs de gènes correspondant à un caractère de façon plus fiable que par la voie des aneuploïdies [13].

Le but de ce travail a été d'étudier l'intervention du génome D et de ses chromosomes dans la régénération haploïde du croisement « blé hexaploïde × maïs ».

Matériels et méthodes

Deux lots de lignées de substitution chromosomiques développées par Morris à l'université de Lincoln (Nebraska, USA) entre deux cultivars de blé tendre de force Wichita (WI) et Cheyenne (CNN) ont été utilisés dans cette étude. L'obtention de ces lignées a été décrite par Zemetra *et al.* [16].

Les grains de chaque génotype ont été vernalisés dans des boîtes de Pétri, dans un réfrigérateur, durant 6 semaines à 2 °C ± 1 à l'obscurité. Par la suite, les grains germés ont été semés dans un mélange de terreau et de sable (3-1). La variété de maïs « Seneca 60 » est cultivée en plusieurs semis échelonnés à l'intervalle d'une semaine. La floraison de cette variété de maïs demande 9 à 10 semaines. La culture est conduite sous serre dans les conditions contrôlées suivantes :

- une photopériode de 16 heures avec une intensité lumineuse de 130-300 $\mu E.m^{-2}s^{-1}$,
- une température de 25 °C le jour et de 15 °C la nuit,
- une humidité relative de 75 % à 80 %.

Le dispositif expérimental est un essai en blocs randomisés avec 4 répétitions, chaque répétition étant constituée d'un pot de trois plantes. Les plantes ont été irriguées régulièrement et, une fois par semaine, l'irrigation a été effectuée avec une solution nutritive complète et les plantes ont été traitées par des insecticides et fongicides afin d'assurer une bonne alimentation minérale et un bon état sanitaire.

Pour les 16 génotypes de blé, l'épi est émasculé 1 à 4 jours avant l'anthèse. Les épis castrés sont recouverts d'un sachet en cellophane pour éviter des croisements accidentels. Un à quatre jours après la castration, lorsque les stigmates deviennent plumeux, les fleurs sont pollinisées avec le pollen du maïs. Celui-ci est récolté sur du papier aluminium en agitant l'inflorescence mâle, puis transféré sur les stigmates de blé

à l'aide d'une petite brosse dans les 10 minutes qui suivent la récolte (la durée de vie du pollen de maïs étant très courte).

Vingt-quatre heures après la pollinisation avec le maïs, 0,3 à 0,5 ml d'une solution de 2,4-D (acide 2,4 dichlorophenoxyacétique) à 10 mg/l sont injectés dans la cavité de l'entre-nœud supérieur à l'aide d'une seringue fine. La même solution de 2,4-D est ensuite appliquée directement sur les fleurons à raison d'une goutte dans chaque fleur. Les épis sont couverts d'un sachet.

Quatorze jours après le traitement au 2,4-D, on repère les épis ayant des grains assez développés pour être prélevés. Les autres épis sont laissés sur la plante mère pour une semaine supplémentaire.

Les grains sont stérilisés sous une hotte à flux laminaire par l'éthanol dénaturé (95°) pendant 1 à 2 minutes, puis dans une solution de Domestos (désinfectant ménager) à une concentration de 25 ml/l pendant 3 à 5 minutes. Les grains sont ensuite rincés à l'eau distillée stérile, et séchés sur papier filtre stérile.

Les grains sont disséqués sous la loupe binoculaire, à l'aide d'une pince très fine et d'une pointe à dissection. L'embryon est prélevé avec précaution et placé sur le milieu de culture.

Le milieu gélosé utilisé pour la culture des embryons est composé de :

– 7,5 g/l de Difco Orchid Agar et 4 g/l de saccharose.

Le pH du milieu s'ajuste à 5,7. Les boîtes de Pétri sont placées à l'obscurité à 25 °C. Après la germination, les boîtes de Pétri sont placées sous la lumière avec une photopériode de 16 heures par jour et une intensité lumineuse de 1,5 $\mu E.m^{-2}s^{-1}$. Les plantules formées sont alors transférées dans des tubes contenant le même milieu, et sont placées sous la lumière.

Lorsque les jeunes pousses ont formé suffisamment de racines, elles sont transférées dans des pots remplis de tourbes et conservées en mini-serres (humidité de 100 %) placées dans une chambre de culture à une température de 25 °C et une photopériode de 16 h/j.

Au stade de trois feuilles, les plantules haploïdes sont extraites du sol. Elles sont ensuite placées dans une solution contenant :

– 0,05 % de colchicine, 1,5 % de DMSO et une goutte de Tween 80 pour 200 ml de solution.

Les caractéristiques suivantes ont été déterminées pour chaque génotype et chaque répétition chez tous les épis du maître-brin et du premier brin secondaire :

– nombre d'ovaires développés pour 100 fleurs pollinisées (ODF),
– nombre d'embryons formés pour 100 fleurs pollinisées (EFF),
– nombre d'embryons formés pour 100 ovaires développés (EFO),
– nombre d'embryons germés pour 100 embryons formés (EGE),
– nombre des plantules vertes pour 100 embryons germés (PVE).

Toutes les données ont été transformées par la fonction Arcsin $\sqrt{x}$ pour normaliser la fréquence de distribution.

Résultats et discussion

Les résultats d'analyse de la variance (Tableau I) montrent une différence significative entre génotypes pour tous les caractères étudiés sauf pour la régénération des plantules vertes.

D'après les résultats qui sont reportés dans le Tableau II, la différence entre les deux génotypes parentaux (Wichita et Cheyenne) n'est pas significative pour les caractères étudiés.

Tableau I. Analyse de la variance des paramètres de l'aptitude à la régénération haploïde chez les lignées substituées.

Paramètres Source de variation	d.d.l	ODF		EFF		EFO		EGE		PVE	
		CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Total	63	52,86		34,84		52,62		1,14		464,89	
Génotypes	15	91,98	2,26**	65,92	2,64**	88,15	2,12*	1,15	2,51**	589,37	1,38ns
Blocs	3	39,54		27,68		40,70		1,16		419,94	
Résiduelle	45	40,71		24,96		41,56		1,17		426,39	

ODF : Ovaires développés pour 100 fleurs pollinisées
EFF : Embryons formés pour 100 fleurs pollinisées
EFO : Embryons formés pour 100 ovaires développés
EGE : Embryons germés pour 100 embryons formés
PVE : Plantules vertes pour 100 embryons germés
CM : Carré moyen
* : Significatif au seuil de 0,05
** : Significatif au seuil de 0,01
ns : Non significatif

Tableau II. Différences entre les moyennes de chaque lignée de substitution et son parent receveur pour les paramètres étudiés.

Paramètres Fond génétique	ODF		EFF		EFO		EGE		PVE	
	WI	CNN	WI	CNN	WI	CNN	WI	CNN	WI	CNN
Chromosome substitué										
1D	- 2,46	- 6,11	- 4,74	- 4,47	- 5,34	- 4,71	- 6,68	+ 20,67	- 7,2	- 12,14
2D	+ 3,14	- 6,02	- 2,33	- 4,97	- 3,81	- 6,26	- 12,06	- 7,42	- 13,72	- 12,14
3D	- 3,45	+ 4,72	- 8,98*	- 0,08	- 12,65*	- 1,81	- 6,06	- 6,05	+ 31,00	- 8,26
4D	+ 5,21	- 8,84	- 5,23	- 6,26	- 7,75	- 6,42	- 20,32	- 14,25	+ 4,75	- 12,14
5D	+ 5,62	- 13,18*	- 3,51	- 6,91	- 6,01	- 7,01	- 9,95	- 32,72*	- 0,95	- 12,14
6D	+ 0,64	- 3,33	- 1,79	- 0,32	- 2,38	- 1,97	- 21,64	+8,1	- 13,72	- 12,14
7D	- 2,97	- 2,27	- 3,82	- 0,2	- 3,94	+ 0,06	- 7,76	- 23,24	- 0,01	+ 10,22
Moyennes des parents :										
WICHITA (WI)	53,36		21,95		27,72		59,55		14,29	
CHEYENNE (CNN)	55,17		15,30		19,49		33,29		12,71	
WI-CNN	1,81 (ns)		6,65 (ns)		8.23 (ns)		26,26 (ns)		1,58 (ns)	
PPDS (5 %)	9,05		7,08		9,14		30,75		29,28	

ODF : Ovaires développés pour 100 fleurs pollinisées
EFF : Embryons formés pour 100 fleurs pollinisées
EFO : Embryons formés pour 100 ovaires développés
EGE : Embryons germés pour 100 embryons formés
PVE : Plantules vertes pour 100 embryons germés
* : Significatif au seuil de 0,05
ns : Non significatif.

Les différences entre les lignées de substitutions et le parent correspondant à leur fond génétique ne sont significatives que dans les cas suivants :

– Cheyenne (CNN) et CNN (W15D) pour le nombre des ovaires développés ainsi que pour le nombre des embryons germés,

– Wichita (WI) et WI (CNN3D) concernant le nombre des embryons formés pour 100 fleurs pollinisées et le nombre d'embryons formés pour 100 ovaires développés.

D'après l'ensemble de nos résultats, nous constatons que la formation des ovaires développés ainsi que l'obtention d'embryons et de plantules haploïdes dépendent du génotype de blé utilisé dans les croisements intergénériques « blé × maïs ».

Ces résultats confirment ceux de Laurie et Reymondie [11] chez les blés hexaploïdes et Amrani *et al.* [2] chez les blés tétraploïdes qui ont montré également une variabilité génétique très importante pour ces caractères. D'après Al-Qaudhy *et al.* [1], la différence entre une lignée de substitution chromosomique et son parent receveur peut être liée aux situations suivantes :

– effet génétique du chromosome substitué par rapport à l'homologue qu'il remplace,

– interaction entre les gènes du chromosome substitué et ceux du fond génétique (gènes modificateurs),

– adéquation du nombre de générations dans le programme de rétrocroisement qui élimine les gènes du cultivar donneur sur les autres chromosomes.

Dans notre étude, les valeurs des paramètres EFF, EFO, EGE et PVE de la variété Wichita sont supérieures à celles de Cheyenne, mais les différences entre eux ne sont pas significatives. Bien qu'il n'existe pas de différence significative entre les deux parents, Wichita et Cheyenne, pour les caractères étudiés, nous avons trouvé des effets significatifs de deux chromosomes, qui sont les suivants :

– l'effet de chromosome 3D sur la formation d'embryons pour 100 ovaires développés (EFO) ainsi que pour 100 fleurs pollinisées (EFF),

– l'effet du chromosome 5D sur le nombre d'ovaires développés pour 100 fleurs pollinisées (ODF) et le taux d'embryons germés pour 100 embryons formés (EGE).

Ces résultats indiquent que les chromosomes 3D et 5D seraient porteurs d'un ou de plusieurs gènes intervenant dans le déterminisme génétique des caractères correspondants. Le chromosome 3D de Cheyenne diminue significativement le nombre d'embryons formés, par rapport aux fleurs pollinisées ainsi que le nombre d'embryons formés pour 100 ovaires développés. Le chromosome 5D de Wichita diminue significativement le nombre d'ovaires développés pour 100 fleurs pollinisées (ODF) ainsi que le taux des embryons germés pour 100 embryons formés tandis que le chromosome 5D de Cheyenne augmente le taux de ces mêmes caractères.

Références

1. Al-Qaudhy W, Morris, RF, Hannc, MA (1988). Chromosomal locations of genes for traits associated with lodging in winter wheat. *Crop Sci* 28 : 631-635.
2. 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.
3. De Buyser J, Henry Y (1986). Utilisation des haploïdes doublés en sélection. *Bull Soc Bot Fr* 4 : 51-57.

4. Griffing JB (1975). Efficiency changes due to use of doubled haploids in recurrent selection methods. *Theor Appl Genet* 46 : 367-386.
5. Jalani BS, Moss JP, (1980). The site of action of the crossability genes (Kr1, Kr2) between *Triticum* and *Secale.* I. Pollen germination, pollen tube growth, and number of pollen tubes. *Euphytica* 29 : 571-579.
6. Lange W, Wojciechowaska B (1976). The crossing of common wheat *(Triticum aestivum* L.) with cultivated rye *(Secale cereale* L.). I. Crossability, pollen grain germination and pollen tube growth. *Euphytica* 25 : 609-620.
7. Laurie DA, Bennett MD (1986). Wheat × maïs hybridation. *Can J Genet Cytol* 28 : 313-316.
8. Laurie DA, Bennett MD (1987). The effect of the crossability loci Kr1 and Kr2 on fertilization frequency in hexaploid wheat x maize crosses. *Theor Appl Genet* 73 : 403-409.
9. Laurie DA, Bennett MD (1988). Chromosome behaviour in wheat x maize, wheat x sorghum and barley x maize crosses. In : Bradham PE, ed. Kew chromosome conferences III : 167-177. Her Majesty's Stationary Office, London.
10. Laurie DA, Bennett MD (1989). The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat x maize crosses. *Genome* 32 : 953-961.
11. Laurie DA, Reymondie S (1991). High frequence of fertilization and haploide seedling production in crosses between hexaploid wheat varieties. *Plant Breeding* 106 : 182-189.
12. Liang GH, Mc Hughen H (1987). Novel approaches to wheat improvement. In : Heyne EG ed. *Wheat and wheat improvement. American Society of Agronomy, Madison, USA.* n° 13 : 472-506. Agronomy Monograph.
13. Schmidt JW, Morris R, Johnson VA, Mattern PJ (1966). Comparison of the chromosome substitution and monosomie methods for wheat quality studies. *Crop Sci* 6 : 370-372.
14. Snape JW, Chapman V, Moss J, Blanchard CE, Miller TE (1979). The crossability of wheat with *Hordeum bulbosum. Heridity* 42 : 291-298.
15. Stich LA (1984). The production and utilisation of wheat doubled haploids. PhD Thesis, University of Cambridge.
16. Zemetra RS, Morris R, Schmidt JW (1986). Genes locations for heading using reciprocal chromosome substitution in winter wheat. *Crop Sci :* 531-533.
17. Zentkeler M, Nitzsche W (1984). Wide hybridization experiments in cereals. *Theor Appl Genet* 68 : 311-315.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 337-344.

36

Gynogenèse chez des génotypes marocains d'orge *(Hordeum vulgare)*

M.L. SIBI, M. FAKIRI

Amélioration génétique et Biotechnologies, ENSAIA, 2, avenue de la Forêt-de-Haye, 54505 Vandœuvre, France.

Résumé

L'obtention de plantes haploïdes par gynogenèse est présentée ici chez Bérénice, orge de printemps de type européen, ainsi que chez les génotypes marocains, Asni, Tamelalt, et 905. Ces derniers cultivars ont la particularité d'avoir un cycle de croissance extrêmement bref, et de ne produire qu'un nombre restreint de talles, permettant sans doute à la plante de donner rapidement une descendance, quoique de modeste importance.

Les tests de gynogenèse qui ont porté sur plus de 7 000 ovaires non fécondés ont amené, pour le génotype Asni, l'obtention de près de 9 % de plantes haploïdes, toutes étant chlorophylliennes, certains des ovaires ayant donné jusqu'à huit plantes.

La conduite en parallèle de deux lignes expérimentales, l'une en conditions lumineuses, l'autre sans éclairement, montre l'impact positif de l'obscurité sur le développement de plantes haploïdes. Le processus le plus efficace consiste à prélever les épis quand le pollen est au stade mononucléé tardif, ou binucléé ; un prétraitement de 14 jours à la température de 4 °C précède la mise en culture in vitro *des ovaires sur milieu de Hunter, sans thiamine ni ANA, mais avec addition de 2 mg/l de 2-4 D ; les boîtes sont entreposées à l'obscurité avec une alternance de température de 22/18 °C (16/8 heures). Les plantes haploïdes se développent entre la 7e et la 10e semaine d'obscurité, elles verdissent dès qu'elles sont exposées à la lumière.*

La production d'haploïdes par culture *in vitro* présente les intérêts que l'on connaît, que la technique soit celle de l'androgenèse ou de la gynogenèse. Ici, point plus délicat

chez les céréales, c'est la régénération de plantes entières qui est visée, afin de produire, en conditions de stress adéquats, des vitrovariants [9-11] résistants à la sécheresse et à la salinité [12, 13]. Notre but consiste donc à obtenir sur l'ensemble des génotypes concernés le processus de régénération.

Le génotype européen Bérénice, pour lequel des haplodiploïdes ont déjà été obtenus [1, 5, 6, 8], servira ici de témoin de référence vis-à-vis des types marocains, Asni, Tamelat et « 905 » qui seront traités par la culture d'ovaires non fécondés, c'est-à-dire par gynogenèse.

Les prétraitements [1, 3, 5, 8] et milieux de base qui seront testés sont ceux qui ont déjà donné des résultats intéressants lors de l'androgenèse de divers génotypes, et référés dans les données bibliographiques [1, 2, 4, 5, 6, 8].

Par ailleurs, les cultures *in vitro* seront menées en parallèle dans deux conditions d'éclairement différentes (lumière/obscurité), permettant la comparaison de ces processus expérimentaux.

Matériel et méthodes

Matériel végétal et culture en sol

• *Description du matériel végétal*

Les 4 génotypes utilisés comprennent un type européen, Bérénice (B), et 3 cultivars marocains, Asni (A), Tamelalt (T), et « 905 » qui proviennent de sélection locale. La particularité de ces derniers est d'avoir une très grande réactivité vis-à-vis de la chaleur et de la sécheresse. Dès que l'un de ces deux paramètres est en jeu (même de façon extrêmement brève), le tallage cesse et l'épiaison a lieu. Cela aboutissant fréquemment à l'obtention d'un unique épi, de petite taille (15 à 20 cm maximum pour Tamelalt), et comportant un nombre restreint de grains (9 à 12 grains pour « 905 »). Il convient donc, pour optimaliser la qualité physiologique du matériel, que l'on sait essentielle pour tous travaux d'androgenèse ou de gynogenèse, d'entretenir les plantes avec grand soin, de façon à obtenir un tallage abondant avant l'épiaison.

• *Entretien des plantes*

Les plantes entières se développent dans du terreau en *fertil pots* disposés dans un phytotron. La photopériode est de 16 heures avec un éclairement de 3 000 lux, les températures diurnes et nocturnes sont de 15 °C et 12 °C (± 2 °C) respectivement, et l'hygrométrie est de 75 %.

Prélèvement des épis et culture *in vitro*

• *Prélèvement des épis*

Pour que les cellules contenues dans l'ovaire non fécondé évoluent favorablement, il faut prélever les épis lorsque les anthères contiennent une majorité de grains de pollen au stade uninucléé avancé, ou binucléé [5, 8]. Cette phase est en cours lorsque les barbes de ces orges commencent à émerger de la gaine [1, 6].

• *Prétraitement au froid*

Les épis prélevés sont conservés dans un vase au frigo à 4 °C, pendant 14 jours.

• ***Milieux de culture***

Les 5 milieux utilisés sont ceux établis dans le cadre de l'androgenèse, quelquefois après modifications, et numérotés comme suit :

- 1. Foroughi-Wehr *et al.* [2], modifié par Devaux (comm. pers., 1987) ;
- 2. Hunter [4] ;
- 3. Hunter, gelrite [4] ;
- 4. Hunter [4]
  - sans thiamine-HCl
  - 2-4 D (2mg/l) remplace ANA (1mg/l) ;
- 5. San Nœum [8], modifié, (sans efficacité dans nos conditions).

• ***Mise en culture* in vitro**

Les épis sont excisés, et les barbes éliminées aux ciseaux, avant stérilisation.

Après 5 mn de trempage dans une solution aqueuse d'hypochlorite de calcium à 70 % et à raison de 25 g/l, les épis sont rincés 3 fois à l'eau stérile. Les ovaires sont alors prélevés en conditions d'asepsie et déposés dans des boîtes de Pétri (Ø = 5 cm) contenant les milieux nutritifs, avec 20 à 25 unités par boîte. Un total de plus de 7 000 ovaires a été ainsi traité.

Les effectifs des divers génotypes répartis sur les différents milieux sont alors compris entre des valeurs s'approchant de 200 jusqu'à plus de 300 ovaires par processus expérimental.

• ***Conditions dans la pièce de culture* in vitro**

Un éclairement d'environ 2 000 à 3 000 lux pendant 16 heures est fourni par des tubes fluorescents. La simple protection des boîtes de Pétri par claustration dans des caches entraîne l'obscurité. Les températures diurnes et nocturnes sont de 22 °C et 18 °C (± 2 °C), respectivement, et l'humidité de 75 % à 80 % environ.

Processus expérimentaux et traitement des données

• ***Entretien des cultures et observations***

Deux processus expérimentaux sont suivis en parallèle, en séparant les boîtes contenant les ovaires en 2 lots d'effectifs équivalents :

- l'alternance jour/nuit (lumière : L),
- l'obscurité (obscurité : O).

Ils permettent de comparer l'évolution des ovaires, puis après 10 semaines de culture *in vitro*, le nombre de plantes obtenues, selon les différents milieux et pour les différents génotypes (Tableaux I à IV).

• ***Traitement des données***[1]

Les faibles effectifs des réussites (plantes entières) amènent à utiliser le test χ^2 comme critère d'analyse des données, et quelquefois à regrouper ces dernières en un cumul des divers états d'un même facteur.

Ainsi, on comparera s'il y a identité de réponse pour les différents génotypes ($\neq$ g), pla-

1. Seuls sont présentés les résultats relatifs aux travaux ayant donné au moins une réponse positive. Ainsi, bien qu'étant intervenus lors des expérimentations, ni les résultats négatifs concernant l'utilisation du milieu n° 5, ni ceux ayant trait aux 850 ovules du cultivar « 905 » n'apparaîtront dans les tableaux.

cés indépendamment sur chaque milieu μ (μ) : χ^2 {≠ g/μ}, ou encore pour tous milieux confondus (Σ mil.) : χ^2 {≠ g/Σ mil.}, et ainsi de suite pour chaque facteur analysé.

Résultats et discussions

Efficacité des différents milieux selon le génotype

• ***A la lumière L (Tableau I) :*** Les nombres de plantes générées à la lumière se répartissent entre 0 %-A et B- sur milieu 3, jusqu'à 4,44 %-A- sur milieu 4, en passant par 3 %-A- sur milieu 1.
Deux milieux présentent les valeurs les plus élevées ; il s'agit des n° 1 et 4 ; ce dernier donne même des valeurs non significativement différentes pour les trois génotypes : (χ^2 {≠ g/4} = 4,00 NS), et maximales (1,48 %-T-, 2,08 %-B-, et 4,44 %-A-).

Tableau I. Évolution, en conditions lumineuses (L), des ovaires de chaque génotype déposés sur les différents milieux.

Milieu μ χ^2 {≠ g}	Cultivar	Nb ov	Nb pl	% pl/ov
1	Bérénice	257	1	0,40
	Asni	297	9	**3,00**
χ^2 = 8,87*	Tamelalt	313	2	0,64
2	Bérénice	268	3	1,12
	Asni	285	1	0,35
χ^2 = 1,50	Tamelalt	232	3	1,29
3	Bérénice	328	0	0,00
	Asni	286	0	0,00
χ^2 = 6,44*	Tamelalt	194	2	1,03
4	Bérénice	240	5	2,08
	Asni	225	10	**4,44**
χ^2 = 4,00	Tamelalt	202	3	1,48

Codages : nb ov : nombre d'ovaires mis en culture ; nb pl : nombre de plantes obtenues ; % pl/ov : nombre de plantes pour cent ovaires.

Présentation des χ^2 (L) sur les effectifs de plantes obtenues :
χ^2 relatif aux 3 génotypes (≠ g) sur le milieu μ, χ^2 {≠ g/μ}, avec $\alpha_{0,05}$ = 5,99 (d.d.l. = 2) :

χ^2 {≠ g/1} = 8,87*
χ^2 {≠ g/3} = 6,44*

Les autres χ^2 :
tous génotypes confondus, avec $\alpha_{0,05}$ = 7,81 (d.d.l. = 3):

χ^2 {≠ mil./Σ g.} = 18,99***

tous milieux confondus, avec $\alpha_{0,05}$ = 5,99 (d.d.l. = 2) :

χ^2 {≠ g/Σ mil.} = 4,81 N.S.

Significatif à :
* = 5 %
** = 1 %
*** = 1‰
N.S. = non significatif

• ***A l'obscurité O (Tableau II) :*** A l'obscurité, seul le milieu 3 entraîne pour les trois génotypes des résultats non significativement différents (χ^2 {≠ g/2} = 0,95 NS) et médiocres (0 %-A-, 0,51 %-T-, 0,71 %-B-).
Les autres milieux amènent des résultats hétérogènes (χ^2 {≠ g/1} = 12,16**, χ^2 {≠ g/2} = 9,30**, χ^2 {≠ g/4} = 11,64**), mais toujours supérieurs à 1,60 % -B/1-. Cependant, si pour B, ces milieux donnent des résultats diversifiés (1,60 %/1, 3,07 %/2, 3,33 %/4), ce fait disparaît pour T (3,90 %/1, 3,91 %/2, 3,96 %/4) et pour A (8,00 %/1, 8,77 %/2, 8,88 %/4). Les deux génotypes marocains semblent alors ne plus réagir de façon spécifique vis-à-vis de ces trois milieux.

En fait, tout comme à la lumière, le milieu 4 donne à l'obscurité les résultats les plus élevés pour chacun des génotypes (3,33 %-B-, 3,96 %-T-) et particulièrement pour A, avec la valeur de 8,88 %.

Tableau II. Évolution, à l'obscurité (O), des ovaires de chaque génotype déposés sur les différents milieux.

Milieu µ χ^2 {≠ g}	Cultivar	Nb ov	Nb pl	% pl/ov
1	Bérénice	250	4	1,60
	Asni	300	24	**8,00**
χ^2 = 12,16**	Tamelalt	205	8	3,90
2	Bérénice	260	8	3,07
	Asni	285	25	**8,77**
χ^2 = 9,30**	Tamelalt	230	9	3,91
3	Bérénice	280	2	0,71
	Asni	286	0	0,00
χ^2 = 0,95	Tamelalt	194	1	0,51
4	Bérénice	240	5	3,33
	Asni	225	20	**8,88**
χ^2 = 11,64**	Tamelalt	202	8	3,96

Codages : nb ov : nombre d'ovaires mis en culture ; nb pl : nombre de plantes obtenues ; % pl/ov : nombre de plantes pour cent ovaires :

Présentation des χ^2 (O) sur les effectifs de plantes obtenues :
χ^2 relatif aux 3 génotypes (≠ g) sur le milieu µ, χ^2 {≠ g/µ}.
avec $\alpha_{0,05}$ = 5,99 (d.d.l. = 2) :

χ^2 {≠ g/1} = 12,16**
χ^2 {≠ g/2} = 9,30**
χ^2 {≠ g/4} = 11,64**

Les autres χ^2 :
tous génotypes confondus, avec $\alpha^{0,05}$ = 7,81 (d.d.l.= 3) :

χ^2 {≠ mil/Σ g.} = 30,88***

tous milieux confondus, avec $\alpha_{0,05}$ = 5,99 (d.d.l. = 2) :

χ^2 {≠ g/Σ mil.} = 28,85***

Signıficatif à :
* = 5 %
** = 1 %
*** = 1‰
N.S. = non significatif

Impact des conditions d'éclairement, tous milieux confondus

Le regroupement des valeurs en un cumul permet de baser les interprétations sur des effectifs plus importants, et donc de tirer des conclusions plus fiables quant à la différence de comportement des ovaires mis en culture, selon les conditions d'éclairement.

Ainsi, tous milieux confondus, les taux de plantes obtenues pour 100 ovaires cultivés à la lumière (L Tableau III) sont de 0,95 %-T-, 1 %-B-, et 1,92 %-A-, tandis qu'à l'obscurité (O Tableau IV), les performances de 3,12 %-T-, 2,03 %-B-, et de 6,69 %-A-, sont plus élevées que les précédentes.

La comparaison de l'impact des deux processus L/O, pour les différents génotypes, montre un χ^2 très hautement significatif pour les deux génotypes marocains A et T (χ^2 A $\{\neq$ L,O/Σ mil.$\}$ = 29,55***, χ^2T $\{\neq$ L,O/Σ mil.$\}$ = 10,60***), mais pas pour B (χ^2 B $\{\neq$ L,O/Σ mil.$\}$ = 3,65N.S.) qui paraît moins sensible à cet effet.

Tableau III. Nombre de plantes à 10 semaines, tous milieux confondus, en conditions lumineuses (L).

Cultivars	Nb total d'ov	Nb d'ov produisant un nb de pl = 1	2	3	6	8	Nb pl total	% pl/ov
Bérénice	1093	2	3	1	0	0	11	1,00
Asni	1093	7	1	2	1	0	**21**	1,92
Tamelalt	941	4	1	1	0	0	9	0,95

Tableau IV. Nombre de plantes à 10 semaines, tous milieux confondus, à l'obscurité (O).

Cultivars	Nb total d'ov	Nb d'ov produisant un nb de pl = 1	2	3	6	8	Nb pl total	% pl/ov
Bérénice	1030	4	4	3	0	0	21	2,03
Asni	1030	27	5	6	1	1	**69**	**6,69**
Tamelalt	831	11	3	3	0	0	26	3,12

Codages pour les tableaux III et IV : nb total ov : nombre d'ovaires mis en culture tous milieux confondus ; nb d'ov ... de pl : nombre d'ovaires ayant généré un score défini ; nb pl total : nombre de plantes totales obtenues ; % pl/ov : nombre de plantes pour cent ovaires mis en culture.

Présentation des χ^2 issus des Tableaux III (L) et IV (O)

χ^2 issu des 2 conditions L/O, tous milieux confondus, χ^2 $\{\neq$ L,O/Σ mil.$\}$, avec $\alpha_{0,05}$ = 3,84 (d.d.l. = 1) :

Bérénice : χ^2 $\{\neq$ L,O/Σ mil.$\}$ = 3,65 N.S.
Asni : χ^2 $\{\neq$ L,O/Σ mil.$\}$ = 29,55***
Tamelalt : χ^2 $\{\neq$ L,O/Σ mil.$\}$ = 10,60***

Significatif à :
* = 5 %
** = 1 %
*** = 1‰
N.S. = non significatif

Conclusion

Le point essentiel que l'on peut retirer de cet ensemble, c'est l'impact marquant de l'obscurité sur la régénération de plantes à partir des ovaires des génotypes considérés. Cela est déjà apparent au niveau des données individuelles :

– à la lumière, les trois génotypes ont un comportement diversifié selon les milieux utilisés ; cependant, tous les génotypes donnent leur performance maximale sur milieu 4 (1,48 %-T-, 2,08 %-B-, et 4,44 %-A-) ;

– à l'obscurité, l'ensemble des valeurs est augmenté sur les milieux 1, 2, 4 ; pour Bérénice les valeurs sont hétérogènes (1,60 %/1, 3,07 %/2, 3,33 %/4), alors que pour Tamelalt (3,90 %/1, 3,91 %/2, 3,96 %/4), comme pour Asni (8,00 %/1, 8,77 %/2, 8,88 %/4), peu de différences sont enregistrées sur ces trois milieux.

Cependant, aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité, le milieu 4 tend à donner des chiffres supérieurs aux autres pour chacun des génotypes. Ainsi, le milieu de Hunter [4] sans thiamine ni ANA, mais additionné de 2 mg/l de 2-4 D, est favorable à la régénération de plantes haploïdes pour les trois cultivars présentés, tandis que le milieu 3 donne des performances faibles (-T-, -B-) ou nulles (-B-, -A-), comme si l'agent gélifiant (gelrite) constituait, dans nos conditions, un facteur limitant.

En fait, les valeurs obtenues tous milieux confondus, confirment l'impact positif de l'obscurité, malgré le cumul avec les données moins favorables du milieu 3.

Ainsi, pour les génotypes utilisés, la réponse la plus efficace quant à la culture *in vitro* d'ovaires non fécondés pour l'obtention de plantes haploïdes est obtenue en suivant la procédure qui suit.

Après avoir cultivé les plantes-mères en conditions optimales, les épis sont prélevés dès que les barbes pointent hors de la gaine (stade uninucléé tardif ou binucléé des grains de pollen) ; ils sont conservés au frigo à 4° C pendant 14 jours ; les barbes sont alors éliminées et, après stérilisation, les ovaires sont prélevés en asepsie, et déposés sur le milieu 4 ; les boîtes sont entreposées à l'obscurité, avec une alternance de température 22 °C/18 °C pendant des périodes de 16/8 heures, respectivement ; les premières plantes haploïdes apparaissent à partir de la 7^{e} semaine, et jusqu'à 10 semaines après la mise en culture, et toutes verdissent dès leur exposition à la lumière.

Ces expérimentations ont permis de définir des conditions efficaces de gynogenèse chez l'orge. Elles ont également eu comme résultat l'identification d'un cultivar marocain, que l'on sait adapté à la sécheresse et à la salinité, particulièrement réactif vis-à-vis de la gynogenèse (A>>T $\geq$ B). Bien que chez l'orge d'autres voies de production de plantes haploïdes (culture de microspores isolées [7], hybridations interspécifiques) donnent des rendements plus élevés, la gynogenèse, par la particularité de ses résultats [5, 9, 12, 13], garde ici tout son intérêt.

Références

1. Blanc S (1990). Androgenèse chez l'orge *(Hordeum vulgare)* et vitrovariation. DAA Amélioration génétique et biotechnologies ; DEA Biotechnologies et industries alimentaires. INPL-ENSAIA 2, av. de La Forêt-de-Haye, 54505 Vandœuvre, 23 p.
2 Foroughi-Wehr B, Mix G, Gaul H, Wilson HM (1976). Plant production from cultured anthers of *Hordeum vulgare* L. *Z Pflanzenzücht* 77 : 198-204.

3. Huang B, Sunderland N (1982) Temperature stress preteatment in barley anther culture. *Ann Bot* 49 : 77-88.
4. Hunter CP (1988). Plant regeneration from microspores of barley *(Hordeum vulgare).* Ph.D.Thesis, Wye College, University of London.
5. Kandil M (1990). Hérédité épigénique de vitrovariants obtenus par haplodiploïdisation chez l'orge *(Hordeum vulgare).* Analyse des croisements diallèles et de leurs descendances par autofécondation. Thèse Doc de l'INPL. Sciences agronomiques. Opt. génétique. 2, av. de La Forêt-de-Haye, 54505 Vandœuvre, 116 p.
6. Marandon F, Vincent A (1991). Haplodiploïdisation et vitrovariation chez *Hordeum vulgare.* DAA Amélioration génétique et biotechnologies ; DEA Biotechnologies et industries alimentaires. INPL-ENSAIA 2, av. de La Forêt-de-Haye, 54505 Vandœuvre, 23 p.
7. Picard E, Crambes E, Mihamou-Ziyyat A (1995). L'haplodiploïdisation : un outil multiusage pour la génétique et l'amélioration des céréales. In : *Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?* Paris : AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext : 355-369.
8. San-Noeum H (1976). Haploïdes d'*Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* d'ovaires non fécondés. *Ann Amélior Pl* 26 : 751-754.
9. San-Noeum H, Ahmadi N (1982). Variability of doubled haploïds from *in vitro* androgenesis and gynogenesis in *Hordeum vulgare* L. In : Earle ED, Demarly Y, eds. *Variability in plants regenerated from tissue culture.* Praeger New York : 273-283.
10. Sibi M (1981). Hérédité de variants épigéniques obtenus par culture de tissus in vitro chez les végétaux supérieurs. Thèse Doc es-Sc Amélior Pl. Univ Paris-Sud Orsay, 280 p.
11. Sibi M (1990). Genetic bases of variation from *in vitro* tissue culture. In : Bajaj YPS, ed. *Somaclonal variation in crop improvement* I. *Biotechnology in agriculture and forestry.* Vol 11, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg : 112-133.
12. Sibi M, Kandil M (1993). Marqueurs biochimiques de la vitrovariation chez des haplodiploïdes d'orge *(H. vulgare).* In : *Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes ?* Paris : AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext : 283-299.
13. Sibi M, Fakiri M (1994). Vitrovariation chez des orges *(Hordeum vulgare)* issues d'haplodiploïdisation. Analyse des β amylases chez les croisements diallèles. In : *Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?* Paris : AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext : 345-353.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 345-353.

37

Vitrovariation chez des orges *(Hordeum vulgare)* issues d'haplodiploïdisation. Analyse des β amylases chez les croisements diallèles

M.L. SIBI, M. FAKIRI

Amélioration génétique et Biotechnologies, ENSAIA, 2, avenue de la Forêt-de-Haye, 54505 Vandœuvre, France.

Résumé

L'analyse des descendants d'haploïdes doublés issus de l'orge de printemps Bérénice a été effectuée par comparaison d'électrophorégrammes des β amylases contenues dans le grain. On vérifie ainsi, au niveau moléculaire (nombre, disposition et intensité des bandes), le comportement variant qui avait déjà été mis en évidence sur des plans biométriques et biochimiques.

Les électrophorégrammes des β amylases provenant des grains d'autofécondation montrent certaines évolutions que l'on ne peut relier directement ni avec l'âge des grains, ni avec le nombre de méioses, ni avec l'origine biologique du matériel. Des comparaisons cohérentes impliquent donc d'utiliser un matériel clairement défini : même nombre de méioses à partir d'une référence commune, même degré de vieillissement, mêmes conditions d'analyses expérimentales.

L'analyse des grains, produits du croisement diallèle de l'ensemble des individus précédents, montre que l'hérédité, explorée au moyen des spectres électrophorétiques,

ne répond pas à des lois simples. Entre autres, les dissymétries chez les croisements réciproques amènent à confirmer le rôle d'effets épigéniques sur l'expression du génome de ces descendants vitrovariants issus d'haplodiploïdes.

Ce travail s'intègre dans le cadre plus général de l'analyse de la vitrovariation [7-15] et, plus particulièrement ici, de celle issue d'haplodiploïdisation.

Ainsi qu'il a été présenté dans des étapes précédentes [2, 15], l'orge de printemps Bérénice a servi de matériel expérimental dans la succession des analyses soit biométriques, soit biochimiques.

Des grains de la première génération Φ1 d'autofécondation d'haploïdes doublés d'orge vitrovariants A1, A2, A3, issus d'androgenèse, et G1, G2, issus de gynogenèse, ainsi que le témoin T, fixé (Bérénice), nous ont été fournis en 1984 par San-Noeum [5, 6].

Les analyses biométriques effectuées lors des autofécondations successives de ce matériel, et, entre autres, la 4^{e} Φ 4, ont montré [15] un maintien des modifications portant sur la cinétique d'apparition des talles, les longueurs de feuilles, etc. Cette variabilité apparaît ici plus marquée chez les descendances issues d'androgenèse comparées à celles de gynogenèse.

Les observations biochimiques [15] ont alors porté sur des paramètres comme les taux de protéines, ou les activités des α et des β amylases.

Soulignons que l'analyse du grain ou de l'embryon qu'il contient porte en fait sur la génération engendrée par la plante, donc la suivante.

Ces données amènent à constater, contrairement aux observations précédentes faites lors des analyses biométriques, une variabilité souvent plus marquée chez les gynogénétiques que chez les androgénétiques, avec pour les premiers un réel éclatement des potentialités comportementales [15].

Un premier croisement diallèle entre vitrovariants et avec le témoin, tous de génération Φ 4, avait été réalisé. Les données issues des produits de croisements ont été analysées selon le modèle de Griffing. Ainsi on a pu constater [15] des dissymétries de comportement chez les croisements réciproques, des hérédités soit de type paternel, soit de type maternel, et par ailleurs, selon le critère considéré, des effets dits de transgressions, associés quelquefois aux dissymétries d'expression présentées antérieurement. Notons que l'autofécondation d'une partie des produits de croisement a montré un maintien des transgressions pour les paramètres biométriques.

Une approche biochimique avait alors été envisagée, et les activités des α et des β amylases, ainsi que l'observation des électrophorégrammes des β amylases, avaient déjà été abordées [4]. Cependant, les analyses n'avaient pu être poursuivies au niveau des grains des croisements réciproques, par manque de matériel.

Rappelons que, contrairement aux α amylases, les β amylases s'expriment directement au niveau du grain mûr, sans qu'il soit besoin de traitement complémentaire particulier.

C'est donc ce type d'analyse qui sera ici proposé sur des grains issus, d'une part des autofécondations successives, d'autre part des produits de croisement diallèle. On pourra ainsi tester l'effet « génération » (ou nombre de méioses), le vieillissement du grain, et le comportement des grains issus des croisements réciproques.

Matériel et méthodes

Électrophorégrammes des β amylases

Cette analyse s'effectue donc sur le grain mûr. La technique utilisée est celle mise au point en 1983 chez le blé par Joudrier [3], après l'adaptation dans le cadre de notre laboratoire au cas de l'orge [1, 2, 4].

• **Gel :** la migration se fait en gel de polyacrylamide (acrylamide 7,5 % additionné de bis-acrylamide 0,2 % dans de l'eau distillée). Pour 2 gels (50 ml chacun), 110 ml sont nécessaires auxquels auront été ajoutés 0,352 ml de diméthylaminopropionitrile puis, juste avant de couler l'ensemble entre les deux plaques en verre de chacun des systèmes, 0,11 g de persulfate d'ammonium qui précipite la polymérisation. Le peigne adapté à l'ensemble ménage des puits dans lesquels seront placés les dépôts. La polymérisation a lieu en 1 à 2 heures à température ambiante.

• **Tampon :** pour la migration, de même que pour le bain de révélation, on utilise un tampon lactate d'aluminium dont le pH est ajusté à 3,2 au moyen d'acide lactique (0,7 M).

• **Extraction et migration :** après fixation des plaques dans la cuve (BIO-RAD protean II xi), et inversion des électrodes au niveau des extrémités, la saturation ionique s'effectue dans la pièce froide à 4 °C, pendant toute une nuit à raison de 8V/cm.

L'extraction des protéines enzymatiques se fait indépendamment pour chaque grain (environ 40 mg), par broyage manuel dans un mortier contenant 0,650 ml d'un mélange de mercaptoéthanol (0,5 M) et de chlorure de sodium (0,2 M). L'ensemble est ensuite transféré dans un tube à centrifugation, et la macération a lieu pendant 2 heures à température ambiante. Une centrifugation, même à faible vitesse, permet de faire décanter les parties solides. Une addition de bleu de bromophénol permet ultérieurement de suivre le dépôt sur le gel.

Après que 3 µl de chaque extrait ont été placés dans chacun des puits, la migration a lieu, toujours à 4 °C, avec les électrodes inversées, d'abord pendant 1 heure sous une tension de 16V/cm, puis pendant 2 heures à raison de 25 V/cm.

• **Révélation :** la révélation est effectuée en préparant d'une part une solution d'amidon soluble (1 g) dans 500 ml de tampon lactate d'aluminium – l'ensemble est agité et chauffé jusqu'à devenir limpide ; d'autre part, une solution fraîche d'iode constituée de 0,62 g d'iode pure en paillettes et de 0,6 g d'iodure de potassium dilués, par chauffage et agitation, dans 100 ml d'eau distillée.

Le gel est alors isolé, placé dans un bac contenant la solution d'amidon et transféré dans une étuve à 37 °C pendant 25 mn pour être imprégné. Il est ensuite rincé 3 fois à l'eau du robinet.

On verse alors la solution d'iode, qui teinte en bleu l'ensemble, et laisse non colorés les emplacements où l'amidon a été hydrolysé par la β amylase. On peut ainsi observer les fronts de migration de l'enzyme.

Matériel végétal analysé

• **Dénomination :** un sigle unique désignera les produits d'autofécondation ou les parents, par exemple : A1. Chaque individu issu de croisement est désigné par les sigles de ses parents, maternel d'abord, puis paternel. Ainsi, A1G2 provient de la réception par le parent A1 (castré) du pollen de G2.

• **Grains issus d'autofécondation :** les grains d'autofécondation récoltés au cours des années 1988 sur des plantes Φ 4 (produits Φ 5), puis 1989 (produits Φ 6), et 1992 (produits Φ 7) ont été analysés en parallèle pendant l'été 1993.

Par ailleurs, une partie des grains récoltés en 1989 (produits Φ 6) avait déjà été testée en 1991 [4].

• **Grains issus du croisement diallèle :** les grains Φ 6 (prélevés sur les individus de génération Φ 5) des séries du A1, A2, A3, G1, G2, et le témoin T constituent les parents d'entrée du tableau diallèle.

Le renouvellement de cet ensemble de croisements en 1992, permet de disposer d'une quantité suffisante de grains pour les analyses électrophorétiques.

Notons qu'il n'a pas été possible, ici, d'obtenir des grains du croisement A3A1.

Organisation expérimentale de l'analyse

Pour chaque catégorie, 5 grains d'orge (produits Φ 7, issus du croisement entre les parents Φ 6) ont été utilisés. Chaque grain a constitué un extrait unique amenant à la réalisation de 4 dépôts placés dans les puits, choisis de façon aléatoire, sur chacun des 2 couples de plaques de chaque expérimentation. Les conclusions proviennent donc de 5×4 observations. Notons qu'aucune variation de comportement n'est enregistrée pour ces différentes analyses portant sur la même famille.

Résultats et discussion

Grains issus d'autofécondation (Figure 1)

Les grains analysés en 1993 ont soit un an (récolte 1992, produit Φ 7), soit deux ans ou quatre ans (récolte 1989, respectivement /a et /b, produit Φ 6), soit cinq ans (récolte 1988, produit Φ 5).

Tous les électrophorégrammes présentent une bande principale **(pr)**, d'intensité plus ou moins marquée, sauf semble-t-il pour les grains de A2 âgés d'un an (récolte 92) et analysés en 1993, ce dernier cas de figure paraît pour le moins surprenant.

De une à trois bandes complémentaires **(cp)** apparaissent par ailleurs selon les cas.

Les analyses des grains de 1988 (de quatre ans) présentent une diversité de bandes plus importante que les grains de 1992 (un an). Le vieillissement des grains entraînerait-il une augmentation du nombre de bandes ?

En fait, les analyses (89a) pratiquées en 1991 sur des grains de deux ans (récolte 1989) ont amené, chez le témoin et les gynogénétiques, à l'observation d'un nombre élevé de bandes **cp**, tandis que le même matériel analysé en 1993 (89b), et qui a donc quatre ans, voit une partie de ces bandes disparaître. Ainsi le témoin T subit une disparition de certaines bandes, de même que G1 et G2, tandis que pour A2 une bande complémentaire apparaît, et que A1 et A3 restent identiques à eux-mêmes.

L'effet du vieillissement n'est donc pas clair et l'on peut se demander si le nombre d'autofécondations peut être impliqué dans la modification des électrophorégrammes.

Si le nombre d'autofécondations était cause d'une évolution régulière des bandes, les produits successifs Φ 5, Φ 6, Φ 7 devraient présenter des spectres progressifs, avec augmentation, ou diminution cohérente. Ainsi, dans cette dernière éventualité, la récolte 1989 (produit Φ 6) devrait amener à un nombre plus restreint de bandes que celle de

1988 (produit Φ 5), ce qui n'est pas le cas, alors que pour les grains récoltés en 1992 (produit Φ 7) on constate cette diminution.

Il ressort de l'ambiguïté de ces évolutions que toute analyse comparative se doit d'utiliser des grains de même vieillissement, prélevés sur des plantes issues d'un même nombre de méioses, et qui se sont développées dans les mêmes conditions. De plus, ces analyses doivent être effectuées à la même époque.

Grains provenant du croisement diallèle (Figure 2)

Le diallèle est effectué à partir d'individus Φ 6, les grains analysés ici sont donc les produits directs issus du croisement. Nous considérerons les autofécondations Φ 7 comme les équivalents comportementaux des parents ayant engendré les croisements. Ces autofécondations sont disposées selon la diagonale du tableau.

Lors de ces analyses de 1993, le témoin T (Bérénice) ne présente qu'une intense bande **pr** ; chez A3 l'intensité de cette bande est déjà plus faible, de même que chez G1 et G2. Quant à A1, il présente, en plus de cette bande, une **cp** d'intensité moyenne, et A2 voit **pr** devenir évanescente au profit d'une **cp** très marquée.

Le point essentiel est maintenant de comparer les croisements réciproques pour lesquels, rappelons-le, les génomes sont identiques puisque issus du même couple de parents. Dans le tableau diallèle, ils sont placés de façon symétrique par rapport à la diagonale des autofécondations.

Si l'on se réfère tant à l'intensité des bandes qu'à leur diversité, seuls les couples réciproques G1A2-A2G1, G2T-TG2, G2A2-A2G2, et G2A3-A3G2 paraissent ne présenter ici aucune différence.

Remarquons que, outre les fréquentes dissymétries d'expression observables selon le sens de croisement, des bandes **cp** apparaissent quelquefois à partir de parents qui ne présentent que **pr**. Ainsi en est-il de TG1 (+1 **cp** intense) et de G1T (+ 2 **cp** dont une intense, et l'autre faible) ou encore de G2T et TG2 qui présentent de façon identique 2 **cp** (l'une intense, l'autre faible) qui n'existent pas chez les géniteurs.

De même, A2 qui, seul, présente une très faible bande **pr**, peut en croisement engendrer des individus tel A2T, qui mis à part la bande **pr** de T et la **cp** de A2, exprime une autre **cp** de faible intensité, et TA2 qui diffère de son réciproque, et présente **pr** et une **cp** très évanescente. Ce cas se reproduit encore pour G1G2, avec 2 **cp** très faibles.

Ajoutons que A3 et G1, qui ne présentent qu'une **pr**, aboutissent à la création de A3G1 pour lequel la **pr** disparaît presque au profit d'une **cp** intense, cette expression diffère d'ailleurs de celle du réciproque G1A3 qui n'a qu'une **pr** intense.

Chez les grains issus de croissement, ces expressions qui se distinguent de celles de chacun des deux parents ne pourraient-elles se classer parmi les effets de transgression, de façon semblable aux cas déjà observés lors des analyses biométriques (10, 11, 12, 15).

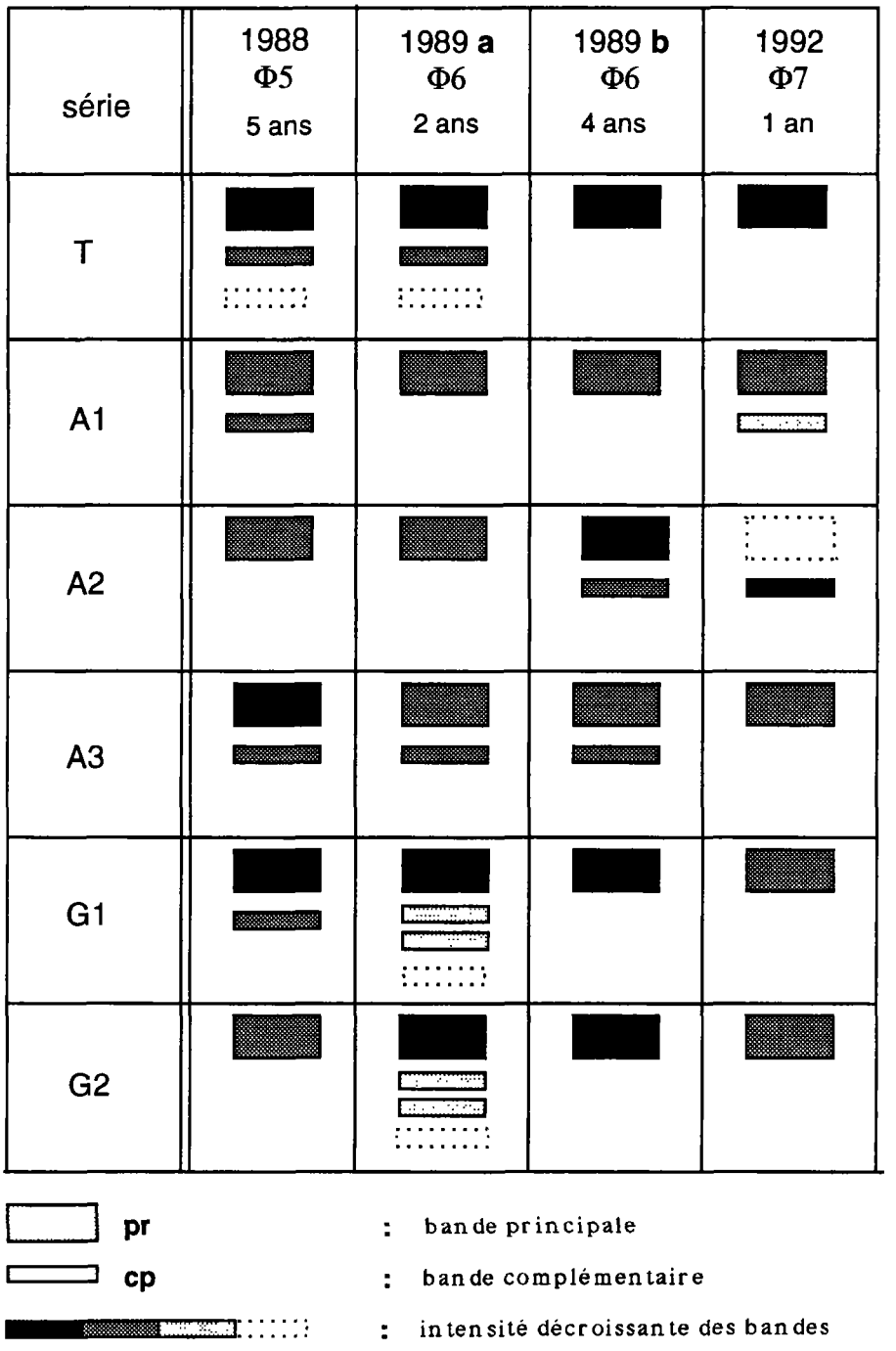


Figure 1. Électrophorégrammes des ß amylases du grain pour les autofécondations des vitro-variants et du témoin. Comparaison des grains issus des récoltes : 1988 (produits Φ5, grains de 5 ans), 1989 (produits Φ 6), 1989/a : analysé en 1991 (grains de 2 ans), 1989/b : analysé en 1993 (grains de 4 ans), 1992 (produits Φ 7, grains de 1 an). Dans la majorité des cas, il apparaît une bande principale **pr**, il peut aussi y avoir des bandes complémentaires **cp**.

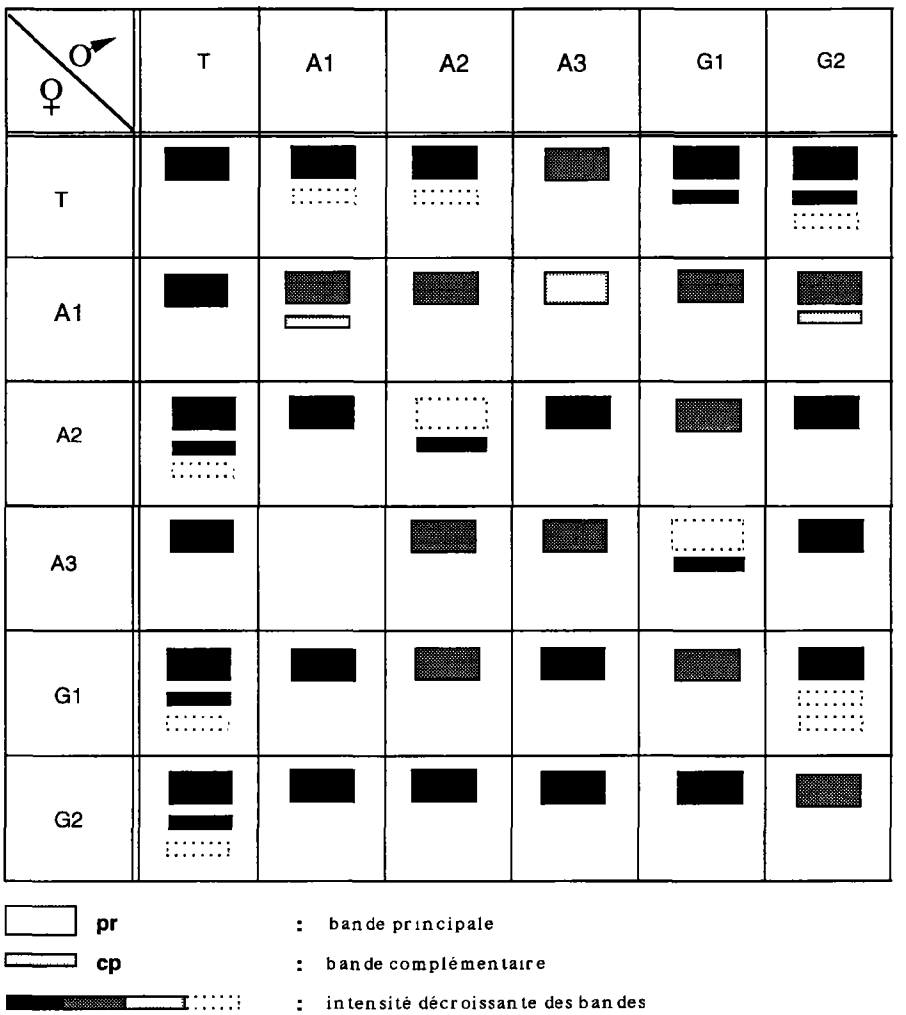


Figure 2. Électrophorégrammes des ß amylases du grain pour les croisements diallèles et les autofécondations. Le nom des parents est inscrit en entrée du tableau. La diagonale contient les observations effectuées sur les autofécondations. Les croisements réciproques se trouvent dans les couples de cases symétriques par rapport à la diagonale. De nombreuses dissymétries de comportement peuvent être observées comme par exemple pour le couple issu du croisement réciproque de G1 avec A3, ou avec G2, ou avec T, ou bien avec G2 avec A1, ou encore de A2 avec T, etc.

Conclusions

Sans aller plus avant dans le descriptif des résultats de ce tableau, il ressort principalement de cet ensemble que les familles issues des vitrovariants diffèrent du témoin de façon plus ou moins marquante, avec l'apparition quelquefois d'une bande complémentaire, ou la disparition presque totale de la bande principale, ou encore une intensité plus ou moins marquée de cette bande.

Par ailleurs, malgré la constitution identique du noyau des produits réciproques, des réponses distinctes peuvent être très fréquemment observées entre ces croisements.

Des bandes complémentaires peuvent apparaître à partir de parents qui n'en possèdent pas (croisement de T avec G1), ou encore disparaître à partir de parents qui en possédaient (croisement de A1 avec A2).

De même, la bande principale peut pratiquement s'effacer comme pour A3G1, sans que cela concerne le réciproque G1A3.

Ajoutons que les grains de chaque catégorie donnent des résultats équivalents lors des diverses répétitions, ce qui n'est guère étonnant puisque les autofécondations n'ont jamais donné de ségrégation, et que les croisements sont les produits directs de ces parents.

Ainsi, une succession d'analyses [15] avait déjà conduit à l'hypothèse de l'expression, après culture *in vitro*, de modifications héréditaires impliquant l'intervention de systèmes dits épigéniques [11].

Ici, les dissymétries de comportement, exprimées au travers des électrophorégrammes des β amylases, montrent qu'un même génome peut avoir des expressions diversifiées par l'intermédiaire de systèmes que l'on ne peut exclusivement associer au cytoplasme maternel, ou paternel. Cela s'accorde avec l'hypothèse de la modification de systèmes épigéniques lors de la culture *in vitro*. Ceux-ci agiraient sur le comportement de ces vitrovariants issus d'haplodiploïdisation. La confirmation de cette hypothèse sera apportée par l'analyse des descendances d'autofécondation des produits de croisement.

Références

1. Blanc S (1990). Androgenèse chez l'orge *(Hordeum vulgare)* et vitrovariation. DAA Amélioration génétique et biotechnologies ; DEA Biotechnologies et industries alimentaires. INPL-ENSAIA 2, av. de la Forêt-de-Haye, 54505 Vandœuvre, 29 p.
2. Kandil M (1990). Hérédité épigénique de vitrovariants obtenus par haplodiploïdisation chez l'orge *(Hordeum vulgare).* Analyse des croisements diallèles et de leurs descendances par autofécondation. Thèse Doc de l'INPL. Sciences agronomiques, opt. génétique. 2, av. de la Forêt-de-Haye, 54505 Vandœuvre, 116 p.
3. Joudrier P (1983). Contribution à l'étude génétique de la β amylase du grain de blé tendre. Thèse Doc ès-Sciences Univ. Paris-Sud, Orsay, 128 p.
4. Marandon F, Vincent A (1991). Haplodiploïdisation et vitrovariation chez *Hordeum vulgare.* DAA Amélioration génétique et biotechnologies ; DEA Biotechnologies et industries alimentaires. INPL-ENSAIA 2, av. de la Forêt-de-Haye, 54505 Vandœuvre, 23 p.
5. San-Noeum H (1976). Haploïdes d'*Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* d'ovaires non fécondés. *Ann Amélior Pl* 26 : 751-754.
6. San-Noeum H, Ahmadi N (1982). Variability of doubled haploïds from *in vitro* androgenesis and gynogenesis in *Hordeum vulgare* L. In : Earle ED, Demarly Y, eds. *Variability in plants regenerated from tissue culture.* Praeger New York : 273-283.

7. Sibi M (1974). Création de variabilité par culture de tissus *in vitro* chez *Lactuca sativa* L. Thèse Spéc Amélior Pl. Univ Paris-Sud Orsay, 142 p.
8. Sibi M (1976). La notion de programme génétique chez les végétaux supérieurs. Obtention de variants par culture de tissus *in vitro* chez *Lactuca sativa* L, apparition de vigueur chez les croisements. *Ann Amélior Pl* 26 (4) : 523-547.
9. Sibi M (1979). Expression of cryptic genetic factors *in vivo* and *in vitro*. In : Zeven AC, Van Harten AM, eds. *Broadening genetic base crops*. Pudoc. Wageningen : 339-340
10. Sibi M (1981). Hérédité de variants épigéniques obtenus par culture de tissus *in vitro* chez les végétaux supérieurs. Thèse Doc ès-Sc Amélior Pl Univ Paris-Sud, Orsay, 280 p.
11. Sibi M (1982). Heritable epigenic variation from *in vitro* tissue culture of *Lycopersicum esculentum* (var. Monalbo). In : Earle ED, Demarly Y, eds. *Variability in plants regenerated from tissue culture*. Praeger New York : 228-244.
12. Sibi M (1986). Non mendelian heredity. Genetic analysis of variant plants regenerated from *in vitro* culture : epigenetics and epigenics. In : Semal J, ed. Gembloux Belgique. *Somaclonal variation and crop improvement*. M Nijhoff Publish. Hingham MA 02034 USA : 53-83.
13. Sibi M (1989). Vitrovariations ou variations somaclonales ? In : *Amélioration et protection des plantes vivrières tropicales*. Paris : AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext : 27-49.
14. Sibi M (1990). Genetic bases of variation from *in vitro* tissue culture. In : Bajaj YPS, ed. *Somaclonal variation in crop improvement* I. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol 11 Springer-Verlag Berlin Heidelberg : 112-133.
15. Sibi M, Kandil M (1993). Marqueurs biochimiques de la vitrovariation chez des haplodiploïdes d'orge *(H. vulgare)* In : *Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes ?* Paris : AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext : 283-299.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 355-369.

38

L'haplodiploïdisation : un outil multi-usage pour la génétique et l'amélioration des céréales

EMMANUEL PICARD, ÉLISABETH CRAMBES,
AATIKA MIHAMOU-ZIYYAT

Université Paris-Sud, Centre Universitaire, Bât. 332, Service de Biologie Végétale, 91405 Orsay Cedex, France.

Résumé

Les méthodes de production d'haploïdes doublés et plus particulièrement celles faisant appel à l'haplodiploïdisation in vitro, *biotechnologie dont on fête le trentième anniversaire cette année, ont déjà eu un impact sur la génétique et l'amélioration des plantes. Cet impact a toutes les chances de s'amplifier dans les années à venir. En effet, cette biotechnologie offre non seulement la possibilité d'obtenir plus rapidement des lignées totalement homozygotes – la sélection de ces lignées en est simplifiée par la suite en raison de l'absence de biais dû à l'hétérozygotie, et la réponse à la sélection est accrue – mais elle permet également de simplifier certaines analyses en génétique quantitative et se révèle être un outil remarquable en marquage moléculaire. C'est dire son importance stratégique, tant dans le domaine de l'application que dans celui de la recherche plus fondamentale. Nous nous intéresserons, dans cet article, à trois aspects. Tout d'abord, nous essaierons de dresser un bilan succint des progrès de cette technologie sous l'angle de son insertion dans les programmes de sélection et par conséquent, au niveau de la création variétale, en rappelant les principales raisons pour lesquelles les haploïdes doublés sont un matériel de choix. Dans une seconde partie, nous donnerons un aperçu des progrès récents obtenus dans le domaine des méthodes de culture* in vitro *et notamment des cultures de microspores isolées. Ces dernières per-*

mettent en effet d'envisager de mettre au point des systèmes haploïdes monocellulaires élégants, ouvrant la voie non seulement à des productions en masse d'haploïdes doublés, mais aussi à des expériences de sélection in vitro *ou de manipulations génétiques avec des chances de réussite accrues par rapport aux autres méthodes existantes. Enfin, nous ferons une revue des principaux thèmes de recherche chez lesquels l'haploïdie joue un rôle significatif, ou bien tout simplement des questions posées à la recherche par ce système de reproduction particulier.*

Impact de l'haplodiploïdisation sur la sélection

Rappel des avantages et des limites de cette méthode de sélection

Quand on double le nombre chromosomique des plantes haploïdes, cela pouvant se faire d'ailleurs spontanément ou bien artificiellement, on duplique du même coup toute l'information génétique de chacun de leurs chromosomes et l'on obtient ainsi, en une étape, l'équivalent de plus de dix années d'autofécondation, c'est-à-dire des lignées complètement homozygotes (lignées pures). L'haplodiploïdisation permet donc au sélectionneur d'obtenir plus rapidement ces lignées pures dont il a besoin dans ses programmes, de juger leur valeur agronomique avec une meilleure précision, et, en fin de compte, d'obtenir plus aisément soit de nouvelles variétés « lignées pures » s'il travaille sur une plante autogame, soit de nouveaux parents d'hybrides s'il sélectionne une plante allogame, soit encore de nouveaux clones. Il n'y a pas d'effet de biais dû à l'hétérosis, comme c'est le cas en F2 ou en F3. Les gènes, qu'ils soient récessifs ou dominants, s'expriment tous ; aucun n'est masqué.

Dans une population d'haploïdes doublés issus d'un croisement, la variance additive est deux fois plus importante que celle de la population de plantes F2 issues de l'autofécondation du même croisement, permettant aussi une maximisation de la part de l'additivité et de l'épistasie *cis,* une expression de tous les gènes (allèles) et en particulier des gènes récessifs masqués, ce qui permet une valorisation et une optimisation de ces effets additifs ou d'épistasie [10, 11, 28, 30]. L'haplodiploïdisation est une méthode que l'on peut appliquer à n'importe quelle génération au cours d'un programme de sélection classique. Cependant, son niveau d'application dépendra toujours de l'héritabilité des caractères que l'on cherche à améliorer, et de la structure du croisement de départ.

Le passage par l'état haploïde permet également une simplification de l'analyse génétique : par exemple, dans le cas d'une mutation, la lecture directe de la mutation est possible à l'état haploïde. Il permet aussi une étude plus facile de l'effet de dosage des gènes, de la disjonction des caractères et de la localisation des gènes chez les lignées monosomiques. De plus, il facilite, aussi bien chez les espèces autogames que chez les espèces allogames, l'analyse de la « valeur en lignées » des croisements, c'est-à-dire de la moyenne des lignées dérivables d'un croisement, et c'est aussi un outil de base très intéressant pour la sélection récurrente.

Dans le cas des plantes allogames, comme le maïs et le tournesol, outre le fait que l'haplodiploïdisation accélère la phase de fixation du matériel génétique et donc l'obtention des lignées inbred (dans ce cas complètement homozygotes) dont il faudra tester les aptitudes à la combinaison, elle offre aussi l'énorme avantage de ne plus avoir à faire de tri intradescendance comme dans la sélection généalogique classique, du fait même de leur homozygotie. Toute la variabilité génétique additive, composante principale de l'aptitude générale à la combinaison, se trouve ainsi éclatée entre familles. Par

ailleurs, on a pu montrer que l'obtention de quelques dizaines d'HDs à partir de populations-sources permettrait de juger la valeur en combinaison de ces populations en testant ces HDs en croisement avec un testeur. Chez le tournesol, on peut ajouter que l'haplodiploïdisation par androgenèse *in ovulo* permettrait la conversion rapide sur cytoplasmes mâles stériles des lignées. Par ailleurs, l'haplodiploïdisation permettrait un accès plus facile à la variabilité du genre *Helianthus,* car elle accélèrerait l'introgression de résistances aux maladies, du fait de la simplification des effets génétiques.

Limites de l'haplodiploïdisation

Chez certaines espèces, le taux de plantes haploïdes doublées obtenues est souvent trop faible pour que ces plantes puissent être utilisées dans un programme de sélection classique. Il y a en effet dans ce cas un risque élevé de perte d'allèles. L'haplodiploïdisation fixe immédiatement les produits d'une méiose et n'autorise donc plus d'autres recombinaisons. En revanche, la sélection généalogique et la bulk peuvent, chacune à leur façon, utiliser le reliquat de zones hétérozygotes qui subsiste au cours des générations précoces (F3, F4) sur les bras chromosomiques et dans lesquelles des crossing-over efficaces peuvent avoir lieu.

Bilan de la création variétale par haplodiploïdisation

Chez des familles aussi importantes que les crucifères, les céréales, les liliacées et les solanacées, l'haplodiploïdisation est couramment utilisée et de plus en plus largement dans les programmes de sélection publics ou privés. Il existe deux points de vue chez les sélectionneurs quant au meilleur stade d'insertion de l'haploïdie dans leurs schémas de sélection. Il y a ceux qui préfèrent haploïdiser tout de suite, dès la F1, puis rejeter par la suite dans les populations d'HDs obtenues plus de génotypes. La sélection dans ce cas suit strictement la fixation. Cette méthode est très certainement la plus efficace pour tous les caractères fortement soumis au milieu où la sélection en F2 n'est pas efficace (cas de faible héritabilité, caractères polygéniques). Cette méthode a abouti, notamment, à la création de la première variété HD inscrite au catalogue des variétés en France par les établissements Desprez, la variété « Florin » [5] et toujours second blé cultivé en Belgique. Puis il y a ceux qui préfèrent haploïdiser après une ou deux années de sélection généalogique au champ en F2, voire en F3. Cette méthode hybride est très certainement efficace pour les caractères héritables, elle permet ainsi au sélectionneur d'écarter rapidement des génotypes indésirables. Dans tous les cas, les produits sont des lignées homozygotes, donc plus aisément jugeables [22-24]. Pour l'orge, par exemple, il y a une différence impressionnante entre la complexité des parcelles de lignées F3 ou F4 où il est toujours difficile de faire un choix à cause de la structure des plantes, et une série de lignées HD provenant du même croisement. Les lignées HD sont plus facilement typables. De nombreuses études ont par ailleurs démontré que l'haplodiploïdisation *in vitro,* même si elle provoque, comme nous l'évoquons par ailleurs, des vitrovariations ou des phénomènes de sélection *in vitro,* conduisant à des distorsions par rapport aux disjonctions observées en autofécodation (F2, F3, etc.), a abouti largement à des produits utilisables en sélection. Cette nouvelle méthode semble bien avoir les mêmes chances de produire de bonnes lignées que les méthodes plus traditionnelles. De plus, de nombreuses études ont montré que, même avec de faibles effectifs, l'HDion a un potentiel identique aux autres méthodes. Le Tableau I rassemble, pour quelques céréales, les principaux exemples de variétés HDs connues à travers le monde.

Tableau I. Bilan des variétés de céréales obtenues par haplodiploïdisation.

Céréales	
Orge	Nombreuses variétés : en Europe (Danemark, Allemagne, France), au Canada, aux États-Unis, en Nouvelle Zélande. Ex: Rodeo, Mingo, Craig, TBR 579.5, TBC 555.1, Gwilan, Michka
Blé tendre	Nombreuses variétés en Chine (Jinghua. 1, Huapei), quelques résultats en Europe. En France Florin tjrs cultivé en Belgique ; deux variétés. GKI : Delibab, Ambitus : « BR 43 »
Riz	Nombreuses variétés en Chine, au Japon, en Inde, en Afrique (IRRAT)
Triticale	Premières lignées en France (INRA)

On peut estimer peut-être à 250 000 environ le nombre d'haploïdes doublés créés annuellement dans l'ensemble des laboratoires privés et publics chez les seules espèces colza, blé tendre et orge. Le tableau ne reflète cependant pas toute la vérité, car une partie des sélectionneurs qui utilisent couramment cette méthode, et parfois sur une large échelle, ne mentionnent pas chaque fois à partir de quelles méthodes ont été obtenues leurs variétés ; et cela volontairement, comme certains l'ont dit à l'auteur de ces lignes. La raison qu'ils invoquent est qu'ils ne veulent pas effrayer leur clientèle (les débats publics sur la transgénèse ont des retentissements partout) ou bien que la réputation qu'ont les cultures *in vitro* de provoquer des vitrovariattions pourrait nuire à l'image commerciale de leurs produits.

L'application de ce mode rapide de reproduction en consanguinité pour la sélection de lignées pures ou de lignées parentales pour la création d'hybrides a connu un réel succès. Si l'on prend l'exemple du colza dans nos régions (cas de la variété « Goéland » par exemple) ou du canola canadien, plusieurs variétés haploïdes doublées existent sur le marché et sont utilisées par les agriculteurs. Récemment, la création de cultivars modernes, hybrides de choux de Milan, de Bruxelles ou de broccolis, a commencé à s'appuyer sur l'haploïdie et notamment la culture de microspores isolées [26], méthode qui apparaît comme une alternative extrêmement valable pour la sélection rapide des lignées parentales. Toujours en ce qui concerne les plantes légumières, le rôle joué par l'haploïdie apparaît de plus en plus grandissant [25]. On peut donc dire que l'haploïdie a véritablement déjà joué son rôle biotechnologique, au sens où ces plantes ont servi l'industrie des semences et, plus généralement, ont apporté un progrès génétique. Mais, il nous semble qu'il convient de rester modeste, car le nombre de variétés issues de l'haplodiploïdisation est, somme toute, relativement faible encore, ne représentant qu'un tout petit pourcentage de la totalité des variétés mises sur le marché.

Progrès récents obtenus dans le domaine de l'haplodiploïdisation : les cultures de microspores isolées

L'haplodiploïdisation a connu sur le plan méthodologique une évolution assez rapide au cours des 7 dernières années [54]. Récemment, après des progrès sans précédent dans le domaine des cultures en milieux liquides ou semi-liquides, ce sont surtout les méthodes de cultures de microspores isolées, initialement mises au point chez le

tabac [34, 50] et le colza [12], qui ont fait l'objet des recherches les plus actives. Ces méthodes conduisent à l'établissement de cultures de microspores obtenues après diverses techniques de broyage des anthères, suivi de filtrations et de centrifugations. Les principaux avantages des microspores isolées peuvent être résumés comme suit. Ce sont des systèmes de cultures monocellulaires, haploïdes et à faible polymorphisme. Les microspores ne sont plus soumises aux contraintes des parois des anthères et, de ce fait, sont soustraites à une partie des effets dus à la plante mère. En général, cette méthode donne de meilleurs résultats que la culture d'anthères. Sur le plan pratique, la culture de microspores isolées réduit donc les coûts de production des HDs par un allègement substantiel de la phase de mise en culture. Aujourd'hui, cette méthode est largement appliquée chez le colza et l'orge par les sélectionneurs privés.

D'autre part, en ce qui concerne la recherche, les techniques de microspores isolées permettent de placer celles-ci dans des conditions de nutrition par rapport au milieu beaucoup plus uniformes que dans l'anthère où il était fréquent d'observer des effets « position ». En conséquence, le modèle « microspores isolées » est celui qui rendra possible des expériences de sélection *in vitro* sans ambiguité pour des caractères exprimés précocement *in vitro* au stade gamétophytique. Un autre avantage, en recherche, est que les microspores isolées ouvrent la voie à des études cellulaires, cytologiques et moléculaires des processus de réorientation des microspores et d'induction androgénétique. Enfin, le modèle « microspores isolées », très analogue aux modèles « cellules isolées » ou « protoplastes », devrait faciliter les expériences de transformation génétique des plantes au niveau haploïde, par la voie balistique, par électroporation ou par incorporation, tout en évitant une phase trop longue de conversion des embryons en plantes entières, génératrice de vitrovariations.

Un nombre important de paramètres entrent en jeu pour la réussite de la culture de microspores isolées, comme par exemple les conditions de croissance des plantes mères, le stade de développement des microspores au moment de leur extraction, ou les conditions de culture (densité des microspores, milieu, hormones). Le stade des microspores est souvent le même que celui observé pour les cultures d'anthères comme, par exemple, chez les céréales [16, 38, ou 39]. On a démontré aussi qu'il existait une sensibilité des microspores au cours des 24 premières heures de culture, vis-à-vis d'éléments toxiques sécrétés par elles-mêmes dans le milieu de culture.

Pour certaines espèces, comme le tabac, l'orge, le blé et le riz, l'obtention des embryons et des plantes par ces méthodes de pollen isolé ont tout d'abord requis une préculture des anthères [50]. Chez le riz [16], la culture en *shed* pollen, c'est-à-dire en pollen répandu hors des anthères dans le milieu, montre que les variétés de type « Japonica » répondent beaucoup mieux que les variétés de type « Indica », en ce qui concerne la production d'embryons et l'obtention de plantes vertes fertiles. Kasha *et al* [38, 39], sur la variété d'orge « Igri », obtiennent des microspores isolées en faisant macérer, pendant 3 à 4 jours, les anthères dans une solution de mannitol à 120 $g.l^{-1}$. L'inconvénient de cette technique est qu'une partie des microspores restent prisonnières dans les anthères [74]. Depuis les premières recherches, cette phase de préculture a été supprimée chez le colza puis chez l'orge.

Le Tableau II [15] résume les principaux travaux publiés ayant abouti à un succès dans le domaine des cultures de microspores isolées, en donnant des éléments sur les stades des microspores qui ont été employés, les types de culture, les génotypes. Dans tous les cas, les chercheurs ont essayé de développer leur modèle sur 1 ou 2 génotypes. Cependant, il faut savoir que cette méthode est appliquée au colza et à l'orge pour la création l'obtention d'HDs sur de larges éventails de croisement.

Tableau II. Principales références sur les méthodes de culture de microspores isolées.

Stades	Types cultures	Espèces	Génotypes	Auteurs
UM-UT	PC puis MI	Orge	Igri	Ziauddin *et al.* [74]
UM-UT	PC puis MI	Orge	Igri	Hoekstra *et al.* [35]
UM-BJ	PC puis MI	Orge	Igri and Gimpel	Mordhorst and Lörz [46]
BJ-BM	MI	Orge	Sabarlis	Wei *et al.* [69]
UT-BJ	PC puis MI	Riz	Type Indica	Cho and Zapata [9]
UJ-UM	SP	Riz	Types Indica and Japonica	Datta *et al.* (1990) [16]
UT	MI	Maïs	Seneca 60	Coumans *et al.* [13]
UT-BJ	MI	Maïs	DH5 × DH7	Gaillard *et al.* [27]
UT	MI	Tomate	Gardener	Deberg and Nitsch [19]
U	IM	Datura		Nitsch et Norreel [49]
M	MI	Tabac	Red Flower, Coulo, Sylvestris	Nitsch [50]
M	MI	Tabac	Atropurpurea	Wernicke and Kohlenbach [71]
M-BJ	PC puis MI	Tabac	White burley	Sunderland and Roberts [80]
BJ	PC puis MI	Tabac	Badischer Burley	Heberle-Bors and Reinert [34]
BM	PC puis MI	Tabac	Samsun	Kyo and Harada [41]
UT-PM	MI	Colza	Triton and G231	Kott *et al.* [40]
UT-BJ	MI	Colza	Topaz	Pechan and Keller [53]
BM-T	MI	Chou blanc		Cao *et al.* [6]

UM : uninucléé médian
UT : uninucléé tardif
PM : prémitose
M : mitose
BJ : bicellulaire jeune
BM : bicellulaire moyen
T : tricellulaire
PC : préculture
MI : microspores isolées
SP : « shed pollen »

Les comparaisons entre cultures d'anthères et cultures de microspores ne sont possibles que lorsqu'on a traduit le nombre d'anthères mises en culture par un nombre correspondant de microspores contenues dans celles-ci. Hoekstra *et al* [35] ont montré ainsi, au cours d'une étude comparative entre les 2 méthodes, culture d'anthères (CA) et culture de microspores isolées (MI), menées chez le cultivar Igri (*Hordeum vulgare* L.), qu'il était possible d'obtenir 6,5 fois plus d'embryons et une amélioration de 40 % à 50 % du taux de régénérations chlorophylliennes avec la méthode des microspores isolées. Chez l'orge, Ziauddin *et al.* [74], Kasha *et al.* [38, 39], obtiennent 0,12 % à 0,4 % d'efficacité des MI en plantes en supposant que les anthères contiennent 2 500 microspores, ce qui est 4 à 5 fois supérieur à la CA. Chez le maïs, les pourcentages en CA ou MI sont sensiblement les mêmes : 0,02 % à 0,036 % des microspores sont induites [27, 54], et 10 % des embryons régénèrent une plante. Coumans *et al* [13] obtiendraient, chez le maïs, une efficacité en plantes de 0,1 %. Actuellement, en MI, seul le colza donne de très bons résultats : l'efficacité en embryons atteint 7,8 % [57]. Siebel et Pauls [65] ont effectué une comparaison approfondie des 2 techniques, CA/MI. Il en ressort que les MI sont 10 fois plus productives

que la CA mais que les plantes issues des 2 techniques ne diffèrent pas dans leur comportement physiologique (dates de floraison, d'épiaison et de maturation). Chez le riz, l'efficacité en embryons, exprimée en pourcentage d'embryons par microspore, peut être estimée à 3,5 % [9] ; exprimée en pourcentage de plantes par microspore, elle chute à 0,004 %, voire 0,001 % suivant les variétés Indica et Japonica [16]. Le tournesol n'a pas connu encore de succès dans le domaine des microspores isolées malgré de nombreux essais.

Chez le blé aussi, les recherches sur les méthodes de cultures de microspores isolées ont progressé. Ainsi, il y a quelques années, Datta et Wenzel [16] avaient montré qu'un choc thermique de 6 à 8 jours au froid stimulait les divisions nucléaires des microspores isolées, obtenues par expulsion passive à l'extérieur des anthères *(shed pollen)*, et que c'était la combinaison d'une forte concentration de 2,4 D à 5 mg/l et de ficoll 10 %, dans un milieu contenant de l'hydrolysat de caséine et de la proline, qui permettait l'initiation de l'embryogenèse. Cependant, ces auteurs n'avaient pas obtenu de plantes et les microspores n'étaient isolées que mécaniquement. Plus récemment, des travaux ont montré qu'il était possible d'obtenir des plantes haploïdes à partir de microspores isolées des anthères dès le début de la culture, soit en les cultivant avec des ovaires [44], soit en cultivant les microspores seules [67]. Nous avons nous-mêmes [15] obtenu également des résultats très intéressants en microspores isolées de blé tendre et les avons comparés avec ceux obtenus en même temps en culture d'anthère pour 6 génotypes : les MI donnent en général 9 à 10 fois plus d'embryons que les CA, alors que le taux de régénération dépend beaucoup plus du génotype, avec cependant parfois une supériorité encore de la CA. Cependant, avec la lignée HD 112, nous avons obtenu 1 055 plantes androgénétiques vertes pour 16 épis, après un broyage direct des épillets au Warring Blendor, double filtration, deux centrifugations et mise en culture des microspores isolées, à la concentration de 10^5 microspores ml-1, en milieu Chu liquide, modifié, additionné de glucose 0,26 M et en les cocultivant avec des ovaires de la même variété. Nous avons donc confirmé les résultats de Mejza *et al* [44], mais le milieu que nous utilisons résulte de plusieurs années de recherche. Nous pensons que nous pouvons proposer HD 112 comme génotype modèle pour la culture de microspores isolées chez le blé, comme Igri ou Topaz le sont chez l'orge et le colza réciproquement. En effet, 2 à 3 microspores sur mille donnent un embryon et la fréquence des microspores donnant une plante haploïde chlorophyllienne chez ce génotype est égale à 10^{-3}, soit 10 fois moins que celle observée chez Topaz ou Igri. Le modèle est donc sans doute perfectible, si l'on se rappelle que les travaux sur le colza ont débuté en 1985.

Principales voies de recherche liées à l'haplodiploïdisation

Nous l'avons déjà vu ci-dessus avec les microspores isolées, la manipulation de la phase haploïde avec les développements récents des techniques ouvre la voie sans aucun doute à de nombreuses recherches. Cette dernière partie est donc consacrée à un aperçu de ces sujets qui sont liés à l'haploïdie.

Le cas des espèces récalcitrantes

Malgré les résultats parfois spectaculaires de l'androgenèse ou des microspores isolées chez certaines espèces, il en existe qui restent récalcitrantes à l'androgenèse *in vitro* ou

dont la réussite est partielle ou faible, voire nulle. Chez le maïs, il est connu qu'à part quelques génotypes sélectionnés, comme par exemple des HDs à haute fréquence d'induction [2], le matériel qui intéresse les sélectionneurs répond très faiblement. C'est aussi le cas du blé dur. Chez cette espèce, la phase d'induction des embryons androgénétiques se passe comme chez les espèces non récalcitrantes, telles que le blé tendre ou l'orge, mais les problèmes apparaissent pendant la phase de régénération où les embryons, pour la majorité des génotypes, ne régénérent que des plantes albinos ou des racines. Ainsi, seules quelques plantes chlorophylliennes avaient été obtenues par les différentes équipes. Plus récemment, Mihamou-Ziyyat [45] a mené une étude assez extensive sur une collection de 174 lignées de blé dur et a pu ainsi montrer qu'il existe néanmoins chez cette espèce un petit nombre (environ 10 % des lignées testées) de lignées aptes à donner en androgenèse *in vitro* des plantes chlorophylliennes. Leurs performances sont alors tout à fait comparables à celles des génotypes de blé tendre embryogènes. Au total, plus d'une cinquantaine de plantes haploïdes chlorophylliennes ont ainsi été produites. Un programme de croisement a été lancé pour étudier le mode de transmission de leur aptitude à l'androgenèse. Avant que les méthodes d'androgenèse *in vitro* soient mises au point sur le blé dur, ce sont les méthodes faisant appel aux croisements intergénériques, notamment avec le maïs, qui permettent d'obtenir des plantes haploïdes chlorophylliennes, et par suite des haploïdes doublés chez cette espèce [1, 14, 59].

Marquage de l'aptitude à l'haploïdie

Devant la variabilité génétique et spécifique de l'aptitude à répondre *in vitro,* il est logique que des travaux commencent à paraître sur les possibilités de repérage, à l'aide de marqueurs cytologiques ou moléculaires, de cette aptitude. Ainsi Sangwan et Sangwan-Norreel [62] ont montré que le caractère récalcitrant ou favorable à l'androgenèse des espèces peut être marqué par la différenciation plus ou moins précoce des proplastes en amyloplastes au cours de la gamétogenèse mâle. Les espèces connues comme étant favorables à l'haploïdie *in vitro* n'accumulent de l'amidon dans leur pollen qu'au stade bi-cellulaire alors que cela se passe très précocement chez les espèces récalcitrantes, les amyloplastes étant observables pendant toute la gamétogenèse. Ces organites cytoplasmiques sont connus pour ne pas pouvoir se dédifférencier *in vitro.* Un autre exemple : chez le maïs, la corrélation entre la synthèse d'une protéine de 32 kd et l'aptitude à répondre en androgenèse a été mise en évidence [68]. Elle est induite par le prétraitement au froid des panicules avant leur mise en culture. Également, chez une variété de blé tendre connue pour ses bonnes performances androgénétiques et cultivée *in vitro* dans deux conditions, l'une favorable et l'autre défavorable à l'haploïdie, Reynolds et Kitto [58] ont pu mettre en évidence, grâce aux techniques de screening différentiel de banques d'ADNc, des clones spécifiques des toutes premières étapes de l'androgenèse. La nature et le rôle de ces gènes exprimés ainsi spécifiquement sont encore inconnus.

L'albinisme

Le problème de l'albinisme est un problème majeur en androgenèse *in vitro* et spécifique de cette méthode de production d'haploïdes. On peut dire qu'il est particulièrement aigu chez les céréales comme le blé dur, l'orge, le seigle. Il a été démontré chez le blé tendre et l'orge que les plantes albinos issues de l'androgenèse présentent des

délétions très importantes dans leur génome chloroplastique [17, 18]. Dans le cas où les plantes sont chlorophylliennes, leurs génomes chloroplastiques ne sont pas affectés par le processus *in vitro* comme cela a été démontré par Rode *et al* [60] chez le blé ou par Charmet *et al* [8] chez le Triticale. Tuvesson *et al* [66] avaient montré, par ailleurs, chez le blé tendre, que cet albinisme est sous le contrôle de deux groupes de gènes nucléaires. Le premier est composé de gènes à effets principalement additifs contrôlant le pourcentage de régénérations chlorophylliennes à cause de leur effet sur l'aptitude globale du matériel à régénérer. Le deuxième groupe, composé de quelques gènes dominants ou à effets épistatiques, affecterait la fréquence à l'origine des structures chlorophylliennes. Aujourd'hui, cependant, aucune explication n'a été donnée, ni des mécanismes qui sont à l'origine de ces délétions massives, ni sur leur localisation spatio-temporelle. On ne sait pas, en particulier, si les délétions préexistent dans les microspores avant leur mise en culture ou bien ont lieu pendant la phase de culture. Une étude comparée, menée par Mourilzen et Holm [47] chez l'orge, sur les variétés Igri et Alexis, très différentes en ce qui concerne leurs aptitudes à donner des plantes albina, montrent que les erreurs de réplication de l'ADN chloroplastique ne débuteraient qu'au cours de la phase de régénération, c'est-à-dire tardivement.

Les embryons d'origine androgénétique comme source de souches cellulaires pour obtenir des protoplastes pour la transformation génétique.

Il a été démontré récemment chez l'orge [36] que le meilleur matériel de départ pour établir des suspensions cellulaires aptes à la régénération et pouvant servir de cibles pour des plasmides se trouve être les embryons androgénétiques eux-mêmes. En effet ils permettent d'établir en quelques semaines (de 8 à 10) des suspensions cellulaires à partir desquelles on peut isoler des protoplastes aptes à l'organogenèse, et donc constituant un matériel de choix pour la transformation. Cependant, l'établissement de telles souches embryogènes entraîne parfois l'apparition de stérilités mâles chez les plantes régénérées.

D'autres recherches menées par exemple chez le colza ou l'orge démontrent que les embryons haploïdes d'origine androgénétique sont eux-mêmes un matériel excellent quand ils sont utilisés comme explants primaires pour la transformation génétique, soit par la voie *Agrobacterium,* soit par la voie balistique à condition cependant de disposer d'un système efficace de régénération d'embryons secondaires à partir des explants transformés [43, 48].

Les microspores isolées comme modèle idéal pour la transformation génétique des espèces récalcitrantes à *Agrobacterium*

Le système des microspores isolées apparaît bien comme étant une des meilleures solutions pour le génie génétique des espèces peu ou pas réceptives aux techniques de transformation par *Agrobacterium.* C'est le cas des céréales. En effet, il permet non seulement une conversion rapide des embryons en plantes, mais également les événements de transformation pourront être fixés plus immédiatement à l'état homozygote après doublement chromosomique, simplifiant ainsi l'analyse génétique par la suite. Des résultats positifs de transformation utilisant des cultures de microspores isolées chez le colza, l'orge et le tabac ont été obtenus récemment, avec soit le canon à particules, soit la transformation par absorption directe [37, 72].

Les vitrovariations au cours des processus *in vitro*

Des vitrovariations (ou variations gamétoclonales) sont en effet couramment observées à la suite d'un ou de plusieurs cycles d'androgenèse chez les céréales [77, 31, 55] aussi bien que chez le tabac ou *Nicotiana sylvestris* [51, 52]. L'analyse de ces variations chez les haploïdes doublés a été faite également au niveau des ADN nucléaires et cytoplasmiques par Rode *et al* [60, 61] ou par Charmet *et al* [8]. Des variations dans certaines régions de l'ADN nucléaire, telles que l'espaceur non transcrit de l'ADN ribosomal, ont été mises en évidence. Les caractères affectés par l'androgenèse *in vitro* sont nombreux : hauteur, précocité, rendement, caractéristiques biochimiques, résistance aux maladies, etc. Les travaux de Sibi et Kandil [63] et Sibi et Fakiri [64] sur l'orge ont montré que l'on peut obtenir des variations aussi bien en androgenèse qu'en gynogenèse *in vitro* et ce, pour des caractères biométriques et biochimiques, notamment les alpha-amylases.

Bjornstad *et al.* [3, 4], dans le cadre de comparaison de méthodes de production d'haploïdes doublés et de lignées homozygotes chez l'orge et le blé, ont fait une synthèse des résultats obtenus récemment en ce qui concerne les variations provoquées par le passage par l'haploïdie, et surtout montré qu'il existe une interaction génotype x, méthode très significative. Cependant, pour reprendre Demarly et Sibi [21], les lignées issues des méthodes de sélection « classiques », utilisant l'autofécondation, telles que la sélection généalogique inventée par les Vilmorin, seront génétiquement différentes des lignées issues d'haplodiploïdisation, au niveau notamment du découpage de l'information génétique le long des bras chromosomiques. En effet, l'HD va fixer les recombinaisons ayant eu lieu dans le génome de la F1 ; de grands secteurs issus de chaque parent se retrouveront donc chez les lignées HD, et les interactions entre allèles auront donc beaucoup d'importance. Le marquage dense du génome par les marqueurs moléculaires permettrait sans nul doute de résoudre cette question très intéressante. Dans le Tableau II, nous donnons une liste de quelques travaux qui ont été consacrés à l'analyse des différences entre méthodes. L'androgenèse *in vitro,* qui avait été soupçonnée d'être génératrice de vitrovariations systématiquement défavorables, n'apparaît plus ainsi à la suite de tels travaux.

La sélection *in vitro* pour la tolérance aux stress

Puisque ces modifications se produisent somme toute assez fréquemment, elles sont actuellement étudiées dans le cadre d'expériences de sélection *in vitro,* au cours desquelles on soumet les microspores ou les cellules des sacs embryonnaires à des pressions de sélection dirigées : forte salinité, températures élevées [45, 63]. L'objectif de telles recherches, proposées par exemple par Lashermes [42], qui reposent non seulement sur la possibilité d'obtenir des vitrovariations, mais également sur la perspective de sélectionner au niveau gamétique et d'obtenir, à l'aide de ces processus d'haplodiploïdisation *in vitro,* réalisés dans des conditions stressantes, de nouvelles lignées tolérantes aux stress environementaux (sécheresse, salinité, hautes températures, froids, etc.). Très peu de résultats ont été obtenus jusqu'à aujourd'hui dans ce domaine. Citons cependant les travaux de Ye *et al* [73] qui ont montré pour la première fois qu'une sélection *in vitro* était possible chez l'orge pour la résistance à la salinité.

Les haploïdes doublés comme matériel idéal pour le marquage moléculaire

Si l'on fait le bilan de tous les grands programmes internationnaux de marquage moléculaire chez les céréales, on peut observer qu'ils sont en grande partie basés sur des populations d'haploïdes doublés. C'est le cas notamment pour le programme nord-américain de marquage de l'orge, dont le matériel est constitué de quelques populations de 150 à 200 haploïdes doublés obtenues à partir des croisements de référence : Steptoe × Morex ou Harrington × TR-306 [33]. Il en est de même pour le programme allemand de marquage du génome de l'orge. De même, au CIMMYT, une partie du programme du génome du blé s'appuie sur une population d'HDs de blé (Lacaze P., com. pers.).

Les raisons d'un tel intérêt pour des populations d'HDs sont les suivantes : *a)* l'haplodiploïdisation donne des lignées définitivement fixées à partir d'un croisement ; on parle de lignées « éternelles » ; *b)* le nombre d'individus génétiquement identiques chez un HD étant quasiment illimité, cela permet une meilleure appréciation des interactions génotypes × milieux de ces lignées par le fait que l'on peut multiplier les répétitions ; *c)* contrairement aux analyses sur F2 ou back-cross, les HDs permettent une utilisation de tout le polymorphisme, les gènes dominants et co-dominants pouvant être pris en compte et enfin *d)* les corrélations QTL × marqueurs pourront être estimées avec une meilleure précision en cas de faible héritabilité. Carbonell *et al* [7] ont démontré, grâce à un modèle statistique, qu'avec une population de 250 HDs on peut détecter dans 90 % des cas des QTLs individuels présentant une héritabilité très faible de 0.05 par exemple.

Les microspores isolées, un modèle pour l'analyse cytologique fine des processus de réorientations embryogènes

Enfin, les microspores isolées sont un matériel très accessible pour des études de cytologie concernant les premières phases de l'embryogenèse haploïde. En effet, dans ce cas on est débarrassé des parois des anthères et les techniques d'immunofluorescence ou de fluorescence sont plus facilement utilisables. De plus, il n'est pas sans intérêt de comparer différents processus d'embryogenèse haploïde : cultures d'anthères, cultures en *shed pollen,* microspores isolées. Déjà, des résultats ont été publiés chez le colza qui montrent que la première division embryonnaire qui intervient chez les microspores isolées de cette espèce est en général symétrique, ce qui est contraire à ce qui se passe habituellement au cours de la permière division zygotique [32].

Conclusion

Nous avons essayé de montrer non seulement que l'haplodiploïdisation est un outil utile en création variétale, mais qu'il doit également faire partie intégrante de tout programme de recherche en génétique de plantes comme les céréales [70]. Son rôle tant dans le domaine du marquage moléculaire que dans celui de la transformation génétique apparaît de plus en plus évident. Il ne fait aucun doute que, dans l'avenir, ce rôle ira en se renforçant.

Références

1. 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.
2. Barloy D, Denis L, Beckert M (1989) Comparison of the aptitude for anther culture in some androgenetic doubled haploid maize lines. *Maydica* 4 : 303-308.
3. Bjornstad A, Skinnes H, Uhlen AK, Marum P, Maroy G (1993). Genetic marker segregations in doubled haploids in spring wheat crosses. *Hereditas* 118 : 55-62.
4 Bjornstad A, Skinnes H, Thoresen K (1993). Comparisons between doubled haploid lines produced by anther culture, the *Hordeum bulbosum* method and lines produced by single seed descent in barley crosses. *Euphytica* 66 : 135-144.
5. De Buyser J, Henry Y, Lonnet P, Hertzog R, Hespel A (1987). « Florin » : a doubled haploid wheat variety developed by anther culture method. *Plant Breed* 98 : 53-56.
6. Cao MQ, Charlot F, Doré C (1990). Embryogenèse et régénération de plantes de chou à choucroute *(Brassica oleracea* L. ssp capitata) par culture *in vitro* de microspores isolées. *CR Acad Sci* Paris, 310 (3) : 203-209.
7. Carbonnel EA, Asins MJ, Baselga M, Balensard E, Gerig TM (1993). Power studies in the estimation of genetic parameters and the localisation of quantitative trait loci for backcross and doubled haploid populations. *Theor Appl Genet* 86 : 411-416.
8. Charmet G, Vedel F, Bernard M, Bernard S, Mathieu C (1985). Cytoplasmic variability in androgenetic doubled haploid lines of triticale. *Agronomie* 5 : 709-717.
9. Cho MS, Zapata FJ (1988). Callus formation and plant regeneration in isolated pollen culture of rice *(Oryza sativa* L. Taipei 309). *Plant Sci* 58 : 239-244.
10. Choo TM, Christie BR, Reinbergs E (1979). Doubled haploids for estimating genetic variances and a scheme for population improvement in self-pollinated species. *Theor Appl Genet* 54 : 267-271.
11. Choo TM, Reinbergs E, Kasha KJ (1985). Use of haploids in breeding barley. *Plant Breeding Rev* 3 : 219-247.
12. Chuong PK, Beversdorf WD (1985). High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *Brassica carinata. Braun Plant Sci* 39 : 219-226.
13. Coumans MP, Sohota S, Swanson EB (1989). Plant development from isolated microspores of *Zea mays* L. *Plant Cell Rep* 7 : 618-621.
14. Coumans MP, Boutouchent B, Dusautoir JC, Kaan F (1993). Obtention d'embryons par croisements interspécifiques entre le blé dur et d'autres céréales. In : *Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale.* Montpellier, Paris : INRA : 375-381.
15. Crambes E, Picard E (1994). *Efficient androgenetic green plant production by isolated microspore method in wheat.* Poster. VIIIth International Congress of plant tissue and cell culture. Florence, 12-17 juin.
16. Datta SK, Wenzel G (1987). Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in *Triticum aestivum* L. *Plant Sci* 48 : 49-54.
17. Day A, Ellis THN (1984). Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen : possible basis for maternal inheritance of chroplasts. *Cell* 39 : 359-368.
18. Day A, Ellis THN (1985). Detected forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. *Curr Genet* 9 : 671-678.
19. Debergh P, Nitsch C. Premiers résultats sur la culture *in vitro* de grains de pollen isolés de tomate. *CR Acad Sci* Paris, 276 (D) : 1281-1284.
20. Demarly Y (1975). Anther and pollen culture for production of haploids. Their utilization in plant breeding. Proc. Cong. Eucarpia « Ploidy in Fodder Plants », Zürich : 142-154.
21. Demarly Y, Sibi M (1989). *Amélioration des plantes et biotechnologies.* AUPELF. Éditions John Libbey Eurotext, 152 p.
22. Demarly Y (1989). Technical aspects of plant biotechnologies. In : Sasson A, Costarini V, eds. *Plant biotechnology for developing coutries,* FAO/CTA, 47-58.

23. Devaux P (1989). Haplodiploïdisation chez l'orge. *Biotechnologies et plantes de grande culture.* Congrès ADEBIO. CCIT Toulouse 19-20 oct 1989. Résumé.
24. Dieu P, Pagniez M (1989). L'haplodiploïdisation ou l'épopée du jeune grain de pollen. *La Recherche* n° 208 Supplément, 60-63.
25. Doré C (1992). *Application of biotechnological techniques to vegetables.* Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent, 57, 4a : 1499-1505.
26. Duijs JG, Voorips RE, Visser DL, Custer JBM (1992). Miscrospore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. *Euphytica* 60 : 45-55.
27. Gaillard A, Vergne P, Beckert M (1991). Optimization of maize microspore isolation and culture conditions for reliable plant regeneration. *Plant Cell Rep* 10 : 55-58.
28. Gallais A (1987). Place de l'haplodiploïdisation dans les schémas de sélection. *Sél Français* 36 : 47-58.
29. Gallais A (1988). A method of line development using doubled haplois : the single doubled haploid descent recurrent selection. *Theor Appl Genet* 75 : 330-332.
30. Griffing B (1975). Efficiency changes due to use of doubled haploids in recurrent selection methods. *Theor Appl Genet* 46 : 367-386.
31. Guiderdoni E (1991). Gametic selection in anther culture of rice *(Oryza sativa* L.) *Theor Appl Genet* 81 : 406-412.
32. Hause B, Hause G, Pechan P, Van Lammeren AAM (1993). Cytoskeletal changes and industion of embryogenesis in microspore and pollen cultures of *Brassica napus* L. *Cell Biol Int* 17, 2 : 153-168.
33. Hayes P (1992). *Molecular marker assisted analyses in barley.* Communication au séminaire d'échange et d'information d'Agrogène SA. Marquage moléculaire. Évry.
34. Heberle-Bors E, Reinert J (1979). Androgenesis in isolated pollen cultures of *Nicotiana tabacum* L. : dependence upon pollen development. *Protoplasma* 99 : 237-245.
35. Hoekstra S, Van Zijderveld MH, Louwerse JD, Heidekamp F, Van der Mark F (1992). Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. *Igri Plant Sci* 86 : 89-96.
36. Jänhe A, Lazzeri PA, Jäger-Gussen M, Lörz H (1991). Plant regeneration from embryogenic cell suspensions derived from anther cultures of barley *(Hordeum vulgare* L.) *Theor Appl Genet* 82 : 74-80.
37. Jähne A, Becker D, Lörz H (1994). *Regeneration of transgenic microspore derived fertile barley.* Poster. VIIIth International Congress of plant tissue and cell culture. Florence, 12-17 juin.
38. Kasha KJ, Ziauddin A, Simion E, Marsolais AA, Chen YR (1990). Improved plant regeneration from shed microspore cultures in barley *(Hordeum vulgare* L.) cv. *Igri Plant Cell Rep* 9 : 69-72.
39. Kasha KJ, Ziauddin A, Simion E, Marsolais AA, Chen YR (1990). Barley and wheat microspores culture. In : Van der Plas LHW, Van Aartrijk J, eds. *Progress in plant cellular and molecular biology.* NJJ Nijkamp, Amsterdam.
40. Kott L, Polsoni L, Ellis B, Beverdorf WD (1988). Autotoxicity in isolated microspore cultures of *Brassica napus. Can J Bot* 66 : 1665-1670.
41. Kyo M, Harada M (1986). Control of the developmental pathway of tobacco pollen *in vitro. Planta* 1688 : 427-432.
42. Lashermes P (1989). Screening for stress tolerant genotypes via microspore *in vitro* culture. In : Acevedo E, Conesa AP, Monneveux Ph, eds. *Physiology and breeding of winter cereals for stressed Mediterranean environments,* Montpellier, France, July 3-6, Srivastava JP, INRA/ICARDA, Paris, 1991, Colloques n° 55 : 461-474.
43. Lörz H, Barcelo P, Becker D, Brettschneider R, Jähne A, Lütticke S, Rother S, Zimmy J (1994). *Transgenic cereal crops mediated by biolistic transformation of primary explants.* Poster et communication. VIIIth International Congress of plant tissue and cell culture. Florence, 12-17 Juin.
44. Mejza SJ, Morgant V, Bona Di DE, Wong JR (1993). Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum. Plant Cell Rep* 12 : 149-153.

45. Mihamou-Ziyyat A (1992). I. *Réactions aux températures élevées du blé tendre au cours de l'androgenèse* in vitro *et conséquences sur la physiologie des plantes obtenues.* II. Recherches sur les méthodes de production d'haploïdes doublés de blé dur *(Triticum durum* Desf.) Thèse de Doctorat. Université Paris XI, 224p.
46 Mordhorst AP, Lörz H (1993). Embryogenesis and developpement of androgenetic barley *(Hordeum vulgare)* microspores are influenced by the amount and composition of nitrogen sources in culture media. *J Plant Physiol* 142 : 485-492.
47. Mourilzen P, Holm PB (1994). *Albinism in microspores culture of barley* (Hordeum vulgare) *results from chloroplast genome breakdown during regeneration.* Poster. VIIIth International Congress of plant tissue and cell culture. Florence, 12-17 juin.
48. Nehlin L, Glimelius K (1994). *Microspores and microspore-derived embryos in* Brassica napus. *A potential system for genetic manipulations.* Poster. VIIIth International Congress of plant tissue and cell culture. Florence, 12-17 juin.
49. Nitsch C, Norreel B (1973). Effet d'un choc thermique sur le pouvoir embryogène du pollen de *Datura innoxia* cultivé dans l'anthère ou isolé de l'anthère. *CR Acad Sci (D)* 276 : 303-306.
50. Nitsch C (1974). Pollen culture – a new technique for mass production of haploid and homozygous plants. In : Kasha, ed. *Haploids in higher plants. Advances and potential.* Proceedings of the first international symposium on haploids. June 1974. University of Guelph, 123-135.
51. Paepe de R, Bleton D, Gnangbe F (1981). Basis and extend of genetic variability among doubled haploid plants obtained by pollen culture in *Nicotiana sylvestris. Theor Appl Genet* 59, 3 : 177-184.
52. Paepe de R, Prat D, Huguet T (1982). Heritable nuclear DNA changes in doubled haploid plants obtained by pollen culture of *Nicotiana sylvestris. Plant Sci Lett* 28 : 11-28.
53. Pechan PM, Keller WA (1988). Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus. Physiol Plant* 74 : 377-384.
54. Pescitelli SM, Johnson CD, Petolino JF (1990). Isolated microspore culture of maize : effects of isolation technique, reduced temperature, and sucrose level. *Plant Cell Rep* 8 : 628-631.
55. Picard E, Rode A, Benslimane A, Parisi L (1986). Gametoclonal variations in doubled haploids of wheat : biometrical and molecular aspects. In : Semal J, ed. *Somaclonal variation and crop improvement.* Sept. 3-6 1985. Gembloux, Belgique : 136-147.
56. Picard E, Crambes E, Liu GS, Mihamou-Ziyyat A (1994). Évolution des méthodes d'haplodiploïdisation et perspectives pour l'amélioration des plantes. *C R Soc Biol* 188 : 107-139.
57. Polsoni L, Kott LS, Berversdorf WD (1988). Large-scale microspore culture technique for mutation-selection studies in *Brassica napus. Can J Bot* 66 : 1681-1685.
58. Reynolds TL, Kitto SL (1992). Identification of embryoid-abundant genes that are temporally expressed during pollen embryogenesis in wheat anther cultures. *Plant Physiol* 100 : 1744-1750.
59. Riera-Lizarazu O, Mujeeb-Kazi A, William MDHM (1992). Maize *(Zea mays* L.) mediated polyhaploid production in some Triticeae using a detached method. *J Genet Breed* 46 : 335-346.
60. Rode A, Hartmann C, Dron M, Picard E, Quétier F (1985). Organelle genome stability in anther derived doubled haploids of wheat *(Triticum aestivum* L.) cv. Moisson. *Theor Appl Genet* 71 : 320-324.
61. Rode A, Hartmann C, Benslimane A, Picard E, Quétier F (1987). Gametoclonal variation detected in the nuclear ribosomal DNA from doubled haploids lines of a spring wheat *(Triticum aestivum* L.) cv. Cesar. *Theor Appl Genet* 74 : 31-37.
62. Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS (1987). Ultrastructural cytology of plastids of pollen grains of certain androgenic and nonandrogenic plants. *Protoplasma* 138 : 11-22.
63. Sibi ML, Kandil M (1993). Marqueurs biochimiques de la vitrovariation chez les haplodiploïdes d'orge *(Hordeum vulgare). Le progrès génétique passe-t-il par le repérage des gènes ?* AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext. Paris : 283-299.

64. Sibi ML, Fakiri M (1994). *Vitrovariations chez les orges* (Hordeum vulgare) *issus d'haplodiploïdisation. Analyses des β amylases chez les croisements diallèles.* Actes du colloque AUPELF UREF de Namur (article sous presse).
65. Siebel LJ, Pauls KP (1989). Comparison of anther and microspore culture as a breeding tool in *Brassica napus. Theor Appl Genet* 78 : 473-479.
66. Tuvesson IKD, Pedersen S, Andersen SB (1989). Nuclear genes affecting albinism in wheat *(Triticum aestivum* L.) anther culture. *Theor Appl Genet* 78 : 879-883.
67. Tuvesson IKD, Öhlund RCV (1993). Plant regeneration through culture of isolated microspores of *Triticum aestivum* L. *Plant Cell Tissue Org Cult* 34 : 163-167.
68. Vergne P, Riccardi F, Beckert M, Dumas C (1993). Identification of a 32 kDa anther marker protein response in maize, *Zea mays* L. *Theor Appl Genet* 86 : 843-850.
69. Wei ZM, Kyo M, Harada H (1986). Callus formation and plant regeneration through direct culture of isolated pollen of *Hordeum vulgare* cv. Sabarlis. *Theor Appl Genet* 72 : 252-255.
70. Wenzel G, Graner A, Jahoor A, Foroughi-Wher B (1994). Haploids – an integral part of applied and basic breeding research. Poster et communication. VIIIth International Congress of plant tissue and cell culture. Florence, 12-17 juin.
71. Wernicke W, Kohlenbach HW (1977). Experiments on the culture of isolated microspores in *Nicotiana* and *Hyoscyamus. Z Planzenphysiol* 81 : 330-340.
72. Yao Q, Simion E, Kasha KJ (1994). Isolated microspore cultures as the target for biolistic transformation of barley. Poster. VIIIth International Congress of plant tissue and cell culture. Florence, 12-17 juin.
73. Ye JM, Kao XN, Harvey BL, Rossnagel BG (1987). Screening salt tolerant barley genotypes via anther culture in salt stress media. *Theor Appl Genet* 74 : 426-429.
74. Ziauddin A, Simion E, Kasha KJ (1990). Improved plant regeneration from shed microspore culture in barley *(Hordeum vulgare* L.) cv. *Igri Plant Cell Rep* 9 : 69-72.
75. Sunderland N, Roberts M (1977). New approach to pollen culture. *Nature* 270 : 236-238.

PARTIE V

Les étiquetages et repérages moléculaires

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 373-385.

39

Utilisation des RAPD en cartographie génétique et pour l'analyse phénétique. Application à l'étude du genre *Petunia*

D. PELTIER [1], A. BERVILLÉ [2], H. DULIEU [1]

1. Université de Bourgogne et INRA, BV 1540, 21034 Dijon, France.
2. INRA-ENSAM, 2, place P. Viala, 34060 Montpellier, France.

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) [13] permet, à partir d'un ADN matrice et de 2 amorces oligonucléotidiques, d'augmenter de manière quasi exponentielle le nombre de fragments limités par des séquences homologues aux amorces dans l'ADN matrice. On obtient alors l'amplification des fragments encadrés par les amorces. Lorsqu'on utilise une seule amorce de petite taille (8 à 12 bases), dont la séquence est choisie au hasard tout en respectant certaines règles quant à sa composition (contenu en GC), on peut constater, après PCR, l'amplification de fragments à partir d'un ADN génomique. Le nombre et les séquences des fragments amplifiés varient selon l'amorce utilisée. L'amplification de l'ADN génomique de deux génotypes différents, avec une même amorce, peut révéler des variations se traduisant par la présence ou l'absence d'un fragment donné selon le génotype. On dispose alors d'un fragment d'ADN polymorphe amplifié au hasard ou RAPD *(random amplified polymorphic* DNA*)* [22]. Ce RAPD représente un marqueur anonyme potentiel.

Les marqueurs RAPD sont traités comme des marqueurs dominants [23] ; la présence d'un fragment est considérée comme allèle de son absence. Dans ce cas, le génotype d'un hétérozygote se traduit par la présence d'un fragment amplifié ; il est indiscernable de celui d'un homozygote pour la présence du fragment. On peut cependant supposer l'existence de fragments allèles, à la suite d'une délétion par exemple, mais ce

type de situation semble rare. D'un point de vue pratique, ce type de marqueur se caractérise par une plus grande facilité de mise en évidence par rapport aux marqueurs de type RFLP ou microsatellites.

Les marqueurs RAPD ont permis l'établissement de cartes génétiques pour différentes espèces *(Arabidopsis* [12], Luzerne [6]) et la réalisation d'études de diversité génétique [18].

Petunia hybrida est une création horticole par hybridation interspécifique relativement jeune, puisque son origine remonte à 170 ans. Cette espèce a fait l'objet de nombreux travaux en génétique et biologie cellulaire et moléculaire [4, 8]. Son choix se justifie, d'une part, par la grande variabilité existant dans cette espèce pour des caractères morphologiques, la réponse aux différentes vitrotechniques, et, d'autre part, son cycle de reproduction court et sa facilité de culture. Les travaux réalisés ont permis l'identification de 97 gènes affectant des caractères morphologiques [5] ; l'utilisation conjointe de la cytogénétique et de la génétique a permis de regrouper ces marqueurs sur les 7 chromosomes de cette espèce [5]. L'ordre dans les groupes n'est pas déterminé à quelques exceptions près. La réalisation d'une carte ordonnée avec les marqueurs morphologiques nécessite un gros investissement en termes de temps et de matériel. Nous avons donc réalisé une carte génétique en utilisant des marqueurs moléculaires de type RAPD.

La taxonomie du genre *Petunia* est réalisée sur la base de caractères morphologiques. La première, réalisée par Fries [7], est basée sur la couleur de la corolle (blanche ou rouge) et sur sa morphologie. Plus récemment, Smith et Downs [15] réalisèrent une taxonomie en se basant sur la morphologie du calice et sur le type herbacé ou arbustif des espèces. Enfin Wijsman [20, 2], en se basant sur le caryotype des différentes espèces et la compatibilité de celle-ci lors de la réalisation de croisements, proposa une séparation du genre *Petunia* en un genre *Stimoryne* regroupant les espèces à 2n = 14 et un genre *Petunia* regroupant les espèces à 2n = 18. Nous avons utilisé les RAPD et l'analyse phénétique afin d'étudier la taxonomie du genre *Petunia* sur la base de marqueurs moléculaires. Nous avons par ailleurs étudié un ensemble de lignées de *P. hybrida* afin de déterminer les relations entre cette espèce et les espèces ancestrales apparentées.

Nous avons cherché les fragments cartographiés dans les espèces ancestrales apparentées à *P. hybrida* afin de préciser l'origine de la variabilité existant dans cette espèce et d'établir éventuellement son origine introgressive. Nous avons utilisé un ensemble de 7 espèces du genre *Petunia* et de 10 lignées de *P. hybrida* pour réaliser des amplifications d'ADN. La coïncidence de taille entre deux fragments amplifiés n'est pas une preuve de l'homologie de leurs séquences. Nous avons donc cherché à établir les différences éventuelles entre une analyse de la diversité basée sur un relevé de fragments caractérisés par leurs tailles ou basée sur un relevé des fragments présentant des séquences homologues. Ces relevés ont servi de base au calcul de matrices de distances génétiques. Les matrices obtenues ont permis de tracer des phénogrammes que nous comparons.

Réalisation d'une cartographie génétique de *P. hybrida*

Matériel et méthodes

Nous avons choisi les lignées St40 et Tlv1 pour réaliser la cartographie. Chaque chromosome de ces deux lignées porte un locus identifié, déterminant un caractère morpho-

logique. La composition allélique de ces lignées pour ces marqueurs permet de déterminer dans un rétrocroisement le génotype de chaque individu. De ce fait, il est possible d'affecter les groupes de liaison aux chromosomes par coségrégation. Cent individus d'un croisement (St40 × Tlv1) × Tlv1 ont été utilisés pour réaliser l'analyse de ségrégation. Les extractions d'ADN total ont été réalisées selon Bernatzky et Tanksley [2] ; l'étape de purification sur gradient de CsCl n'a pas été réalisée. Les mêmes extraits ont été utilisés tout au long des expériences pour les individus ségrégeants. Deux extractions différentes d'ADN des parents et de l'hybride ont été utilisées, l'une pour la recherche de RAPD, l'autre pour la réalisation de témoins lors des analyses de ségrégation. Nous avons employé 80 amorces fournies par la société Operon technologies (kits H, J, V, U) pour rechercher des RAPD spécifiques de St40. Les conditions d'amplification utilisées sont les suivantes :

Tris-HCl pH 8,8 : 0,067 M
$MgCl_2$: 0,003 M
$(NH_4)_2SO_4$: 0,0166 M
amorce : 4 µM
dNTPs : 500 µM de chacun
Taq DNA polymérase (Boehringer) : 1,5 U

Chaque réaction est réalisée dans un volume de 25 µl avec 40 ng d'ADN génomique. Après ajout de 50 µl d'huile de paraffine, on effectue 30 répétitions d'un cycle 92 °C 1 mn ; 38 °C 1 mn ; 74 °C 1 mn 30 avec un appareil Biométra « triothermoblock ». Après amplification, 8 µl du milieu de réaction sont analysés, les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse 4 h à 100 V dans du tampon TAE 1X dans un gel d'agarose à 2,2 % (20 × 20 cm) puis colorés au bromure d'éthidium (Sigma). Le gel présente deux rangées de puits et deux séries de dépôts sont réalisées sur un même gel. Pour chaque amorce, chaque gel d'analyse des ségrégations intègre, comme témoins, des amplifications réalisées en même temps que l'amplification des ségrégeants, à partir de l'ADN de St40, de Tlv1 et de leur hybride. La compatibilité de la ségrégation 1 : 1 de chaque RAPD a été testée par calcul du χ^2.

L'analyse des résultats a été réalisée en utilisant le logiciel Mapmaker 2.0 [10]. Un « Lod score » de 3,0 a été retenu comme seuil pour la détermination des groupes de liaisons. L'ordre des marqueurs dans les groupes est déterminé par analyse multipoints.

Résultats

Les 80 amorces testées (kits operon H, J, V, Q, U) ont généré 54 RAPD de St40 pouvant être suivis dans un backcross (St40 × Tlv1) × Tlv1). La ségrégation de 35 d'entre eux a été analysée. Chaque RAPD est identifié par la référence de l'amorce operon, suivie de la taille estimée du fragment. La carte génétique obtenue est présentée Figure 1. Six groupes de liaisons (soit 25 RAPD) sont rattachés par un marqueur morphologique à un chromosome ; un groupe de 8 marqueurs n'est pas affecté. Le chromosome IV n'est pas marqué et 2 RAPD ne sont rattachés à aucun autre marqueur. Cette carte couvre 269,2 cM avec une distance moyenne entre marqueurs de 8,2 cM.

La carte génétique de *Petunia hybrida* publiée dans « Genetic maps 1990 » [5] comprend 116 marqueurs affectés aux groupes de liaisons dont une centaine correspond à des gènes contrôlant des caractères morphologiques. Du fait de la difficulté (en terme de temps de travail et de coût) à réaliser des tests permettant d'ordonner ces marqueurs, l'ordre dans les groupes de liaison n'est pas déterminé, à quelques exceptions

près. La carte présentée est à ce jour la seule réalisée par analyse multipoints de ségrégation de marqueurs moléculaires chez *Petunia*. Les RAPD ont permis dans le cas de cette espèce de réaliser une carte génétique à un coût et dans des délais raisonnables. Cette carte sera complétée en fonction des besoins des différents programmes en cours.

Caractérisation de l'origine des fragments cartographiés

Matériel et méthodes

Le genre *Petunia* comprend des espèces à 2n = 14 et 2n = 18 chromosomes [19]. Nous avons choisi *P. axillaris*, *P. parodii*, *P. inflata*, *P. integrifolia* et *P. violacea* comme représentant des espèces à 2n = 14 et *P. linearis* et *P. parviflora* comme représentant des espèces à 2n = 18 (Tableau I). Nous avons réalisé des amplification à partir de l'ADN de ces espèces avec les mêmes amorces et dans les mêmes conditions que pour l'analyse de ségrégation.

Tableau I. Origine du matériel végétal utilisé.

Espèce	Code	2n	Couleur	Origine
P. parviflora		18	Pourpre	USA Collection Sink
P. linearis	S11	18	Rose violacé	Institute of Genetics, Amsterdam
P. parodii		14	Blanc	USA Collection Sink
P. integrifolia	S13	14	Rose violacé	Institute of Genetics, Amsterdam
P. axillaris	M1	14	Blanc	USA Cornell University
P. inflata	DII	14	Pourpre	Collection Dijon
P. violacea	S10	14	Pourpre	Institute of Genetics, Amsterdam
P. hybrida	lignées	14		
	Ta2		Pourpre	Cultivar « Velours rouge »
	Tlh1		Violet dilué	Haploïde doublé à partir de la lignée Tl67
	Sk176b		Rose pâle	Cultivar « Satin rouge »
	Pc6		Magenta	Cultivars « Salmon Gem », « Moonstone » et « Velours rouge »
	Tlv1		Violet dilué	Cultivars « Salmon Gem » et « Velours rouge »
	Tb1-3		Pourpre	Cultivar « Velours rouge »
	St40		Rose très pâle	Cultivars « Fire Chief », « Rose du ciel » et « Violet »
	St43		Rose violacé	Cultivars « Fire Chief », « Rose du ciel » et « Violet »
	Tlh7		Violet très pâle	Haploïde doublé : « Mitchell » (Michell *et al.* 1980) Rose du ciel x *P. axillaris*
	Rlkh1		Blanc	Haploïde doublé (Tlv1 x St43) x St43

L'ensemble des génotypes provient de la collection de la Station d'Amélioration des Plantes de l'INRA Dijon. Le code indiqué identifie le matériel dans cette collection. L'origine précise la collection d'origine du matériel ou dans le cas des lignées l'ascendance dont est issu le génotype.

Lorsqu'un fragment de même taille que le fragment cartographié est amplifié à partir de l'ADN d'une espèce, nous considérons que la présence de ce fragment dans *P. hybrida* témoigne d'une introgression. Afin de vérifier les homologies entre fragments amplifiés, nous réalisons des hybridations. Nous avons procédé à la récupération de 20 fragments cartographiés chez St40 (Figures 1 et 2), en utilisant la technique de *squeeze-freeze* [17] après électrophorèse. Les fragments sont marqués par *random priming* (kit Boehringer) au α^{32}PdCTP. L'ensemble des produits d'amplification obtenus avec la même amorce que celle générant le fragment sonde est hybridé après transfert selon Southern [16] sur une membrane nylon (Biohylon + Bioprobe system). L'hybridation est réalisée à 65 °C pendant une nuit dans une solution 6X SSC ; 5 X Denhart ; 0,1 % SDS. La membrane est rincée à 65 °C, 20 mn dans une solution 2 X SSC ; 0,1 % SDS, puis 20 mn dans une solution 0,2 X SSC ; 0,1 % SDS. Différentes expositions (15 mn à 2 h), adaptées à l'intensité des signaux, ont été réalisées à – 70 °C, entre des écrans intensificateurs, sur film radiographique Blue X (Valca).

Résultats

Vingt-huit des 35 marqueurs cartographiés ont été mis en évidence dans les espèces. Nous pouvons ainsi constituer une carte synthétique de l'origine des RAPD cartographiés (Figure 2). Ceux-ci peuvent être mis en évidence dans plusieurs espèces à 2n = 14. Nous ne mettons en évidence aucun RAPD pouvant provenir des espèces à 2n = 18.

Discussion

La technique de récupération des fragments amplifiés utilisée ne permet pas de garantir que la sonde est constituée d'un seul type de produit d'amplification. Si 2 fragments sont confondus du fait de leur quasi-identité de taille, une incertitude intervient quant à l'interprétation du signal d'hybridation. Le fragment hybridé dans une espèce peut ne pas correspondre au fragment cartographié supposé constituer la sonde. Néanmoins, l'erreur d'interprétation porte alors sur la situation du locus ou sur l'espèce d'origine du fragment hybridé mais ne met pas en cause l'interprétation selon laquelle il y a eu introgression dans *P. hybrida*.

P. hybrida résulte de l'hybridation interspécifique. Les hypothèses quant au croisement d'origine le font dériver de *P. integrifolia* x *P. axillaris*. Nous retrouvons chez *P. hybrida* des RAPD amplifiés dans les espèces apparentées dont nous avons vérifié l'homologie. Cela témoigne du caractère stable et héritable des RAPD.

P. hybrida est une création récente (170 ans). A cette échelle de temps, il est difficile de supposer que la variabilité mise en évidence dans l'espèce puisse avoir pour origine la mutation. Le nombre important de marqueurs cartographiés (28/35) retrouvés dans les espèces apparentées permet d'établir qu'une grande part de la variabilité de *P. hybrida* provient de la variabilité existant entre les espèces ancestrales. La variabilité existant dans *P. hybrida* a donc une origine introgressive. De plus la répartition des RAPD cartographiés entre les 5 espèces à 2n = 14 permet de supposer que la base génétique à partir de laquelle fut créée *P. hybrida* est plus large que celle généralement admise.

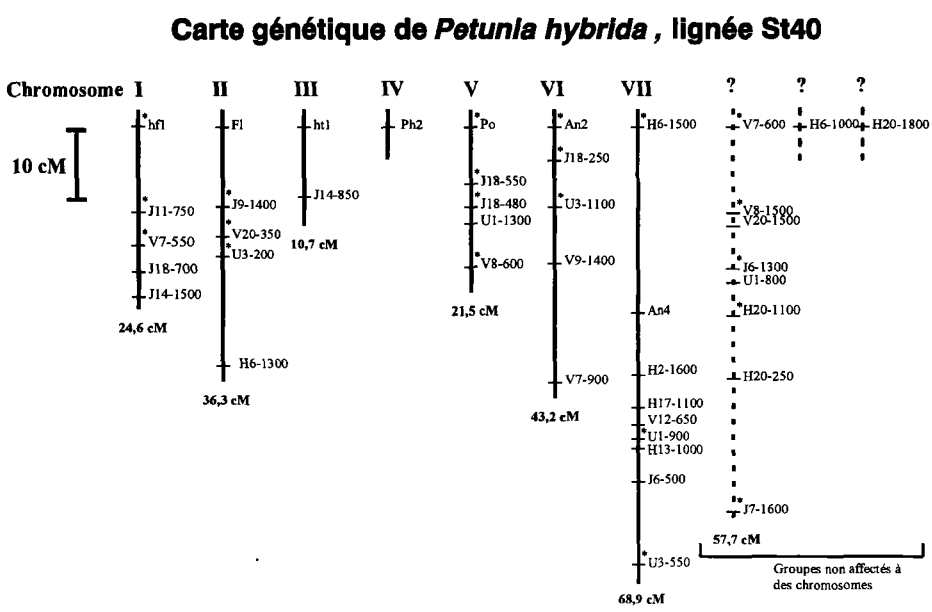


Figure 1. Les marqueurs repérés par * sont ordonnés avec un Lod score supérieur à 3,0 (logiciel Mapmaker 2.0). Les autres loci ne peuvent être ordonnés avec la même limite (Lod score < 3.0). Tous les groupes de liaisons ont été définis avec un Lod score > 3,0.

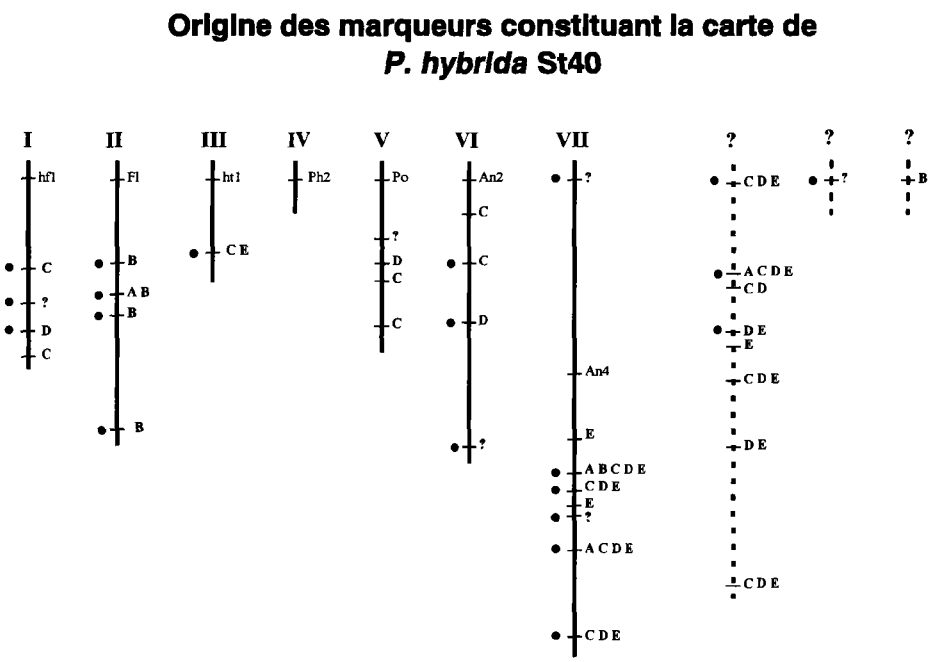


Figure 2. La présence des marqueurs repérés par un • a été vérifiée par hybridation. Un ? indique que le marqueur n'a été mis en évidence dans aucune des espèces de référence. *Petunia parodii* : A. *Petunia axillaris* : B. *Petunia integrifolia* : C. *Petunia inflata* : D. *Petunia violacea* : E.

Utilisation des RAPD pour l'analyse phénétique

Matériel et méthodes

Nous avons choisi un ensemble de 10 lignées de *P. hybrida* en cherchant à disposer d'un certain nombre de situations différentes. Les lignées choisies peuvent avoir dans leur ascendance directe une espèce ou dériver de cultivars de *P. hybrida* ou encore être dérivées de produits de croisements entre lignées (Tableau I). Parallèlement, nous utilisons l'ensemble de 7 espèces décrit précédemment. Nous réalisons des amplifications avec 17 amorces différentes (utilisées pour réaliser la carte génétique Figure 1) sur les 17 génotypes. Nous procédons après électrophorèse (dans les conditions décrites précédemment), au relevé de l'ensemble des fragments amplifiés à partir de chaque génotype. Nous obtenons une matrice nommée NGEL, dont chaque case correspond à la présence ou à l'absence d'un fragment de taille donnée, selon l'amorce utilisée et le génotype ; soit 200 fragments relevés sur 17 génotypes.

Nous avons utilisé comme sonde les 20 fragments de référence amplifiés chez St40 utilisés précédemment et les avons hybridés, dans les conditions décrites précédemment, sur le transfert de l'ensemble des produits d'amplification obtenus avec la même amorce. Nous avons relevé l'ensemble des signaux d'hybridation obtenus. Chaque case de cette matrice de résultats nommée NHYB correspond à la présence ou à l'absence d'un signal d'hybridation à une position donnée selon la sonde, l'amorce utilisée et le génotype, soit 71 signaux relevés sur 17 génotypes.

Nous avons utilisé l'indice de Jaccard [9] défini comme suit pour calculer des matrices de distances génétiques :

- soit a le nombre de fragments communs à deux individus j et k,
- soit b le nombre de fragments présents chez j, absent chez k,
- soit c le nombre de fragments absents chez j, présent chez k.

L'indice de similarité de Jaccard est défini comme $sJ_{jk} = \frac{a}{a+b+c}$ d'où on peut calculer l'indice de dissemblance $dJ_{jk} = 1 - sJ_{jk}$ L'indice de dissemblance peut être considéré comme une distance variant de 0 à 1.

Nous avons utilisé la méthode d'agrégation dite *neighbor joining method*, développée par Saitou et Nei [14], pour construire des phénogrammes à partir des matrices de distances que nous avons obtenues.

Résultats

Un exemple d'amplification réalisée avec l'amorce OPV8 est présenté Figure 3. On note, selon les génotypes et la taille, la variation sous forme de présence ou absence de fragments amplifiés. L'hybridation avec le fragment OPV8-1500 permet de vérifier l'homologie avec les fragments de 1 500 pb amplifiés chez *P. parodii*, *P. integrifolia*, *P. inflata* et *P. violacea*. Un signal plus faible correspondant à un fragment de 1400 pb, est mis en évidence chez Ta2, Tlh1, Sk176b, Pc6, Tlv1, Tb1-3, St40, St43, Rlkh1. Il peut résulter soit d'une homologie partielle de la sonde avec le fragment de 1 400 pb, soit d'une contamination de la sonde par ce fragment. Le signal correspondant à un fragment de 700pb est spécifique à St43. Enfin 3 signaux correspondant à une taille de 1 000 pb sont révélés sans qu'il soit possible de repérer le fragment après coloration du gel d'électrophorèse au BET.

Nous avons procédé à des hybridations pour pouvoir vérifier les homologies de séquences et déterminer ainsi si la coïncidence de tailles des fragments est suffisante pour rendre compte des homologies. La sensibilité de détection des fragments par hybridation est 1 000 fois supérieure à celle obtenue par coloration au BET. Nous avons constaté que dans NHYB un certain nombre de fragments non visibles après coloration au BET était mis en évidence. Dans nos conditions de séparation, il est alors souvent très difficile de faire la correspondance entre les fragments révélés par hybridation et les fragments révélés après coloration au BET. Nous n'avons donc comparé les coïncidences de notation entre NHYB et NGEL que pour les tailles de fragments correspondant à celle du fragment sonde. Avec les 20 sondes employées et les résultats sur les 7 espèces et 10 lignées, on réalise une comparaison sur $17 \times 20 = 340$ points. Sur ces 340 points, 114 sont caractérisés par la présence d'un fragment. Les différences rencontrées sont de deux types, d'une part, la présence d'un fragment dans NHYB non relevé dans NGEL, d'autre part, la présence d'un fragment dans NGEL non révélé dans NHYB. En tout nous avons constaté 9 différences sur 340 points, soit un taux de 2,7 %.

Les phénogrammes obtenus d'après NGEL et NHYB en calculant les matrices de distance d'après l'indice de dissemblance de Jaccard sont présentés Figure 4. Les Figures 4A et 4B présentent les phénogrammes reliant les espèces et les lignées, obtenus en utilisant la *neighbor joining method* avec les matrices de distances de Jaccard calculées à partir de NHYB et NGEL. Dans les deux cas, l'ensemble des lignées de *P. hybrida,* à l'exception de Tlh7, est regroupé. Ce groupe se subdivise en 3 : Tlv1, Tlh1, Rlkh1, Tb1-3 ; Sk176, Pc6 ; Ta2, St40, St43. Tlh7 est rattachée à *P. axillaris*. *P. parodii* est regroupée avec *P. axillaris* dans NHYB et isolée dans NGEL. Un groupe constitué de *P. inflata, P. violacea* et *P. inflata* est séparé dans NHYB et dans NGEL. *P. linearis* et *P. parviflora* sont séparées mais la distance séparant ces deux espèces des autres est plus importante dans le cas de NHYB que dans le cas de NGEL.

Discussion

Les regroupements de lignées établis sur la base des matrices NGEL et NHYB sont similaires. La comparaison des regroupements avec les données concernant l'origine des lignées donne des résultats cohérents. Rlkh1 est une lignée issue d'un haploïde doublé dérivant d'un croisement (Tlv1 × St43) × St43. L'objectif était de créer une lignée portant 5 allèles de Tlv1 et deux allèles de St43, chacun des allèles étant présent à un locus porté par un chromosome différent. Le regroupement avec Tlv1 est donc logique. Dans le cas de Tlh7, cette lignée est issue de l'haplodiploïdisation d'un hybride *P. axillaris* × *P. hybrida* ; le regroupement avec *P. axillaris* peut s'expliquer de ce fait. Enfin St40 et St43 ont des origines communes dans leur ascendance et sont regroupées.

Il apparaît que l'ensemble des lignées est globalement plus proche des espèces à $2n = 14$ et à fleurs blanches (*P. parodii* et *P. axillaris*) que des espèces à fleurs colorées. Par ailleurs, l'examen des données de NGEL et de NHYB révèle qu'en moyenne, pour les RAPD dont l'origine est déterminée (soit respectivement 189 et 63), toutes les lignées étudiées possèdent environ 60 % de RAPD provenant d'au moins une espèce à fleurs blanches. *P. hybrida* provient d'un croisement interspécifique entre une espèce à fleurs blanches et une espèce à fleurs colorées. Les opérations de sélection réalisées lors des premières générations à la suite de ce croisement peuvent être à l'origine de ce rapprochement par sélection de caractères provenant de l'espèce à fleurs blanches.

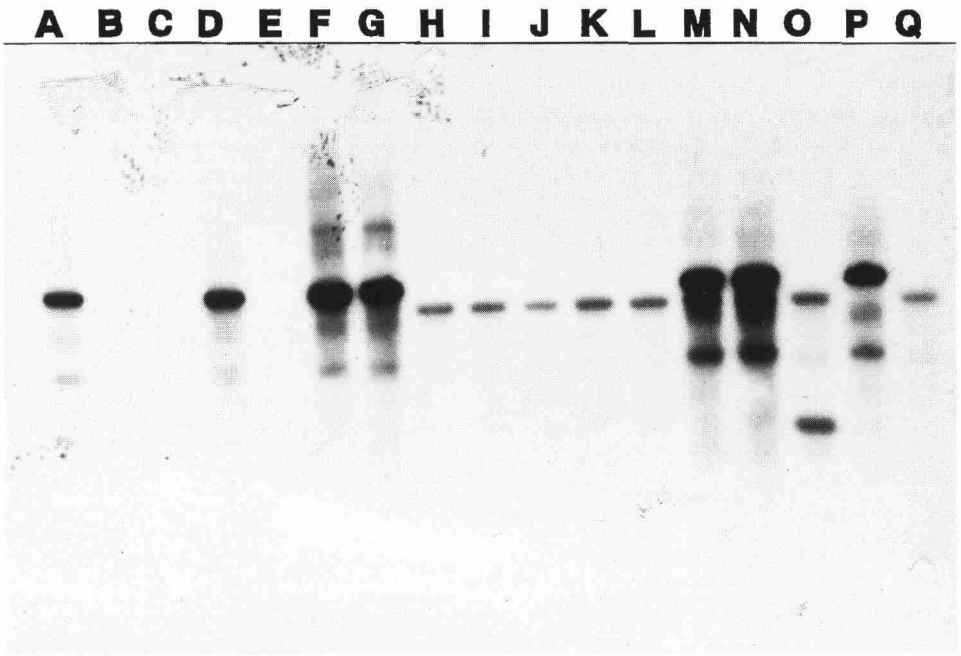
Le regroupement d'espèces est en accord avec les données taxonomiques proposées

A

Séparation, après électrophorèse sur gel d'agarose à 2,2 % et coloration au BET, des produits d'amplification obtenus avec l'amorce OPV9 (30 cycles d'amplification, 92 °C 1 mn ; 38 °C 1 mn ; 74 °C 1 mn 30 s).

1Kbl : marqueur de poids moléculaire (BRL)

A : *Petunia parodi*. B : *Petunia linearis*. C : *Petunia parviflora*. D : *Petunia Integrifolia*. E : *Petunia axillaris*. F : *Petunia inflata*. G : *Petunia violacea*. H : *Petunia hybrida* Ta2. I : *Petunia hybrida* Tlh1. J : *Petunia hybrida* Sk176b. K : *Petunia hybrida* Pc6. L : *Petunia hybrida* Tlv1. M : *Petunia hybrida* Tb1-3. N : *Petunia hybrida* St40. O : *Petunia hybrida* St43. P : *Petunia hybrida* Tlh7. Q : *Petunia hybrida* Rlkh1.



B

Autoradiographie, après hybridation du transfert des produits d'amplification obtenus avec l'amorce OPV8, par un fragment amplifié chez St40 (Colonne N) marqué au ^{32}PdCTP.

Figure 3. A. Recherche de l'origine des marqueurs. Analyse de la diversité des lignées. B. Autoradiographie après hybridation.

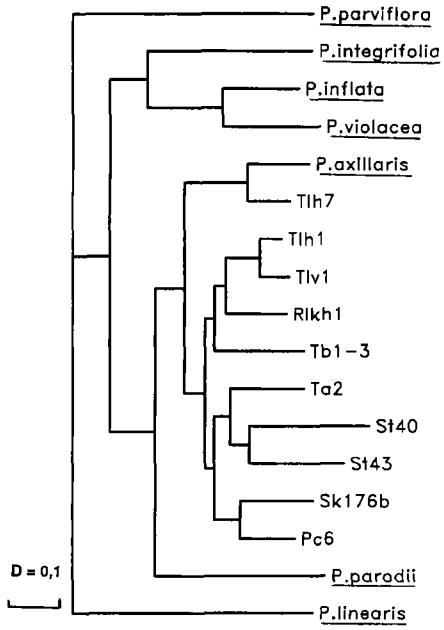


Figure 4A. Phénogramme regroupant 7 espèces du genre *Petunia* et 10 lignées de *P. hybrida* établi par la *neighbor joining method* sur la base des indices de dissemblance de Jaccard calculés à partir du relevé de 200 RAPD obtenus avec 17 amorces de 10 bases (matrice de notation NGEL).

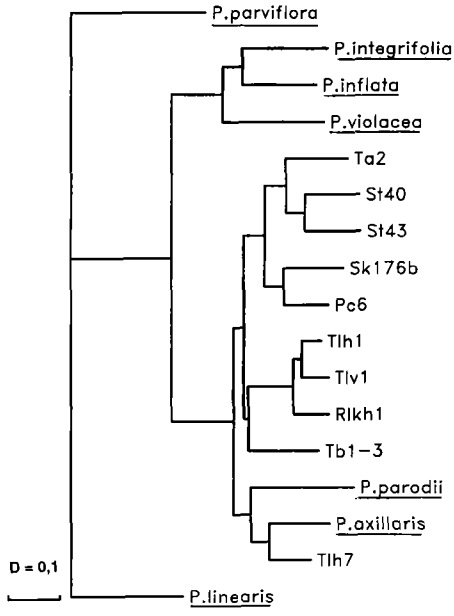


Figure 4B. Phénogramme regroupant 7 espèces du genre *Petunia* et 10 lignées de *P. hybrida* établi par la *neighbor joining method* sur la base des indices de dissemblance de Jaccard calculés à partir du relevé de 71 fragments mis en évidence après hybridation de 20 fragments de référence sur les RAPD obtenus avec 17 amorces de 10 bases (matrice de notation NHYB).

par Wijsman [21]. Les espèces à 2n = 18 sont séparées entre elles et des autres espèces. Les espèces à 2n = 14 à fleurs colorées sont regroupées, et séparées des espèces à fleurs blanches. Toutefois *P. violacea* est considérée par Wijsman [19] et Smith et Downs [15] comme un synonyme de *P. inflata*. La distance génétique séparant ces espèces d'après les données moléculaires ne permet pas de conclure définitivement mais va à l'encontre de l'idée d'une identité stricte. L'étude d'autres provenances serait nécessaire pour préciser l'analyse. *P. axillaris* et *P. parodii* sont séparées en accord avec les données de Wijsman [21], Cabrera [3] et Aoki et Hattori [1] qui considèrent *P. parodii* comme une sous-espèce de *P. axillaris*.

On peut noter d'après NHYB une diminution de la distance génétique séparant les espèces à fleurs colorées ainsi qu'une diminution de la distance séparant les espèces à fleurs blanches qui aboutit à regrouper *P. axillaris* et *P. parodii*. Cette diminution de distance peut provenir d'un biais engendré par le nombre réduit de signaux révélés par rapport au nombre de fragments amplifiés (71 et 200).

On constate avec la matrice NHYB un éloignement des espèces à 2n = 18 et des espèces à 2n = 14 par rapport aux résultats obtenus avec la matrice NGEL. Cependant dans NHYB, la distance n'est établie entre *P. parviflora* et *P. linearis* et entre ces espèces et les autres génotypes que sur la base de 5 fragments hybridés, les distances calculées ont donc peu de signification. L'exploitation des données concernant l'homologie des fragments ne peut être effectuée avec des résultats cohérents que lorsque le degré d'homologie entre les produits d'amplification de différents génotypes atteint un niveau raisonnable. Il est difficile de fixer une limite *a priori ;* celle-ci doit être établie de manière raisonnée en fonction des données disponibles concernant la proximité génétique des génotypes étudiés.

La contamination de la sonde par des produits sans rapport avec le fragment récupéré est inévitable du fait de la technique de séparation et de récupération utilisée. Elle peut conduire à la révélation de signaux correspondant à des séquences différentes de celle du fragment majoritaire. Cependant cette contamination affecte l'ensemble de l'autoradiographie. On peut considérer que les produits d'amplifications hybridés, qui sont de tailles et de séquences différentes de celle du fragment majoritaire dans la sonde, sont informatifs pour le calcul de distance, car ils dépendent eux aussi du génotype même s'ils sont sans homologie avec le fragment majoritaire. En revanche, dans le cas de signaux correspondant à des fragments non homologues mais de tailles semblables, la confusion en résultant aboutit à augmenter le nombre de similarité donc à diminuer la distance. Ce type de situation découle d'une coïncidence (présence de 2 fragments de taille semblable et de séquences différentes) qui affecte également la notation basée sur la taille. L'hybridation n'apporte alors aucun gain de précision. Par ailleurs, le taux de 2,7 % de différence constaté sur 340 points de comparaison entre les notations NHYB et NGEL apparaît faible.

Dans le cas des RAPD, une amorce peut conduire à l'amplification de séquences très différentes entre 2 espèces. Le nombre de produits d'amplification présentant des homologies diminue dans la mesure où la distance entre espèces augmente. Le nombre de points de comparaison possibles entre deux espèces devient rapidement faible ou nul. Il nous semble donc que l'emploi des RAPD doit être limité à des comparaisons entre espèces proches. Dans ces conditions, la coïncidence de taille entre 2 fragments correspond la plupart du temps à une homologie de séquence. Le surcroît de travail et de coût qu'entraîne l'hybridation systématique des fragments n'est donc pas compensé par une meilleure précision. Une notation basée sur la taille des fragments nous paraît donc suffisante pour réaliser une étude phénétique sur la base de données RAPD.

Sur le plan des résultats concernant le genre *Petunia*, nous retrouvons dans l'ensemble des lignées de *P. hybrida* Hort, considérées au début de cette expérience comme représentatives de la variabilité de cette espèce, des marqueurs provenant de chacune des espèces de *Petunia* à 2n = 14 chromosomes. Il est donc clair que l'origine de *P. hybrida* doit être envisagée d'une manière polyphylétique. Néanmoins, l'interprétation de l'origine de *P. hybrida* comme étant le fruit d'un croisement entre *P. integrifolia* et *P. axillaris* nous paraît incomplète. L'interprétation que nous proposons est basée sur le fait que l'ensemble des espèces à 2n = 14 est interfertile. Il est possible de regrouper ces espèces, sur la base d'arguments botaniques, en deux complexes, l'un à fleurs blanches, l'autre à fleurs colorées. Les données moléculaires que nous obtenons soutiennent ces regroupemements. Les premiers hybrides ont pu être obtenus avec des individus provenant de populations sympatriques d'espèces colorées et non colorées. *P. hybrida* prendrait donc son origine dans un ou des croisements entre ces 2 complexes d'espèces. Par ailleurs, l'interfertilité entre taxa et la divergence moléculaire que nous avons révélée suggèrent que ces taxa appelés espèces naturelles à 2n = 14 peuvent être considérés comme étant en cours de spéciation.

Références

1. Aoki C, Hattori K, (1991). Attempt to classify *Petunia* species on the basis of corolla shape. *Japan J Breed* 41 : 433-442.
2. Bernatzky R, Tanksley SD (1986). Genetics of actin-related sequences in tomato. *Theor Appl Genet* 72 : 314-321.
3. Cabrera AL (1977). Novedades en las Solanaceas de Entre Rios. Hickenia (Bol. Darwinion). 1 (14) : 79-81.
4. Cornu A (1984). Genetics of *Petunia.* In : Sink KC, ed. *Monographs on theoretical and applied genetics 9.* Springer Verlag, Berlin : 34-48.
5. Cornu A, Farcy E, Maizonnier D, Haring M, Veerman W, Geratz AGM (1990). *Petunia hybrida.* Genetic maps. O'Brien SJ, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
6. Echt CS, Erdahl A, McCoy TJ (1992). Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome* 35 : 84-87.
7. Fries RE (1911). Die Arten der Gattung *Petunia. K Sven Vetenskapsakad Hand,* 46 : 1-72.
8. Hanson MR (1980). *Petunia* as a model system for molecular biologists. *Plant Mol Biol Newslett* 1 : 1-37.
9. Jaccard P (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vau Sci Nat* 44 : 223-270.
10. Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L. (1987). MAPMAKER : an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1 : 174-181.
11. Mitchell AZ, Hanson MR, Skvirsky RC, Ausubel FM (1980). Anther culture of *Petunia :* genotypes with high frequency of callus, root or plantlet formation. *Z Pflanzenphysiol Bd,* 100 : 131-146.
12. Reiter RS, Williams JGK, Feldmann KA, Antoni Rafalski JA (1992). Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred and random amplified polymorphic DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA,* 89 : 1477-1481.
13. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich EA, Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 : 1350-1354.

14. Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenic trees. *Mol Biol Evol* 4 (4) : 406-425.
15. Smith LB, Downs RJ. (1966). Part I. *Solanaceas.* Reitz PR, ed. Flora illustrada catarinense. Itajai, Santa Catarina, Brazil : 1-321.
16. Southern EM (1976). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98 : 503-517
17. Tautz D, Renz M (1983). An optimized squeeze-freeze method for the recovery of DNA from agarose gels. *Anal Biochem* 132 : 14-19.
18. Vierling RA, Nguyen HT (1992). Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid, wheat genotypes. *Theor Appl Genet* 84 : 835-838.
19. Wijsman HJW (1982). On the interrelationships of certain species of *Petunia.* I. Taxonomic notes on the parental species of *Petunia hybrida. Acta Bot Neerl* 31 (5/6) : 477-490.
20. Wijsman HJW (1983). On the interrelationships of certain species of *Petunia.* II. Experimental data : crosses between different taxa. *Acta Bot Neerl* 32 (1/2) : 97-107.
21. Wijsman HJW, De Jong JH (1985). On the interrelationships of certain species of *Petunia.* IV. Hybridization between *P. linearis* and *P. calycina* and nomenclatorial consequences in the *Petunia* group. *Acta Bot Neerl* 35 (5/6) : 477-490.
22. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Antoni Rafalski J, Tingey SV (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18 (22) : 6531-6535.
23. Williams JGK, Hanafey MK, Antoni Rafalski JA, Tingey SV (1993). Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods enzymol,* 218 : 707-725. Ray Wu, ed. Academic Press inc, San Diego CA.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 387-397.

40

La sélection assistée par marqueurs

A. GALLAIS

Station de Génétique Végétale, Ferme du Moulon, 91190 Gif-sur-Yvette, France.
INA-PG, 16, rue Claude-Bernard, 75242 Paris Cedex, France.

La découverte des marqueurs moléculaires de l'ADN nucléaire ouvre une nouvelle ère pour la sélection. En rendant possible l'étiquetage de certains gènes, cela permet de rendre plus efficace la gestion et la manipulation de la variabilité génétique pour construire des génotypes ayant de plus en plus de gènes ou d'associations de gènes favorables. D'une façon large, la sélection assistée par marqueurs correspond à toute forme possible d'utilisation des marqueurs dans le processus d'amélioration. Les principales applications pour le sélectionneur sont : l'identification du matériel, la gestion des ressources génétiques, la conduite des rétrocroisements, *la construction de génotypes, la prédiction de l'hétérosis, la prédiction des valeurs génotypiques et la conduite de la sélection récurrente. L'intérêt des marqueurs pour l'identification du matériel est évident. Il est aussi très clair pour la conduite des* rétrocroisements *: cela permet de raccourcir la durée du processus à 3 générations tout en ayant une meilleur isogénicité. Pour la prédiction de l'hétérosis et la classification en groupes d'aptitude à la combinaison, les résultats sont aussi très stimulants. L'efficacité de la construction de génotypes, c'est-à-dire du cumul progressif dans un même génotype des gènes favorables « marqués », dépend de l'importance de l'épistasie ; cela est tout à fait possible à l'intérieur d'un fond génétique donné. Au niveau de l'amélioration d'une population, les marqueurs pourront être très efficaces si le déséquilibre de liaison est important. Ils peuvent permettre l'augmentation de l'héritabilité par une meilleure séparation des effets génétiques et des effets du milieu, avec une efficacité relative d'autant plus grande que l'héritabilité sera faible. Cela renforce l'intérêt de la sélection massale, même en tenant compte du coût des analyses. Au niveau d'une sélection multicaractère, les marqueurs peuvent permettre de limiter les corrélations défavorables ; au niveau d'une*

sélection multilocale, ils peuvent permettre une plus grande efficacité dans la sélection pour la stabilité des performances... Mais tous ces avantages n'existent que s'il y a une liaison assez forte entre les marqueurs et les gènes en cause.

En permettant un certain étiquetage des gènes, c'est-à-dire en rendant identifiables des gènes jusque-là non identifiables, l'accès à un grand nombre de marqueurs du génome nucléaire (du type RFLP) ouvre une ère nouvelle pour la génétique et la sélection des caractères complexes. Grâce aux marqueurs moléculaires, il devient en effet possible, d'une part, de mieux lire le génotype à travers le phénotype et, d'autre part, de contrôler les recombinaisons entre locus en cause.

La sélection assistée par marqueurs, c'est-à-dire l'utilisation des marqueurs dans le processus de sélection, peut donc concerner différents domaines :

– l'identification des génotypes pour des caractères oligogéniques (monogéniques) très influencés par le milieu ou coûteux à mesurer,

– le contrôle de la recombinaison, par l'identification, d'une part, des individus les plus complémentaires à croiser entre eux, et, d'autre part, des transgressants les plus favorables,

– la gestion de la variabilité, au niveau des ressources génétiques (par exemple, classification des populations en groupes d'aptitudes à la combinaison) ou au cours de la sélection récurrente,

– la prédiction des valeurs génotypiques pour des caractères complexes,

– la prédiction de la valeur d'un croisement à partir d'informations sur les parents.

Avec des marqueurs très liés aux locus concernés, à effets suffisamment forts et indépendants du contexte génétique, les deux premiers points sont les plus immédiats ; dans le cas où la liaison entre le marqueur et le locus n'est pas totale, ils peuvent facilement s'envisager au niveau de populations particulières où le déséquilibre de liaison n'est dû qu'au linkage (populations F2 ou dérivées, *back-cross*). Cependant, avec une liaison statistique entre les marqueurs et un caractère quantitatif – donc entre un marqueur et un ou des locus à effet quantitatif (QTL) –, tous ces points, sauf le dernier qui est relatif à la création variétale, peuvent s'envisager au niveau de n'importe quelle population en sélection récurrente, à condition qu'elle soit suffisamment en déséquilibre de liaison ; ils ne nécessitent pas la cartographie, mais, si celle-ci existe, l'utilisation des marqueurs pourra être mieux raisonnée.

Le déséquilibre de liaison dans les populations

Les populations étudiées pour la localisation des QTLs (F2, back-cross, lignées recombinantes) sont telles que le linkage implique le déséquilibre de liaison. Ainsi dans une F2, pour deux locus distants d'un pourcentage de recombinaison c, le déséquilibre de liaison (défini comme l'écart à l'association au hasard des locus au niveau génétique) sera $D = (1 - 2c)/4$ et il peut donc varier entre 0 et 1/4.

Dans une population résultant de l'intercroisement de deux populations complémentaires pour 2 locus indépendants (situés sur des chromosomes différents), le déséquilibre est égal au déséquilibre maximum observé en F2 (1/4). Dans une population sélectionnée, il pourra donc y avoir déséquilibre de liaison sans linkage, en plus de celui dû au linkage. Ce déséquilibre peut être dû à différents facteurs : la sélection, l'homogamie, la dérive...

La conséquence est qu'il ne sera pas possible de localiser les QTLs marqués. De plus, le déséquilibre de liaison sans linkage étant divisé par 2 à chaque multiplication en panmixie, et la fréquence des allèles marqueurs pouvant changer rapidement sous l'effet de la sélection, il faudra réestimer à chaque cycle les liaisons entre les marqueurs et les QTLs (celles qui resteront auront des chances d'être dues à des liaisons physiques). Mais, à une génération donnée, la corrélation marqueur-QTL pourra toujours être utilisée pour le choix des plantes. Le problème est de savoir si ce déséquilibre peut être important dans les populations.

Une étude sur 10 populations de maïs, avec seulement 10 marqueurs enzymatiques, semble bien montrer un déséquilibre de liaison d'une part entre marqueurs, et d'autre part entre marqueurs et QTLs de différents caractères [3].

L'effet de la présence d'épistasie

Les interactions entre QTLs pourront avoir deux types de conséquences : d'une part, elles rendront plus difficile la mise en évidence de QTLs élémentaires en atténuant voire supprimant les effets principaux de ceux-ci, et d'autre part, elles rendront leurs effets dépendant du fond génétique. Il s'agit alors de savoir si les interactions sont telles qu'elles perturbent (inversent) complètement la hiérarchie de l'effet des allèles ou si celle-ci est globalement conservée. Entre QTLs d'un croisement donné, cette hypothèse peut être plus facilement acceptable qu'entre QTLs de croisements différents. La présence d'épistasie au niveau des caractères quantitatifs a déjà été démontrée par les méthodes de la génétique quantitative [2, 13], mais est-elle importante au niveau des QTLs révélés ? Chez le maïs, le fait de trouver dans plusieurs expériences [1, 8, 10] des QTLs qui ne se retrouvent pas au niveau de la valeur propre est bien déjà une preuve de l'effet du fond génétique sur l'expression des QTLs (avec seulement additivité ou dominance, soit on retrouverait les mêmes QTLs, soit les QTLs de valeur en combinaison seraient un sous-ensemble de ceux pour la valeur propre). Si l'épistasie est importante, il faudra d'abord chercher à utiliser la variabilité due aux QTLs mis en évidence dans le fond génétique où ils ont été révélés ; pour utiliser celle due à des QTLs non homologues mis en évidence dans des fonds génétiques différents, il faudra réaliser les différentes associations possibles de QTLs et retenir celles qui seront les plus efficaces.

La construction assistée de génotypes

Le *back-cross* et la sélection généalogique assistés par les marqueurs

L'utilisation de marqueurs liés physiquement aux allèles des QTLs contrôlant la variation d'un caractère quantitatif doit permettre d'accumuler beaucoup plus rapidement dans un même génome les gènes favorables. Un exemple est donné par le *back-cross* assisté par les marqueurs. D'abord, si le gène à transférer n'est pas directement identifiable, il pourra être « marqué », ce qui permet des tests précoces et peut éviter de faire des infections artificielles pour un gène de résistance aux maladies ; de plus, cela supprime l'autofécondation nécessaire pour un gène récessif. Ensuite, dès le premier *back-*

cross, il sera possible de choisir les plantes ressemblant le plus au parent récurrent et ayant eu une recombinaison la plus proche possible du gène à transférer (à droite, puis à gauche) ; il en résultera une accélération du développement de l'isogénicité et, de plus, il sera ainsi possible de réduire très fortement la longueur du fragment chromosomique classiquement transmise avec le gène à transférer. Ce segment peut en effet représenter jusqu'à 20 % du chromosome donneur ; Stam et Zeven [9], Young et Tanksley [12] avec le transfert de la résistance au TMV chez la tomate ont montré qu'avec trois *back-cross* assistés il est possible de faire mieux qu'avec 7 non assistés (en fait il aurait fallu plus de 100 *back-cross* pour obtenir le même résultat).

D'une façon plus générale, en l'absence d'épistasie, il sera possible, par les marqueurs, d'accumuler dans un même génotype le maximum de QTLs favorables, soit par *back-cross* assisté avec un génotype donneur et un génotype receveur (on peut envisager de transférer plusieurs QTLs, 2 ou 3, non liés à la fois), soit par sélection généalogique assistée dans le cas où l'on ne cherche pas l'isogénicité mais simplement à isoler les transgressants les plus favorables possibles. Dans ce cas, parmi les lignées dérivant d'un croisement (par HD ou SSD), il sera possible de retenir celles ayant accumulé le maximum de gènes marqués favorables et de continuer en recroisant entre elles les lignées transgressantes complémentaires.

Les premiers résultats expérimentaux de Stuber et Sisco [10] chez le maïs montrent bien l'intérêt de l'utilisation des marqueurs liés à des QTLs pour la construction de lignées hybrides très performantes en combinaisons hybrides.

La construction de génotypes stables

Dans une expérience de recherche de QTLs au niveau de croisements interspécifiques chez la tomate et dans 3 milieux différents, Paterson *et al.* [7], sur 29 QTLs détectés, en ont trouvé 4 communs aux 3 lieux, 10 communs à 2 lieux et 15 spécifiques à un lieu. Ainsi, dans la mesure où il semble exister des QTLs spécifiques d'adaptation à certains milieux (ce qui était prévisible), pour construire la variété la plus stable possible, il faudra accumuler dans un même génotype le maximum de QTLs d'adaptation. Les marqueurs devraient permettre de construire, plus rapidement et avec plus de sécurité, de tels génotypes.

A l'intérieur d'une F2, cette construction pourra se faire, comme précédemment, par la sélection généalogique assistée, avec identification des lignées les plus transgressantes et croisement des lignées les plus complémentaires pour initier un nouveau cycle de sélection généalogique assistée. Dans une population où l'on trouvera des associations marqueurs-caractère quantitatif spécifiques à certains milieux, on pourra aussi supposer que les QTLs marqués seront différents ; la recombinaison de plantes complémentaires devrait donc permettre d'augmenter la fréquence des associations de gènes favorables et ainsi d'augmenter la chance de créer une variété de comportement plus stable.

La rupture de corrélations défavorables entre caractères

L'analyse par les marqueurs permet de séparer dans une corrélation génétique ce qui peut être dû à la pléiotropie (QTLs communs) et ce qui peut être dû au déséquilibre de liaison (QTLs spécifiques à chaque caractère). S'il existe des QTLs spécifiques à chacun des caractères (liés négativement), alors, par sélection assistée, il sera possible d'amener ces QTLs dans un même génotype, et donc l'intensité de la corrélation défavorable sera diminuée, voire annulée, s'il n'y a pas de pléiotropie.

Dans ces deux exemples, l'avantage des marqueurs sera de diriger vraiment les

recombinaisons, supprimant ainsi une grande part de hasard : il en résultera sans doute un gain de temps et une meilleure utilisation de la variabilité. Mais, comme pour la sélection généalogique assistée, le succès de la construction dépend toutefois de l'importance de l'épistasie.

La construction récurrente de génotypes et la gestion de la variabilité en sélection récurrente

Pour un caractère complexe, l'accumulation des gènes ou combinaisons de gènes (QTLs marqués) favorables demandera sans doute plusieurs cycles d'extraction de lignées suivie de l'identification de celles qui ont les meilleurs QTLs et de l'intercroisement des plus complémentaires ; on passe ainsi à la construction récurrente de génotypes.

Dans ce processus, le marquage direct des QTLs sera le plus efficace. Mais il est aussi possible d'utiliser les marqueurs en sélection récurrente de façon plus statistique pour gérer la variabilité globalement, éviter de retenir des plantes à intercroiser qui sont trop proches, croiser là aussi les plantes ou les lignées les plus complémentaires, mais seulement pour les marqueurs, sans identifier les QTLs. En sélection récurrente réciproque, les marqueurs peuvent aussi être très efficaces pour aider à accélérer le développement de la complémentarité des populations.

La classification en groupes d'aptitudes à la combinaison et la prédiction de l'hétérosis

Classification en groupes d'aptitude à la combinaison

Chez le maïs, les résultats expérimentaux [14, 15] montrent qu'un marquage assez dense du génome peut être très efficace pour classer des lignées en groupes d'origine. Il permet de très bien retrouver les lignées apparentées et d'identifier celles ayant une origine mixte. C'est donc un outil très puissant pour gérer un ensemble de lignées. Peut-il être utilisé au niveau de populations ? Les résultats sur lignées permettent de le penser, mais il faudra pour cela mettre au point des techniques de marquage applicables à des mélanges d'individus afin de diminuer le nombre d'analyses à faire, ou alors il faudrait une forte diminution des coûts des analyses (avec 1 000 populations, 100 individus par population et 60 marqueurs par individu, cela ferait 6 millions d'analyses!...)

Prédiction de l'hétérosis

Dans une grande gamme de variation des distances RFLP entre lignées, il apparaît une très bonne corrélation entre hétérosis (ou la valeur F1) et la distance entre lignées [16]. Cela ne fait que traduire la relation bien connue entre vigueur et niveau de consanguinité. En effet, les lignées les plus proches sont les plus apparentées et donnent donc les croisements les plus consanguins. La relation est beaucoup plus floue dans l'intervalle de variation qui intéresse la sélectionneur. Ainsi les travaux de Charcosset [14] et de Melchinger [15] chez le maïs précoce montrent bien, sur un ensemble de croisements corné x corné, denté x denté et corné x denté, une relation entre l'ASC (hétérosis spécifique) et la distance spécifique ; mais à l'intérieur des croisements corné x denté, la variation de distance étant relativement réduite, la relation entre hétérosis et distance tend à disparaître. Sur le haricot, Nienhuis [17], a obtenu des résultats très similaires.

Les travaux de Charcosset [16] montrent de plus que les marqueurs peuvent être

très efficaces pour réduire les effets d'ASC dus essentiellement à des croisements entre lignées plus proches. La prise en considération des AGC et des distances RFLP devrait donc permettre d'améliorer l'efficacité de la prédiction de la valeur des croisements. Cependant, il faudrait ne retenir que les marqueurs liés à des QTLs impliqués dans l'hétérosis ; la présence de marqueurs non liés à de tels QTLs risque de brouiller la prédiction. Lorsque les groupes d'aptitudes à la combinaison des lignées ne sont pas connus, l'intérêt des marqueurs pour la prédiction de la valeur F1 apparaît indiscutable.

La prédiction des valeurs génotypiques

L'intérêt attendu du marquage

Si un marqueur est lié par déséquilibre de liaison, quelle qu'en soit l'origine, à un locus affectant un caractère quantitatif (QTL), alors connaissant le génotype marqueur, il devient possible d'estimer avec beaucoup de précision la part de la variabilité génétique du caractère quantitatif due au QTL marqué à la génération considérée. En effet, dans un milieu donné, la part des variations aléatoires dues au micro-milieu sera très fortement réduite par le fait que la valeur d'un génotype marqueur sera calculée sur la moyenne d'un assez grand nombre d'individus (les individus d'un même génotype marqueur sont en fait des « répétitions » du QTL).

Avec plusieurs marqueurs, le sélectionneur peut donc disposer d'une information très riche qui s'ajoutera à la mesure directe du caractère quantitatif. Les marqueurs sont en fait à considérer comme des caractères associés au caractère principal à sélectionner. La sélection assistée par marqueurs (SAM) consiste à utiliser ces deux sources d'informations. A l'extrême, avec une liaison stricte entre les marqueurs et les QTLs et un fort pourcentage de variance expliqué par les marqueurs, il serait possible de n'utiliser que l'information marqueur (cas de sélection indirecte). Dans la situation la plus courante, liaison non stricte et pourcentage de variance expliquée, sans doute inférieur à 50 %, il faudra considérer les deux sources de variation, celle due aux QTLs marqués et celle due aux QTLs non marqués, et probablement réestimer à chaque génération les liaisons entre les marqueurs et les QTLs. Dans ce cas, la liaison physique (linkage) n'est pas nécessaire, seul le déséquilibre de liaison (corrélation entre le marqueur et le QTL) compte.

L'importance de la variation due aux QTLs non marqués sera variable selon les caractères, mais pour un caractère complexe comme le rendement, elle sera sans doute toujours non négligeable. En effet, même avec un marquage dense, la distribution en L des effets des QTLs (peu de QTLs à forts effets et probablement nombreux QTLs à faibles effets) fait que pour des caractères complexes, de nombreux QTLs à faibles effets ne pourront pas être mis en évidence par suite de limites dans la précision expérimentale. L'existence de tels QTLs à côté des QTLs marqués justifie aussi une sélection combinant l'information marqueurs et les mesures phénotypiques des caractères sélectionnés.

L'analyse des effets associés aux marqueurs

L'étude de la liaison entre les marqueurs et les caractères quantitatifs peut s'envisager pour tous les types de test, par exemple :

- valeur propre,
- valeur en S1 (autofécondation),
- valeur en combinaison,
- valeur en lignées.

Elle peut aussi s'envisager au niveau individuel ou familial.

Pour un caractère quantitatif donné, la valeur prédite par les marqueurs peut s'obtenir par régression de la valeur phénotypique sur des variables codées décrivant les génotypes marqueurs. Cela revient en fait à calculer la moyenne de chaque génotype marqueur. De là il est possible de déduire la variance génétique expliquée par le marqueur (par analyse de variance ou modèle à effets aléatoires).

A partir des valeurs génotypiques associées aux génotypes marqueurs, il est possible de calculer des effets génétiques comme pour n'importe quel caractère quantitatif : additivité, dominance, épistasie... Ce qui est nouveau ici, c'est que les génotypes sont identifiés et donc il est possible de calculer les effets additifs associés aux allèles marqueurs ainsi que les effets de dominance, s'ils existent (cas de valeur propre et de valeur en S1). Les effets additifs se calculent par régression de la valeur phénotypique sur « la dose » de chaque allèle marqueur. A partir de ces effets additifs, la variance d'additivité expliquée par le marqueur peut être calculée directement.

Ainsi, par simple étude de la population par les marqueurs et les caractères quantitatifs, il est possible d'avoir accès aux variances génotypique et additive expliquées par les marqueurs, alors qu'avec des gènes non marqués il faudrait avoir recours à des dispositifs et plans de croisement plus ou moins complexes selon le système de test.

Une héritabilité peut aussi être définie pour le locus marqueur, par le rapport de la variance génotypique du locus marqueur à sa variance phénotypique. Cette héritabilité sera proche de 1 pour des effectifs assez élevés dans chaque classe, car dans ce cas la moyenne phénotypique d'une classe correspondra à la valeur génotypique. Enfin, le carré de la corrélation (r^2) entre le locus marqueur et le caractère quantitatif est directement la proportion de variance phénotypique expliquée par le marqueur. Elle est donc égale au produit de la proportion de variance génétique (m^2) expliquée par le marqueur par l'héritabilité (h^2) du caractère quantitatif ($r^2 = m^2 h^2$).

Un locus marqueur a donc tous les attributs d'un caractère quantitatif : valeurs génotypiques, effets génétiques, héritabilité et corrélation génétique avec le caractère considéré. Le sélectionneur peut donc utiliser les marqueurs comme des caractères associés aux caractères sélectionnés (et avec les mêmes logiciels).

La formulation générale du problème

Le problème est de prévoir la valeur (G) des enfants connaissant le phénotype (P) des unités (individus ou familles) candidates à la sélection et leur génotype marqueur. La meilleure prédiction est la régression multiple suivante :

$$G/_{P,M} = \beta_o P + \cdots \beta_i a_i$$

a_i étant la valeur additive associée aux marqueurs du QTL i.

Avec des QTLs indépendants, et avec une sélection directe, il suffit de faire la régression sur P et $A^* = \Sigma_i a_i$ (valeur additive totale due aux marqueurs). A partir de

valeurs génétiques prévues, il est possible de calculer le progrès génétique [5]. Il apparaît que le gain attendu en efficacité relative (par rapport à la sélection sans marqueurs) est d'autant plus grand que l'héritabilité est faible et que la proportion de variance expliquée est forte. En fait, l'intérêt de la SAM chute très vite dès que l'héritabilité augmente. Elle n'est attendue intéressante que pour les situations à faible héritabilité ($h^2 < 0,30$), et plus particulièrement pour la sélection massale.

Quelques résultats expérimentaux

Les résultats de Paterson *et al.* [7] sur tomate et de Stuber *et al.* [10] sur maïs, qui correspondent en fait à des expériences de sélection indirecte avec marqueurs, tendent bien à confirmer ce qui est attendu sur la base de la théorie. Paterson *et al.* [7] sur une F2 d'un croisement *Lycopersicum esculentum* × *L. chesmanii* montrent que la sélection pour les seuls marqueurs est d'autant plus efficace (par rapport à la sélection phénotypique) que l'héritabilité est faible ; à forte héritabilité, elle est même inférieure à la sélection directe, ce qui tend à prouver qu'il y a une contribution importante de gènes non marqués. Stuber *et al.* [11] montrent sur une F2 de maïs que la sélection indirecte avec marqueurs peut être aussi efficace, voire plus efficace, qu'une sélection directe. Cependant, en un cycle de sélection, l'étude de la variation de fréquence des marqueurs montre une variation bien plus rapide en sélection directe (phénotypique), pour un même progrès. Cela prouve le rôle des gènes non marqués ; la combinaison des deux types de sélection aurait donc sans doute été la méthode la plus efficace.

Comparaison avec d'autres méthodes

L'utilisation des marqueurs peut être considérée comme un moyen pour augmenter l'héritabilité du ou des caractères sélectionnés. Son efficacité doit donc être comparée à celle d'autres moyens d'augmentation de l'héritabilité, à la disposition du sélectionneur : augmentation du nombre de répétitions, utilisation des corrélations entre caractères secondaires et caractères primaires, prise en considération des relations entre apparentés. Tous sont d'autant plus efficaces que l'héritabilité est faible.

La démarche de la SAM est la même qu'avec des caractères secondaires. Si l'on trouve un caractère secondaire très lié (génétiquement) au caractère principal et plus héritable que ce dernier (et si possible une corrélation génétique opposée à la corrélation environnementale), alors la prise en compte de l'information apportée par le caractère secondaire, en plus de la mesure du caractère primaire, peut rendre cette méthode très compétitive par rapport à la SAM. Le problème est qu'il peut être difficile de trouver le ou les caractères secondaires (car il est possible de travailler sur une combinaison linéaire de tels caractères) ayant toutes les qualités voulues, alors qu'avec un marquage assez dense du génome, il ne doit pas y avoir de problème pour trouver des marqueurs efficaces. En retour, il est d'ailleurs possible que ceux-ci fassent découvrir les caractères secondaires qu'il faudrait mesurer. Il y aurait alors le choix entre utiliser les marqueurs ou mesurer les caractères secondaires les plus significatifs.

L'utilisation des relations entre apparentés, illustrée dans le cas d'additivité stricte avec sélection individuelle (cas de sélection sur un index valeur familiale, valeur individuelle), est évidemment d'autant plus efficace que l'apparentement est fort ; l'apparentement revient d'ailleurs à prendre en considération la répétition de l'information génétique présente dans des individus apparentés. De ce point de vue, le clonage des individus sera le plus efficace (ce n'est plus nécessairement vrai lorsqu'il y a de la dominance). L'aug-

mentation du nombre de répétitions est sans doute le moyen le plus direct à la disposition du sélectionneur. Des gains d'efficacité tout à fait comparables à ceux de la SAM peuvent être atteints. Il est d'ailleurs possible de chiffrer en équivalent répétitions, le gain d'information de la SAM. Avec $h^2 = 0,10$, 10 répétitions conduisent à une héritabilité de 0,50 ; pour avoir cette même efficacité avec les marqueurs, il faudrait que le pourcentage de variance expliquée par les marqueurs soit d'au moins 50 %.

Les différents moyens d'augmentation de l'héritabilité, y compris les marqueurs, ne présentent d'ailleurs guère d'intérêt dès que l'héritabilité est supérieure à 0,40 - 0,50. En particulier, la combinaison des marqueurs et de toute autre méthode d'augmentation de l'héritabilité ne présente que peu d'intérêt si cette méthode permet d'atteindre une héritabilité supérieure à 0,40 - 0,50.

Comparaison de différentes méthodes de sélection assistée par marqueurs

• *Intérêt de la sélection massale et de la sélection familiale pleins-frères*

En sélection non assistée, la sélection massale n'est reconnue efficace que pour des héritabilités assez fortes. Cela est vrai si l'on fait abstraction du fait qu'elle permet des intensités de sélection beaucoup plus fortes que les autres méthodes et que la durée de son cycle est très courte (un an pour une plante annuelle). Sur la base du progrès génétique par unité de temps, sans générations dérobées, il faut en fait atteindre de très faibles héritabilités pour qu'elle ne soit pas la plus efficace. Pour une héritabilité au sens large faible (< 0,10), la sélection familiale pleins-frères sera la plus efficace, sauf si la proportion de variance additive est faible (en ce cas, la sélection sur descendances demi-frères peut être la plus efficace). Avec l'utilisation de marqueurs, la sélection individuelle phénotypique est pratiquement toujours la plus efficace. Par rapport aux autres méthodes, la prise en considération de l'effet de la sélection phénotypique des parents ne change rien à ce résultat.

L'utilisation de générations dérobées rend plus compétitive la sélection familiale pleins-frères. Sans marqueurs la sélection familiale pleins-frères a un très grand domaine d'efficacité. L'utilisation de marqueurs réduit ce domaine dans une proportion dépendant du degré d'explication de la variance par les marqueurs (m^2) et du pourcentage de variance additive (a^2). Si a est faible dès que m^2 est supérieure à 10 %, la sélection massale est la plus efficace, même avec un h très faible (0,05). Dans le cas d'additivité stricte ($a^2 = 1$), il faut que m^2 soit supérieur à 25 % pour qu'avec une h^2 de 0,05 la sélection massale soit la plus efficace. Ce relativement grand domaine d'efficacité de la sélection massale est dû à l'augmentation d'efficacité bien plus rapide pour cette méthode que pour les autres méthodes lorsque le pourcentage de variance expliqué par les marqueurs augmente.

La sélection assistée par marqueurs réhabilite donc la sélection massale pour tous les cas où la notion d'individu a un sens (cas de culture en plantes semi-isolées, facilement identifiables, sans de trop forts effets de compétition). En présence d'interaction génotype × milieu, il faudra faire appel à la sélection convergente divergente proposée et appliquée par Lonnquist *et al.* [6]. Dans ce schéma, la population de sélection est répartie dans les différents lieux de sélection ; une sélection indépendante est réalisée dans chaque lieu et les unités sélectionnées sont mélangées pour constituer la génération suivante qui est à nouveau répartie dans tous les lieux. Avec les marqueurs, cette méthode permettra de repérer les QTLs d'adaptation à des milieux particuliers et il sera donc possible de diriger les recombinaisons et d'être plus rapidement efficace dans la sélection pour la stabilité.

• ***Sélection assistée par marqueurs et optimisation des moyens***

La sélection assistée par marqueurs doit conduire à repenser toute l'optimisation des moyens pour les caractères à faible héritabilité. Deux exemples seront donnés : la sélection sur descendances (ou familiale) et la sélection multilocale.

Dans toute sélection faisant appel au test de familles, pour des caractères à faible héritabilité, il faut en général des effectifs assez élevés par famille. Pour un nombre donné de plantes étudiables, le nombre de familles étudiées sera donc relativement faible et l'intensité de sélection ne pourra pas être trop forte (pour un nombre donné d'unités sélectionnées). Pour augmenter l'intensité de sélection, il faudrait augmenter le nombre de familles étudiées et donc diminuer le nombre de plantes par famille ; cela se traduira alors par une diminution de l'héritabilité au niveau des moyennes de famille, ce qui diminuera le progrès génétique si l'effectif précédent correspondait à l'optimum. Pour de faibles effectifs par famille, l'utilisation des marqueurs, en augmentant l'héritabilité, permettra d'être plus efficace que la sélection classique, même à son optimum [4].

Dans la sélection multilocale, en présence d'interaction génotype × milieu, la meilleure stratégie est d'étudier le matériel (familles, descendances) dans le plus grand nombre de milieux, avec une seule répétition par milieu. Cela conduit donc à une héritabilité faible pour un milieu donné mais à une plus grande précision sur la valeur génotypique du matériel. L'introduction des marqueurs va permettre d'augmenter l'héritabilité dans chaque milieu de test et ainsi il sera possible de voir les adaptations particulières et de repérer les QTLs d'adaptation : il devient possible de sélectionner simultanément et efficacement sur la performance moyenne et sur la stabilité des performances.

Conclusion

Il est des domaines où l'intérêt des marqueurs pour la sélection ne fait aucun doute, c'est le cas :

- du marquage direct de gènes dont l'effet est difficile ou coûteux à apprécier,
- des *back-cross,*
- de la classification en groupes d'aptitude à la combinaison,
- de la gestion de la variabilité en sélection récurrente.

Pour une plus large utilisation des marqueurs dans la construction de génotypes par sélection généalogique ou par sélection récurrente, il faudrait avoir plus d'idées sur l'importance de l'épistasie (même si on peut prédire qu'elle existe, le problème est de savoir si elle peut remettre en cause certains effets des QTLs). Par le contrôle des recombinaisons au niveau de l'intercroisement, la sélection récurrente assistée ressemble d'ailleurs beaucoup à la sélection généalogique avec plusieurs cycles. Les deux stratégies se fondent dans la construction récurrente de génotypes. L'essentiel est de limiter la longueur des cycles, d'où l'intérêt de l'haplodiploïdisation et des générations dérobées.

L'utilisation des marqueurs pour augmenter la précision dans l'évaluation de valeurs génotypiques se pose plus en termes de coût par rapport à d'autres méthodes qui peuvent permettre aussi d'augmenter cette précision. Si une technique comme les RFLP ou les RAPD se banalise, alors leur utilisation redonnerait beaucoup plus d'importance à la sélection individuelle sur le phénotype (si la valeur individuelle a un

sens). Mais après chaque sélection, il faudra réévaluer les liaisons entre marqueurs et QTLs.

Dans tous les cas, des marqueurs liés de façon absolue aux gènes seront d'un intérêt bien plus grand que ceux liés de façon statistique. Les progrès dans les connaissances permettent d'espérer ce type de marqueurs (c'est ce qui est recherché à partir des gènes « candidats » – pour des QTLs – ou des sondes cDNA). Cela donnera encore plus de puissance au généticien et au sélectionneur pour l'analyse, la gestion et l'utilisation de la variabilité génétique. C'est vraiment une ère nouvelle qui s'ouvre pour la génétique des caractères complexes et donc pour le sélectionneur. Les marqueurs vont conduire aux gènes, les gènes aux caractères élémentaires... C'est toute l'organisation de l'expression de la variabilité génétique qui pourra être décortiquée. Ainsi la génétique quantitative deviendra de moins en moins aveugle... et la sélection ressemblera de plus en plus à la construction dirigée de génotypes...

Références

1. Baud S (1992). Recherche de corrélations entre marqueurs moléculaires de type RFLP et caractères agronomiques chez *Zea mays*. Thèse Fac. Sc. Lyon 1.
2. Bauman LF (1959). Evidence of non allelic gene interaction in determining yield, ear height and kernel row number in corn. *Agr J* 51 : 551-534.
3. Garnier P (1992). Contribution à l'étude de la variabilité génétique intra et interpopulation chez le maïs. Valorisation d'informations agromorphologiques et enzymatiques. Thèse INA P-G.
4. Lande R (1991). Marker assisted selection in relation to traditional methods of plant breeding. In : Stalker HT, Murphy JP, eds. Plant breeding in the 1990s. CAB Inter. 437-451.
5. Lande R, Thompson R, 1990. Efficiency of marker assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124 : 743-756.
6. Lonnquist JH *et al.* (1979). Convergent, divergent selection for area improvement in Maize. *Crop Sci* 19 : 602-604.
7. Paterson AH *et al.* (1991). Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato : comparison accross species, generations and environment. *Genetics* 127 : 181-197.
8. Pioneer H. Biol. Int. (1989). Identification and genetic localisation of loci affecting yield and other agronomic traits in Maïze. Poster XII Eucarpia Congress. Göttingen (RFA).
9. Stam P, Zeven C (1981). The theoretical properties of the donor genome in mean isogenic lines of self-fertilizers bred by back-crossing. *Euphytica* 30 : 227-238.
10. Stuber CW (1989). Marker based selection for quantitative traits. In : Robbelen G, ed. *Science for Plant Breeding*. Proc. of the XII Eucarpia Congress. Paul Paray Pub. Berlin : 31-49.
11. Stuber CW, Sisco PL (1993). Marker facilitated transfer of QTL alleles between elite inbred lines and response in hybrids. 46th Annual Corn and Sorghum Res Conf : 104-112.
12. Young ND, Tanksley SD (1989). RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the TM-2 locus of tomato during back-cross breeding. *Theor Appl Genet* 77 : 353-359.
13. Mather K, Jinks JL (1971). *Biometrical genetics*. Chapman and Hall. 2nd ed.
14. Charcosset A *et al.* (1992). Utilisation des techniques de marquage génétique pour l'analyse de la variabilité génétique et la prédiction du phénomène d'hétérosis. *Sel Fr* 44.
15. Melchinger AI *et al.* (1992). Genetic diversity for RFLPs in european maize inbreds. II. Relation to performance of hybrids within versus between heterotic groups for forage traits. Theo Applied Genet 84 : 672-681.
16. Charcosset (1992). Prediction of heterosis. In : Dattée Y, Dumas C, Gallais A, eds. Reproductive biology and plant breeding » : 355-366.
17. Nienhuis J, Gavin S (1992). The potential of hybrid varieties in self-pollinating vegetables. In : Dattée Y, Dumas C, Gallais A, eds. *Reproductive biology and plant breeding :* 387-396.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 399-412.

41

Identification variétale et ressources génétiques chez le figuier (*Ficus carica* L.) : utilisation des marqueurs RAPD

BOUCHAIB KHADARI [1], PHILIPPE LASHERMES [2], FINN KJELLBERG [1]

1. CEFE-CNRS, BP 5051, 34033 Montpellier Cedex, France.
2. ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex, France.

Résumé

*L'identification de 21 échantillons de figuier (*Ficus carica *L.) représentant différentes variétés cultivées a été réalisée par la technique RAPD* (random amplified polymorphism DNA). *Des amorces donnant des résultats reproductibles et révélant du polymorphisme au sein d'un sous-ensemble de quatre génotypes ont été préalablement sélectionnées. 19 marqueurs sont obtenus par l'utilisation de 12 amorces et ont permis de caractériser 17 génotypes. L'analyse a mis en évidence une erreur d'étiquetage pour un échantillon et une synonymie pour deux autres. La reproductibilité des résultats, la stabilité au sein d'un clone et le polymorphisme suffisamment élevé font de ces marqueurs un outil efficace pour l'identification variétale chez le figuier. Les génotypes étudiés ont une base génétique relativement large sans différenciation en sous-groupes distincts, probablement sous l'effet d'un brassage de gènes important en populations naturelles. Les marqueurs identifiés dans cette étude pourraient servir pour l'analyse de la diversité génétique d'un plus grand nombre de variétés cultivées et des populations naturelles de* Ficus carica.

Ficus carica L. est une espèce gynodioïque qui se reproduit spontanément dans la région circum-mediterranéenne. Il existe deux formes sexuelles : 1) le figuier domestique ne produit que des graines, ses fleurs mâles sont stériles ; 2) le caprifiguier abrite l'insecte-pollinisateur, *Blastophaga psenes*, sous forme de larve dans les ovaires des fleurs femelles et produit du pollen [20]. Cette espèce est abondamment cultivée sur le pourtour méditerranéen car elle produit des figues qui sont, pour la plupart, comestibles. La production est commercialisée sous forme de figues fraîches ou séchées. Les figues, pour être séchées, nécessitent une teneur en sucre élevée qui ne peut être obtenue que par pollinisation, alors que les figues fraîches sont produites, en majeure partie, par des variétés parthénocarpiques ne nécessitant pas de pollinisation. La culture du figuier s'est toujours accompagnée d'une connaissance plus ou moins précise de variétés de cette espèce. Une variété de figuier regroupe tous les individus qui sont issus d'un même génotype par multiplication végétative. Ce génotype, généralement prélevé directement dans la nature, est choisi pour ses caractères agronomiques (grosses figues charnues s'il s'agit de figues fraîches ou bien sucrées dans le cas de figues séchées, production importante de figues,...). Beaucoup de collections de variétés de figuier sont maintenues par des pépiniéristes qui sont confrontés à des erreurs d'identification et à des synonymies. Il est donc nécessaire de disposer de moyens permettant l'identification des variétés qui sont rassemblées au sein d'une collection.

Le moyen classique d'identification des génotypes est basé sur les caractères morphologiques. Utilisant des critères comme la taille et la forme du fruit et de la feuille, la couleur de l'épiderme, etc., Condit [10] a pu classer un peu plus de 600 variétés de figuiers. Néanmoins, ces caractères sont le plus souvent sous l'influence des conditions du milieu [9] et, en général, ne correspondent pas à des critères alternatifs qui permettent de séparer les phénotypes en groupes distincts bien définis [32]. Plusieurs travaux ont utilisé le polymorphisme protéique comme moyen d'identification des variétés [3, 2, 35]. L'étude de 61 variétés de figuiers à l'aide de 4 loci polymorphes a permis de distinguer 41 spectres alloenzymatiques différents dont certains sont communs à 2 variétés ou plus [33]. Le succès de l'identification des génotypes par les marqueurs enzymatiques est conditionné par le nombre de systèmes enzymatiques et d'allèles étudiés. Ce nombre étant souvent limité, il ne permet pas d'avoir un polymorphisme suffisamment important pour caractériser l'ensemble des variétés [2, 30, 33 35]. De plus, comme les protéines sont des produits d'expression des gènes, elles peuvent varier selon l'organe, le tissu, le stade de développement ou même selon les conditions du milieu [4]. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction obtenu par l'utilisation de sondes minisatellites [11, 29] ou de sondes microsatellites [36] permet d'identifier avec succès les génotypes, même dans le cas d'une base génétique étroite. Cependant, cette technique reste très laborieuse à mettre en œuvre et nécessite souvent l'emploi de la radioactivité.

Récemment, une technique basée sur l'amplification en chaîne par polymérisation ou PCR *(polymerase chain reaction)* nommée *random amplified polymorphism DNA* (RAPD) a été développée par Williams *et al* [41] et par Welsh and McClelland [37]. Les amorces utilisées sont des séquences arbitraires et peuvent s'hybrider à de l'ADN répété, comme à des séquences de faible nombre de copies [39, 41]. Les marqueurs obtenus par cette technique ont généralement une transmission mendélienne [7, 18]. Ils peuvent être utilisés comme marqueurs d'introgression [1] ou dans certains cas pour déterminer la paternité et les relations de parenté entre individus [15, 38]. Par ailleurs, ils sont utilisés dans la construction des cartes de liaison génétique [21, 31]. Cette technique n'est pas limitée par le nombre d'amorces et permet d'identifier fréquemment le

polymorphisme qui existe entre individus étudiés. Elle offre le moyen d'étudier la variabilité génétique au sein d'un complexe d'espèces [24, 40], dans les populations naturelles d'une même espèce [8, 17, 26, 34] ou pour caractériser les différents génotypes [16, 22, 39, 44].

Le nombre croissant des travaux réalisés à l'aide des marqueurs RAPD laisse à penser qu'ils seraient un moyen adapté à l'étude de la variabilité génétique de *Ficus carica*. Ce travail consiste à rechercher et à caractériser des marqueurs RAPD en vue d'identifier les différents génotypes qui sont présents au sein d'un ensemble d'échantillons de figuiers. Notre objectif est de montrer que l'application de la technique RAPD à l'identification des variétés de figuiers est possible, et de disposer d'un ensemble de marqueurs pour étudier, par la suite, la variabilité génétique des populations naturelles de cette espèce.

Matériel et méthode

Matériel végétal

L'étude est réalisée sur 21 échantillons de figuiers représentant 19 dénominations distinctes. Il s'agit d'un sous-ensemble représentatif des collections qui sont maintenues par les pépiniéristes en France, qui correspond à des variétés, économiquement, parmi les plus importantes. Ce matériel provient de quatre sites différents : les pépinières Baud (Vaison-la-Romaine), la collection variétale de Porquerolles (conservatoire botanique), un producteur de Perpignan et enfin le CEFE/CNRS de Montpellier (Tableau I).

Cinq échantillons représentant trois dénominations différentes sont particulièrement choisis pour cette étude. Il s'agit de Col de Dame blanche, Col de Dame grise et Col de Dame noire, ayant une même forme de réceptacle. Ces trois variétés correspondent au figuier domestique sans récolte de printemps ; elles partagent un même spectre alloenzymatique constitué par 4 loci polymorphes [33]. Elles ont toutes les mêmes caractères morphologiques, seule la couleur de l'épiderme des figues les différencie. Il s'agit très certainement d'un génotype unique et la différence de couleur notée serait le résultat de mutations somatiques maintenues par la multiplication végétative [33]. Pour chacune des deux variétés Col de Dame blanche et Col de Dame noire, l'analyse est réalisée sur deux échantillons provenant l'un de la collection variétale de Porquerolles, et l'autre de la zone traditionnelle de culture de ces variétés à Perpignan. Les deux échantillons d'une même variété ont ainsi été multipliés séparément dans deux localités géographiques différentes et ce, depuis fort longtemps. L'analyse de ces échantillons permettra de tester la stabilité des marqueurs RAPD au sein du génotype Col de Dame.

Extraction de l'ADN génomique

L'ADN est extrait selon la méthode de Dellaporta *et al* [12] à partir de bourgeons végétatifs dormants car, pendant l'hiver, le figuier est dépourvu de feuilles. Un test de comparaison entre ce type d'extraction et celui réalisé à partir de jeunes feuilles obtenues en serre montre qu'il n'existe aucune différence dans la qualité de l'ADN et les résultats obtenus. La quantité d'ADN génomique est estimée par spectrophotométrie et coloration au bromure d'éthidium après électrophorèse.

Tableau I. Liste des échantillons de figuier.

Numéro	Nom	Collection d'origine
1	Dauphine	Porquerolles
2	Violette Dauphine	Pépinières Baud
3	Col de Dame grise	Porquerolles
4	Col de Dame blanche (échantillon 1)	Porquerolles
5	Col de Dame noire (échantillon 1)	Porquerolles
6	Col de Dame noire (échantillon 2)	Perpignan
7	Bourgeassotte noire	Porquerolles
8	Violette de Sollies	Pépinières Baud
9	Marseillaise	Pépinières Baud
10	Verte d'Argenteuil	Pépinières Baud
11	Longue d'août	Pépinières Baud
12	Osborn Prolific	Pépinières Baud
13	Madeleine des deux Saisons	Pépinières Baud
14	Grise de Saint-Jean	Pépinières Baud
15	Tardive Août Turkey	Pépinières Baud
16	Sultane	Pépinières Baud
17	Noire voisine de la Sultane	Pépinières Baud
18	Grise ronde à chair rose	Pépinières Baud
19	Grosse longue verte	Pépinières Baud
20	Roscoff	CEFE-CNRS, Montpellier
21	Col de Dame blanche (échantillon 2)	Perpignan

Conditions de la PCR et de l'électrophorèse

Les amorces (Operon, USA) sont des oligonucléotides de 10 bases ayant une proportion en CG dépassant 50 % (Tableau II). La réaction d'amplification est réalisée dans un volume de 25 µl contenant 10 mM tris-HCl à pH 8,3 ; 50 mM KCl ; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,001 % gélatine ; 100 µM pour chacun des désoxynucléotides (dATP, dCTP, dGTP et dTTP, Boehringer), environ 10 ng d'ADN génomique ; 0,4 µM d'amorce et une unité de Taq polymérase (Perkin Elmer Cetus). Ce mélange est couvert par deux gouttes d'huile minérale (Sigma) pour empêcher l'évaporation du liquide lors de la réaction d'amplification qui est conduite dans un appareil Trio-ThermoBlock (Biometra/Allemagne). La réaction de PCR commence par une étape de dénaturation durant 5 mn à 95 °C ; elle est ensuite soumise à 45 cycles. Chaque cycle comporte 1 mn à 95 °C, 1 mn à 35 °C et 2 mn à 72 °C. La réaction de la PCR se termine par une étape d'élongation finale pendant 6 mn à 72 °C. Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % dans du tampon TBE 1X à 4 volts/cm pendant environ 4 h. Ils sont ensuite visualisés au bromure d'éthidium sous lumière UV (312 nm) et photographiés avec un film noir et blanc (667, Polaroïd).

Tableau II. Liste des amorces utilisées dans l'analyse.

Code	Séquence 5' — 3'	Nombre de produits d'amplification	Nombre de marqueurs RAPD
OPA11	CAATCGCCGT	3	1
OPA16	AGCCAGCGAA	3	2
OPA18	AGGTGACCGT	4	2
OPH11	CTTCCGCAGT	5	2
OPK17	CCCAGCTGTG	6	2
OPX5	CCTTTCCCTC	3	1
OPX9	GGTCTGGTTG	4	1
OPX11	GGAGCCTCAG	6	2
OPY4	GGCTGCAATG	3	1
OPY11	AGACGATGGG	6	2
OPY14	GGTCGATCTG	2	1
OPZ12	TCAACGGGAC	3	2

Analyse des données

Les produits d'amplification sont visualisés sur gel d'agarose sous la forme de bandes. A la suite d'un test de répétabilité, ces bandes sont codées sous la forme de présence/absence pour l'ensemble des individus analysés. La présence est notée quelle que soit l'intensité de la bande. Par commodité de langage, un marqueur RAPD est qualifié de locus à deux allèles (présence ou absence de la bande). L'analyse par ces marqueurs permet de caractériser chaque échantillon par un profil multilocus. La variation entre génotypes est évaluée en calculant l'indice de similarité de Nei et Li [27] pour l'ensemble des échantillons pris deux à deux selon la formule suivante : $S = 2 \times N_{AB}/(N_A + N_B)$ où N_{AB} est le nombre de bandes communes à l'individu A et à l'individu B, N_A et N_B correspondent respectivement au nombre de bandes de l'individu A et de l'individu B. La probabilité d'avoir un même profil multilocus pour deux individus pris au hasard peut être calculée par la moyenne de l'indice de similarité à la puissance de la moyenne du nombre de bandes par individu [29]. Les relations qui existent entre les génotypes sont illustrées par un dendrogramme construit à partir de la matrice de similarité de Nei et Li [27] en utilisant la méthode de la classification ascendante hiérarchique non pondérée sur le critère de la distance moyenne (UPGMA ; [5] et le logiciel Phylip [14].

Résultats et discussion

Sélection et validité des marqueurs RAPD

Un ensemble de 85 amorces est testé sur quatre échantillons : Dauphine, Col de Dame grise, Madeleine des deux saisons et Roscoff. Environ 25 % de ces amorces (21 au total) sont immédiatement exclues de cette étude car pour certaines, il y a absence totale

d'amplification et pour d'autres les produits d'amplification obtenus sont mal définis et difficilement interprétables. Parmi les 64 amorces retenues, 27 génèrent du polymorphisme (Figure 1). Chacune de ces amorces est ensuite testée une deuxième fois sur les quatre génotypes, puis une troisième fois sur l'ensemble des échantillons étudiés. Parmi les 14 premières amorces testées de cette manière, 12 sont retenues pour l'identification des génotypes étudiés car les produits d'amplification obtenus sont répétables à chacune de ces trois amplifications réalisées (Figure 2).

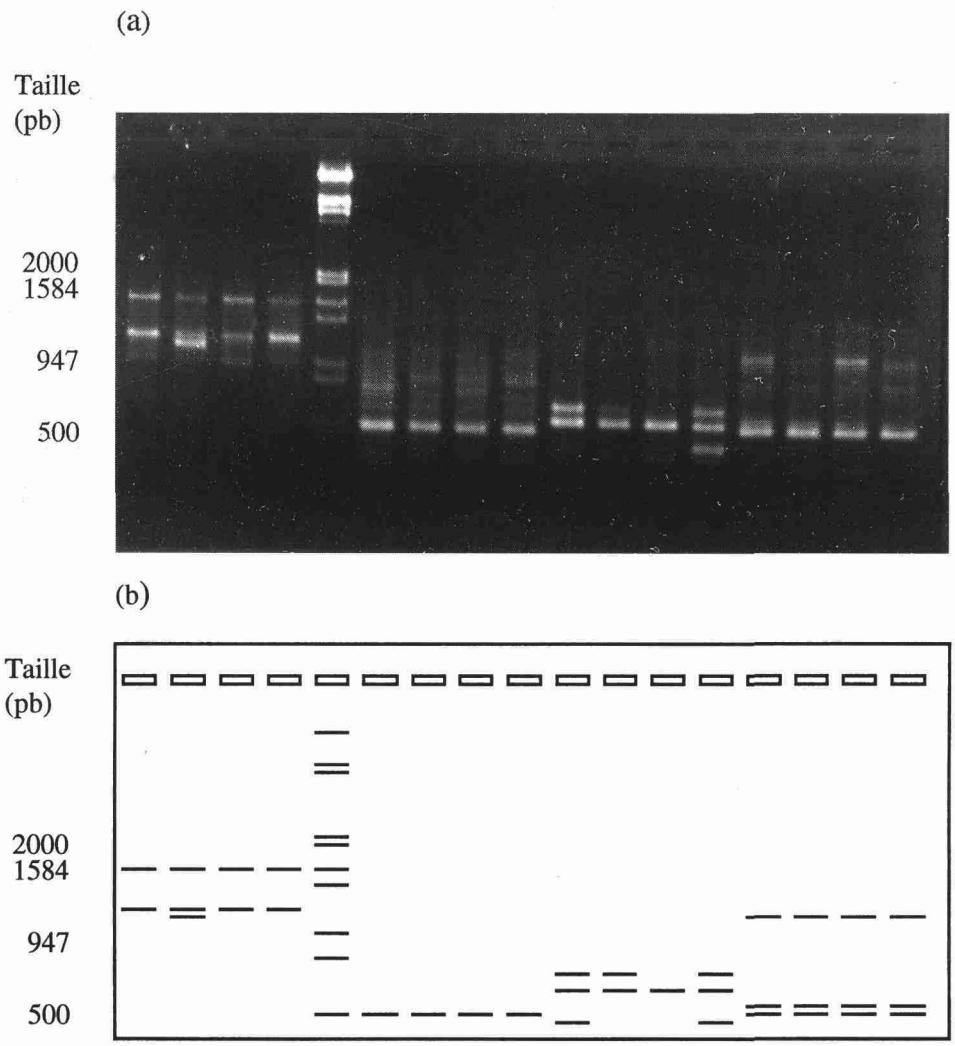


Figure 1. Exemple de sélection des amorces révélant du polymorphisme au sein de quatre génotypes (de gauche à droite : l'échantillon 20, 13, 3 et 1). Les amorces testées sont de gauche à droite : OPX5, OPX1, OPA18 et OPA9. (a) photographie du gel, (b) diagramme utilisant la présence de bandes.

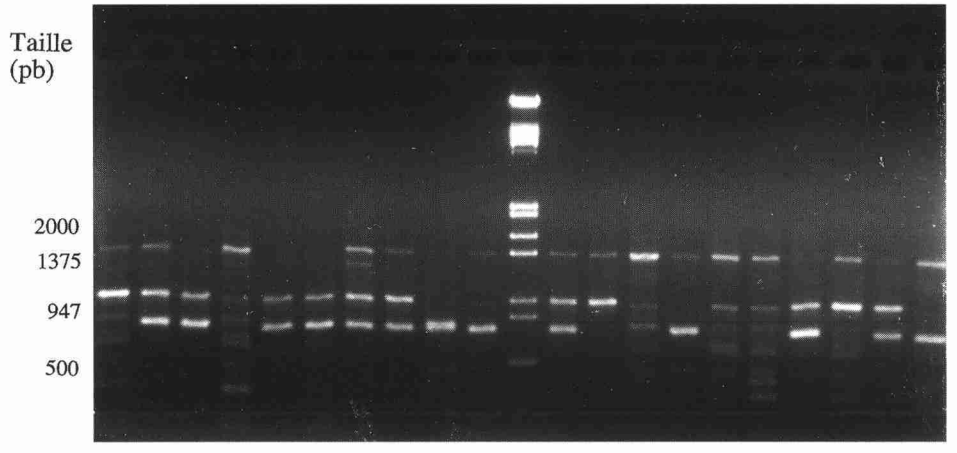


Figure 2. Exemple de produits d'amplification obtenus à partir de 20 échantillons de figuier (de gauche à droite : l'échantillon 1 jusqu'à 20) en utilisant l'amorce OPA16.

Un total de 64 produits d'amplification est obtenu par les 12 amorces utilisées dans cette étude dont 16 ne sont pas pris en compte (soit 25 % du total). 29 produits d'amplification (soit 45 % du total) sont présents chez l'ensemble des échantillons analysés, ils correspondent à des loci monomorphes. 19 produits d'amplification (soit 30 % du total) correspondent à des loci polymorphes, ils constituent l'ensemble des marqueurs RAPD utilisés pour l'identification des génotypes étudiés (Tableau II). Le nombre de produits d'amplification obtenus à l'aide d'une seule amorce varie de deux à six avec une moyenne de 4. Chacune de ces amorces permet d'avoir un à deux marqueurs RAPD (Tableau II).

L'utilisation des amorces de courte séquence rend la réaction de la PCR très sensible aux conditions de l'amplification. De ce fait, des résultats reproductibles ne sont obtenus que dans le cas où ces conditions sont optimales et strictement les mêmes pour les différentes réactions [15,42]. Les marqueurs RAPD utilisés dans cette étude sont le résultat d'une sélection sur les amorces et sur les produits d'amplification. En effet, la présence de résultats non reproductibles montre l'importance de cette sélection [45].

La possibilité d'une co-migration des fragments d'ADN amplifiés constitue, dans certains cas, une difficulté pour l'interprétation des résultats RAPD. L'utilisation de l'un des fragments amplifiés comme sonde permet par hybridation de vérifier s'il s'agit du même locus [41]. Les marqueurs utilisés dans cette analyse n'ont pas été vérifiés selon cette méthode. Cependant, nous avons montré que le marqueur OPY14 a une transmission biparentale au niveau de la génération F1 (résultats non publiés). Les autres marqueurs ne sont pas testés car ils ne sont pas polymorphes entre les deux parents étudiés. De plus, la probabilité d'avoir une co-migration pour des individus appartenant à une même espèce, comme dans ce cas, est faible [19].

Polymorphisme et identification des génotypes

L'analyse des 21 échantillons de figuier par ces marqueurs permet de distinguer 17 profils multilocus différents (Figure 3). Une même combinaison de bandes est commune à quatre échantillons de Col de Dame, à l'exception de Col de Dame blanche

provenant de Porquerolles. Les marqueurs RAPD sont donc parfaitement stables pour différents clones d'un même génotype. Cette stabilité caractérise la variété Col de Dame noire pour laquelle deux échantillons sont multipliés séparément dans deux localités géographiques différentes depuis de nombreuses années. Elle caractérise aussi les trois variétés obtenues par mutation somatique à partir d'un génotype unique Col de Dame. De la même manière, Wolff et Peters-Van Rijn [43] obtiennent un seul profil multilocus pour 13 cultivars de chrysanthèmes (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) issus d'un même clone d'origine. L'échantillon Col de Dame blanche provenant de Porquerolles est caractérisé par une combinaison de bandes très différente des autres Col de Dame. En effet, l'indice de similarité de 0,57 entre ces deux génotypes traduit une différence sur 9 marqueurs (Tableau III). Il s'agit donc d'une erreur d'étiquetage dans la collection. Quant à l'échantillon Bourgeassotte noire et Violette de Sollies qui ont le même profil multilocus, il s'agit, après une enquête réalisée auprès des responsables de collections, d'un même génotype ayant deux nominations différentes selon la provenance. La Figure 3 montre qu'aucun génotype n'est caractérisé par un seul marqueur.

Les marqueurs RAPD utilisés ont permis d'identifier l'ensemble des échantillons analysés. Cette identification est fondée par le fait que les 17 profils multilocus se distinguent par au moins trois allèles (Tableau III, Figure 3). Par ailleurs, la probabilité pour que deux individus différents partagent une même combinaison de bandes est infime, de l'ordre de $5{,}10^{-3}$ ($0{,}61^{10,67}$). L'utilisation de 19 marqueurs RAPD prévoit, dans le cas où ces marqueurs ne sont pas liés, un total de 524 288 (2^{19}) combinaisons multilocus différentes possibles. De telles possibilités sont difficilement réalisées par l'emploi des alloenzymes dont le polymorphisme est limité par le nombre de loci et d'allèles généralement faibles [2, 30, 33, 35]. Bailey [3] définit trois critères pour l'identification variétale : 1) une variation suffisamment importante pour distinguer les différentes variétés, 2) une variation intra-variétale minimale, 3) une reproductibilité dans les résultats. En remplissant ces trois conditions, les marqueurs RAPD utilisés dans notre étude sont donc bien adaptés à l'identification des génotypes.

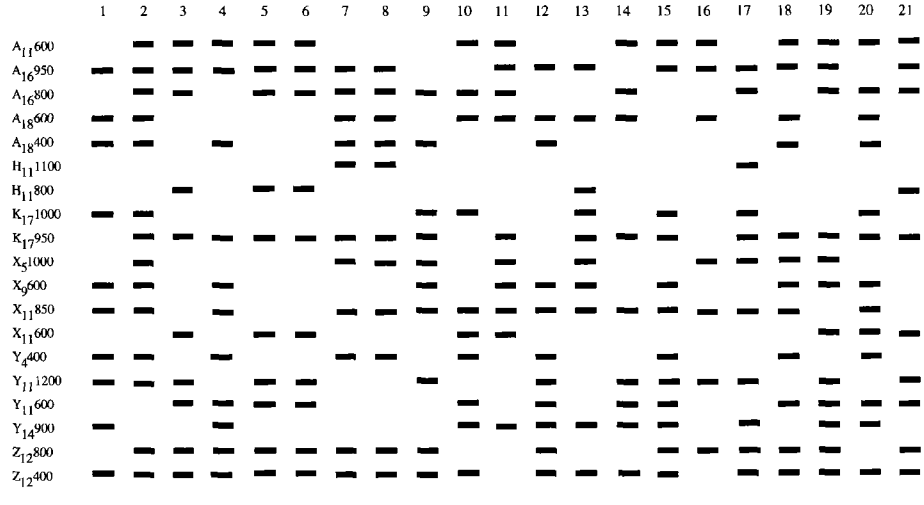


Figure 3. Diagramme illustrant les différents profils multilocus des 21 échantillons étudiés.

Tableau III. Matrice de similarité basée sur l'estimation de l'indice de similarité de Nei & Li [27]. Moyenne = 0,61, erreur standard = 0,14.

Échantillon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Dauphine	1,00																				
Violette Dauphine	0.75	1,00																			
Col de Dame grise	0,30	0.58	1,00																		
Col de Dame blanche (éch.1)	0.67	0,72	0,57	1.00																	
Col de Dame noire (éch.1)	0.30	0,58	1,00	0,57	1,00																
Col de Dame noire (éch.2)	0,30	0.58	1,00	0,57	1,00	1,00															
Bourgeassotte noire	0.57	0,80	0,48	0.64	0,48	0,48	1,00														
Violette de Sollies	0,57	0,80	0.48	0.64	0,48	0,48	1,00	1,00													
Marseillaise	0,60	0,83	0,50	0,57	0,50	0,50	0,67	0,63	1,00												
Verte d'Argenteuil	0,60	0.58	0,50	0,57	0.50	0,50	0,48	0,48	0,40	1,00											
Longue d'août	0.50	0.67	0,50	0,57	0.50	0,50	0,57	0,57	0,50	0,60	1,00										
Osborn Prolific	0,86	0,72	0,48	0,82	0,48	0,48	0,64	0,64	0,57	0,57	0,48	1,00									
Madeleine des deux Saisons	0,70	0,67	0,40	0,57	0,40	0,40	0,57	0,57	0,60	0,50	0,70	0,57	1,00								
Grise de Saint-Jean	0,53	0,60	0,63	0,60	0,63	0,63	0,50	0,50	0,53	0,74	0,63	0,60	0,53	1,00							
Tardive Brown Turkey	0,73	0,77	0,64	0,91	0,64	0,64	0,52	0,52	0,64	0,64	0,55	0,78	0,64	0,67	1,00						
Sultane	0,47	0,67	0,47	0,47	0,47	0,47	0,56	0,56	0,47	0,35	0,59	0,56	0,47	0,50	0,53	1,00					
Noire voisine de la Sultane	0,57	0,72	0,57	0,57	0,57	0,57	0,73	0,73	0,76	0,48	0,57	0,50	0,67	0,60	0,73	0,56	1,00				
Grise ronde à chair rose	0,64	0,85	0,54	0,91	0,54	0,54	0,78	0,78	0,64	0,54	0,64	0,78	0,63	0,57	0,75	0,63	0,52	1,00			
Grosse longue verte	0,45	0,69	0,82	0,73	0,82	0,82	0,52	0,52	0,64	0,54	0,73	0,61	0,55	0,67	0,75	0,53	0,70	0,67	1,00		
Roscoff	0,70	0,74	0,52	0,78	0,52	0,52	0,58	0,58	0,61	0,87	0,70	0,67	0,61	0,80	0,72	0,30	0,50	0,72	0,64	1,00	
Col de Dame blanche (éch. 2)	0,30	0,58	1,00	0,57	1,00	1,00	0,48	0,48	0,50	0,50	0,50	0,48	0,40	0,63	0,64	0,47	0,57	0,54	0,82	0,52	1,00

L'identification de 21 individus de figuier pourrait être réalisée par un choix de 5 à 6 marqueurs indépendants. Or, il faut au moins 17 marqueurs, puisque les deux génotypes les plus proches (S = 0,91) ont en commun 16 allèles (Tableau III, Figure 3). Le fait que ce nombre de marqueurs nécessaire est multiplié par un facteur de 3 suggère que certains de ces loci sont liés, et/ou qu'un sous-ensemble de combinaisons multilocus n'est pas représenté sous l'effet de l'échantillonnage. Le nombre de marqueurs à utiliser dans ce type d'étude est important puisqu'il s'agit de pouvoir séparer les différents génotypes par le minimum de marqueurs possibles afin d'économiser le coût d'analyse [23].

Variabilité génétique chez le figuier

Les 12 amorces utilisées dans cette étude ont donné 48 produits d'amplification répétables, soit 4 produits d'amplification par amorce en moyenne. Ce nombre est faible comparé à celui obtenu chez d'autres espèces [16, 22, 26, 43, 45]. L'obtention d'un tel résultat limite le nombre de marqueurs RAPD qui est en moyenne de 1,5 chez le figuier (Tableau II). Dans un cas comme le pommier où une seule amorce a donné 14 produits d'amplification [22], les 19 marqueurs peuvent être obtenus par 2 à 4 amorces contrairement aux 12 amorces utilisées dans notre étude. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en augmentant la résolution des produits d'amplification, permet d'avoir plus de marqueurs RAPD que l'électrophorèse sur gel d'agarose [6, 13].

Sur un ensemble de 85 amorces testées, 27 ont révélé du polymorphisme (soit 29 %). Ce polymorphisme est plus faible que celui obtenu chez d'autres espèces [16, 25, 39, 45]. Il était donc nécessaire de procéder à une première sélection d'amorces révélant du polymorphisme au sein d'un sous-ensemble de 4 génotypes. Cette méthode a permis d'économiser les coûts et le temps en évitant d'analyser inutilement l'ensemble des échantillons par des amorces non informatives. Néanmoins, le polymorphisme révélé par l'utilisation des amorces sélectionnées est étroitement lié à la base génétique formée par ces quatre génotypes. Il peut, de ce fait, introduire un biais dans l'analyse de la variabilité génétique de l'ensemble des échantillons. L'indice de similarité moyen pour ces 4 génotypes est de 0,54 ; il n'est guère différent de l'indice moyen pour l'ensemble des échantillons qui est de 0,61. Ces 4 génotypes constituent alors un sous-ensemble représentatif de la variabilité génétique existant au sein de l'ensemble des échantillons. De ce fait, le choix de ces génotypes n'introduit pas de biais quant à l'analyse de la variabilité.

La matrice résultant du calcul de l'indice de similarité pour l'ensemble des échantillons pris deux à deux (Tableau III) montre que cet indice varie de 0,30 à 0,91 pour les génotypes ainsi identifiés, avec une moyenne d'environ 0,61, et une variation de 23 %. Les génotypes caractérisés partagent alors une base génétique relativement large. Cependant, l'apparentement entre ces individus, illustré par le dendrogramme (Figure 4) montre qu'il n'y a pas de groupement de génotypes bien individualisés. Les travaux de Van Heusden et Bachmann [34] montrent que chez *Microseris elegans*, 10 génotypes dont chacun est caractéristique d'un biotope et d'une population, sont nettement séparés en 4 groupes, alors que leur indice de similarité ne varie que de 0,48 à 0,91 avec une moyenne de 0,64 et une variation de 20 %. Cette séparation en groupes est en rapport avec la distribution géographique des populations de *Microseris elegans* ainsi que le flux de gènes relativement limité. La variabilité génétique existant au sein des génotypes de figuier n'est pas structurée, malgré un indice de similarité qui varie de 0,30 à 0,91, probablement sous l'effet d'un important brassage de gènes.

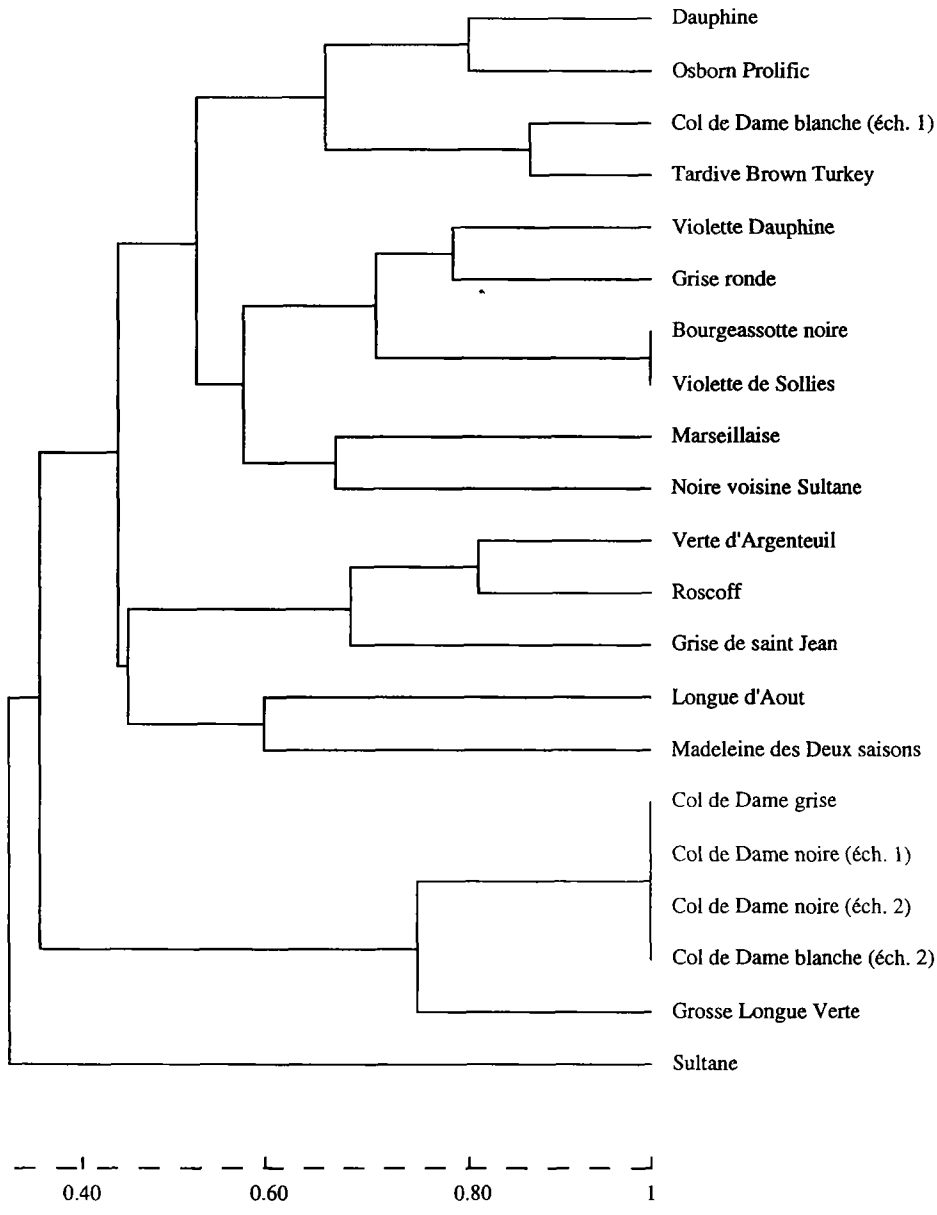


Figure 4. Dendogramme construit par UPGMA à partir de l'indice de similarité de Nei et Li [27].

Conclusion

Cette étude montre que l'application des marqueurs RAPD pour l'identification de variétés au sein d'une collection est possible. Elle a permis de caractériser les marqueurs qui peuvent servir pour identifier l'ensemble des échantillons présents dans une collection comme celle du conservatoire botanique de Porquerolles. En effet, les 19 marqueurs déterminés permettent d'obtenir, sous l'hypothèse d'indépendance, 524 288 (2^{19}) profils multilocus différents. Un ensemble de 500 échantillons devrait facilement être identifié. Cette technique offre, en outre, l'avantage d'être facile à mettre en œuvre et permet d'éviter l'emploi de la radioactivité et d'obtenir rapidement des résultats [28]. Cependant, elle présente l'inconvénient d'être très sensible au moindre changement dans les conditions de PCR. Bien que travaillant avec les mêmes conditions optimales, il arrive parfois que la PCR soit médiocre ou absente, ce qui montre que certains paramètres ne sont pas encore maîtrisés [44]. En vue d'obtenir des résultats reproductibles, il est donc primordial de faire une sélection intense sur les amorces et sur les produits d'amplification.

Cette étude montre que ces génotypes ont une base génétique relativement large sans différenciation en groupes distincts. La variabilité non structurée obtenue est due probablement à un brassage de gènes, mais le faible nombre d'échantillons analysés, pour l'essentiel d'origine française, ne permet pas de tester cette hypothèse. Condit [10] dénombre un peu plus de 600 variétés de figuier provenant de différents pays méditerranéens. Il serait donc intéressant d'élargir l'étude à un plus grand nombre de variétés issues de régions différentes et de comparer les résultats obtenus à d'autres études sur la variabilité génétique des populations naturelles de *Ficus carica*. Cependant, les marqueurs RAPD présentent l'inconvénient d'être dominants car la présence d'un fragment d'ADN amplifié ne permet pas de distinguer un hétérozygote d'un homozygote [7, 15]. Dans ces conditions, les études de génétique des populations, qui sont importantes pour comprendre les flux de gènes au sein des populations, sont difficilement réalisables. Néanmoins, des premiers travaux utilisant les marqueurs RAPD pour l'étude de la différentiation génétique entre populations naturelles montrent l'intérêt de ces marqueurs dans ce type d'études [8, 17, 26, 34]. La comparaison de la diversité génétique entre les génotypes cultivés et les populations naturelles conduit à l'évaluation des ressources génétiques de l'espèce. Ces connaissances permettront de savoir s'il faut élargir le pool génétique des collections, et d'établir une stratégie d'échantillonnage dans les populations naturelles. Une étude utilisant à la fois les marqueurs RAPD et les alloenzymes permettrait de mieux comprendre les relations génétiques entre plantes cultivées et sauvages de *Ficus carica*.

Remerciements : ce travail a été principalement réalisé au Laboratoire des Ressources Génétiques et Amélioration des Plantes Tropicales, ORSTOM, Montpellier ; que le Pr A. Charrier, M. S. Hamon et M. A. Ghesquière soient remerciés pour leur accueil. Les auteurs tiennent à remercier les trois fournisseurs des échantillons de figuier (P. Baud, P. Llenas, J. P. Roger). Ils remercient également G. Laurent pour la mise en culture sous serre du matériel végétal, M. Ch. Gavalda et Ph. Marmey pour l'aide technique qu'ils ont apportée aux analyses. Ce travail a été financé par le contrat INRA-CEE, n° D.G. VI-CT 91105.

Références

1. Arnold ML, Buckner CM, Robinson JJ (1991). Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 1398-1402.
2. Atkinson MD, Withers LA, Simpson MJA (1986). Characterisation of cacao germplasm using isoenzyme markers. *Euphytica* 35 : 741-750.
3. Bailey DC (1983). Isozymic variation and plant breeders' rights. In : Tanksley SD, Orton TJ, eds. *Isozymes in plant genetics and breeding*, Part A. Elsevier, Amsterdam : 425-441.
4. Beckmann JS, Soller M (1983). Restriction fragment length polymorphism in genetic improvement : methodologies, mapping and cost. *Theor Appl Genet* 67 : 33-43.
5. Benzecri JP (1973). L'analyse des données. *La taxonomie,* tome 1. Paris, Dunod, 616 p.
6. Caetano-Anolles G, Bassam BJ, Gresshoff PM (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary primers. *Bio/Technology* 9 : 553-557.
7. Carlson JE, Tulsieram LK, Glaubitz JC, Luk VWK, Kauffeldt C, Rutledge R (1991). Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theor Appl Genet* 83 : 194-200.
8. Chalmers KJ, Waugh R, Sprent JI, Simons AJ, Powell W (1992). Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity* 69 : 465-472.
9. Condit IJ (1950). Figs characters as affected by climate. *Am Soc Hort Sci Proc* 44 : 211-214.
10. Condit IJ (1955). Figs varieties : a monograph. Hilgardia, Berkeley 23 : 323-538.
11. Dallas JF (1988). Detection of DNA « fingerprints » of cultivated rice by hybridization with a human minisatellite probe. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 6831-6835.
12. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA preparation. Version II. *Plant Mol Biol Rep* 4 : 19-21.
13. Dweikat I, Mackenzie S, Levy M, Ohm H (1993). Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. *Theor Appl Genet* 85 : 497-505.
14. Felsenstein J (1987). Phylip, ver. 3.0 (computer sofware and manual). Dept. genetics. University of Washington, Seattle, W.A. 98195, USA.
15. Hadrys H, Balick M, Schierwater B (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol* 1 : 55-63.
16. Hu J, Quiros CF (1991). Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep* 10 : 505-511.
17. Huff DR, Peakall R, Smouse PE (1993). RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.). *Theor Appl Genet* 86 : 927-934.
18. Hunt GJ, Page REJr (1992). Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. *Theor Appl Genet* 85 : 15-20.
19. Kazan K, Manners JM, Cameron DF (1993). Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified plymorphic DNA markers. *Theor Appl Genet* 85 : 882-888.
20. Kjellberg F, Gouyon PH, Ibrahim M, Raymond M, Valdeyron G (1987). The stability of the symbiosis between dioecious figs and their pollinators : a study of *Ficus carica* L. and *Blastophaga psenes* L. *Evolution* 41 : 693-704.
21. Klein-Lankhorst RM, Vermunt A, Weide R, Liharska T, Zabel P (1991). Isolation of molecular markers for tomato *(L. esculentum)* using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor Appl Genet* 83 : 1549-1551.
22. Koller B, Lehmann A, McDermott JM, Gessler C (1993). Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor Appl Genet* 85 : 901-904.
23. Kresovich S, Williams JGK, McFerson JR, Routman EJ, Schaal BA (1992). Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theor Appl Genet* 85 : 190-196.

24. Lashermes Ph, Cros J, Marmey Ph, Charrier A (1993). Use of random amplified polymorphic DNA markers to analyse genetic variability and relationships of Coffea species. *Crop Evol Genet Ress* 40 : 91-99.
25. Marmey Ph, Beeching JR, Hamon S, Charrier A (soumis). Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of african cassava Manihot esculenta Crantz. *Crop Evol Genet Ress.*
26. Mosseler A, Egger KN, Hughes GA (1992). Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA markers. *Can J For Res* 22 : 1332-1337.
27. Nei M, Li WH (1979). Mathemical model for studying genetical variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 : 5267-5273.
28. Newbury HJ, Ford-Lloyd BV (1993). The use of RAPD for assessing variation in plants. *Pl Grow Reg* 12 : 43-51.
29. Nybom H, Hall HK (1991). Minisatellite DNA « fingerprints » can distinguish Rubus cultivars and estimate their degree of relatedness. *Euphytica* 53 : 107-114.
30. Ouazzani N, Lumaret R, Villemur P, Di Giusto F (1993). Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive trees *(Olea europea* L.). *J Heredity* 84 : 34-42.
31. Reiter RS, Williams JGK, Feldmann K, Rafalski JA, Tingey SV, Scolnik PA (1992). Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 1477-1481.
32. Valdeyron G, Valizadeh M (1976). L'identification variétale du figuier, *Ficus carica* L. par l'étude du polymorphisme enzymatique par électrophorèse. *CR Acad Agri* 62, 3 : 170-175.
33. Valizadeh M, Rivals P, Valdeyron G (1977). Utilisation du polymorphisme protéique pour l'étude des variétés de figuier *(Ficus carica* L.). *CR Acad Agri* 63, 10 : 647.
34. Van Heusden AW, Bachmann K (1992). Genotype relationships in *Microseris elegans* (Asteraceae, Lactuceae) revealed by DNA amplification from arbitrary primers (RAPDs). *Pl Syst Evol* 179 : 221-233.
35. Weeden NF, Lamb RC (1985). Identification of apple cultivars by isoenzyme phenotypes. *J Am Soc Hortic Sci* 110 : 509-515.
36. Weising K, Ramser J, Kaemmer D, Kahl G, Epplen JT (1991). In : Burke T, Dolf J, Jeffreys AJ, Wolff R, eds. *DNA fingerprinting : approaches and applications.*
37. Welsh J, McClelland M (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18 : 7213-7218.
38. Welsh J, Honeycutt RJ, McClelland M, Sobral BWS (1991). Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor Appl Genet* 82 : 473-476.
39. Wilde J, Waugh R, Powell W (1992). Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor Appl Genet* 83 : 871-877.
40. Wilkie SE, Isaac PG, Slater RJ (1993). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in Allium. *Theor Appl Genet* 86 : 497-504.
41. Williams JGK, Kubelik AR, Kenneth JL, Rafalski JA, Tingey SV (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18 : 22, 6531.
42. Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA, Tingey SV (1993). Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol* 51 : 704-740.
43. Wolff K, Peters-Van Rijn J (1993). Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum *(Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. *Heredity* 71 : 335-341.
44. Wolff K, Schoen ED, Peters-Van Rijn J (1993). Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in chrysanthemum. *Theor Appl Genet* 86 : 1033-1037.
45. Yang X, Quiros C (1993). Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor Appl Genet* 86 : 205-212.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 413-422.

42

Amélioration génétique du palmier dattier assistée par les marqueurs biochimiques et moléculaires

M. BAAZIZ, K. BENDIAB

Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire des Plantes,
Département de Biologie, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences,
BP S 15, Marrakech, Maroc.

Résumé

Le palmier dattier, Phoenix dactylifera L., *monocotylédone pérenne, est menacé de disparition au nord de l'Afrique par une fusariose vasculaire, appelée « Bayoud ». Ce sont les cultivars de haute qualité dattière qui sont les plus sensibles à la maladie. Les programmes d'amélioration génétique de la plante visent, généralement, l'obtention de palmiers résistants au Bayoud et de bonne qualité fruitière. Les croisements dirigés entre les cultivars résistants au Bayoud et les palmiers mâles résistants ou sensibles à la maladie donnent naissance à des génotypes différents pouvant allier la résistance à la fusariose et la bonne qualité des fruits. L'électrophorèse d'extraits enzymatiques de feuilles sur gel de polyacrylamide, suivie de la révélation* in situ *de différentes isoenzymes, permet d'évaluer la diversité des populations F1. L'étude de 3 loci montrant le caractère d'hybrides, et qui sont à l'origine des activités enzymatiques des estérases* (EST-1), *glutamate oxaloacétate transaminase* (GOT-2) *et endopeptidases* (ENP), *permet une meilleure prédiction des génotypes parentaux connaissant la population F1 qui en résulte et inversement. L'association (linkage) des gènes de la résistance au Bayoud, avec les 7 allozymes transmis selon une ségrégation mendélienne, sera d'un grand apport dans la lutte contre la maladie du Bayoud décimant le palmier dattier.*

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), espèce pérenne, est, par tradition, multiplié par plantation de rejets produits à la base des différents cultivars. Ce mode de propagation tend à conserver la conformité génétique des plantes. Ainsi, les cultivars de très bonne qualité dattière, tels que Bou-Feggous et Mejhoul, ont été reproduits et domestiqés au fil des années. L'apparition de la maladie du Bayoud, fusariose vasculaire à *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* [9, 13], a montré que les cultivars de haute qualité dattière sont les plus sensibles au Bayoud. De plus, la plantation de rejets non suffisamment désinfectés contribue à la propagation du champignon causal de la maladie. Dès lors, la nécessité d'une amélioration génétique du palmier dattier commença à s'imposer. Ele doit viser l'obtention de palmiers résistants au Bayoud et de bonne qualité dattière, pouvant être cultivés même sur des sols contaminés par le champignon. Comme la résistance au Bayoud est liée à des caractères indésirables et que le greffage de cultivars de haute qualité dattière sur des cultivars résistants reste impossible, l'obtention de palmiers associant les bons traits de résistance et de qualité fruitière doit passer par des croisements dirigés utilisant un ou plusieurs géniteurs de résistance. Au Maroc, six cultivars, seulement, sont reconnus résistants au Bayoud [10]. En Algérie, seule la variété Takerboucht, présente en effectif réduit, est résistante.

Afin d'identifier facilement les géniteurs de résistance, les palmiers utilisés dans les croisements dirigés et les jeunes plants qui en résultent, l'utilisation de marqueurs biochimiques et moléculaires s'avère nécessaire. En effet, le palmier dattier présente une croissance très lente et la fructification survenant après 5 à 7 ans de culture reste l'étape capitale dans l'identification variétale. Ainsi, de nombreuses analyses ont été réalisées sur plusieurs organes de la plante, tels que les feuilles [2, 3, 5, 7, 13], les fruits [1, 11] et les graines [8].

Le succès dans la création de nouvelles variétés par des croisements dirigés est lié à la connaissance du mode de transmission des traits agronomiques recherchés. Ainsi, l'obtention de marqueurs biochimiques et moléculaires transmissibles selon la loi de Mendel est d'un grand apport dans l'amélioration génétique du palmier dattier [6, 12]. En effet, l'association étroite d'au moins un marqueur avec, par exemple, les gènes gouvernant la résistance au Bayoud permet, en détectant le(s) marqueur(s) dans la descendance, de suivre la transmission de la résistance à cette fusariose vasculaire.

Dans cet exposé, une clef d'identification des cultivars de palmier dattier est expliquée. Elle est basée sur l'étude électrophorétique des systèmes enzymatiques constitués par les estérases (EST), la glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et les endopeptidases (ENP). La mise en évidence de loci montrant le caractère d'hybrides avec des allèles à ségrégation mendélienne a permis d'identifier les plants des populations F1 résultant de 7 croisements dirigés.

Matériel et méthodes

Les folioles de la couronne moyenne du bouquet foliaire de 29 cultivars de palmier dattier proviennent de Zagora (sud du Maroc). Elles correspondent aux variétés : Admou (ADM), Aguellid (AGL), Ahardane (AHD), Bou-Cerdoun (BCD), Bou-Feggous (BFG), Bou-Feggous ou Moussa (BFGM), Bou-Ijjou (BIJ), Bou-Ittob (BIT), Bou-Slikhene (BSL), Bou-Skri (BSK), Bou-Sthammi noire (BSTN), Bou-Sthammi blanche (BSTB), Bou-Temda (BTD), Bou-Zeggar (BZG), Haoua (HOA), Iklane (IKL), Jihel (JHL), Mah-Lbaid (MLB), Mejhoul (MJH), Mekt (MKT), Mest-Ali (MST), Oum-N'hal (OMH), Outoukdim (OTK), Race-Lahmar (RLM), Sair-Layalet (SLY), Tadment

(TDMT), Bel-Hazit (BAZ), Azigzao (AZO) et Aissa-Youb (AIB). Six cultivars sont très résistants au Bayoud. Ce sont BSTN, IKL, TDMT, BFGM, BSTB et SLY. Les cultivars BFG, MJH, JHL et BSK sont très sensibles à la fusariose. Plusieurs variétés telles que BSL, BZG, MLB et OTK sont de résistance intermédiaire. Les meilleures dattes sont données par les cultivars sensibles au Bayoud, comme MJH, BFG et AGL.

Dans le but d'obtenir des populations F1 de jeunes plants de palmier dattier, plusieurs croisements dirigés ont été effectués, d'une part entre 4 cultivars résistants au Bayoud et de faible à moyenne qualité dattière (IKL, BSTN, SLY et BSL), et un mâle (M-2, INRA) et d'autre part, entre 3 cultivars sensibles de bonne qualité dattière (BSK, JHL et AGL) et un mâle (M-1, INRA). Les graines provenant des différents croisements sont mises en germination et les jeunes plants qui en résultent sont cultivés en serre jusqu'au stade 2 feuilles.

Les méthodes d'extraction des enzymes à partir des feuilles de palmier dattier, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide et la révélation des isoenzymes ont été décrites dans des travaux antérieurs [5, 6].

Résultats et discussion

L'électrophorèse d'extraits enzymatiques, préparés à partir des folioles de palmiers adultes et des feuilles de jeunes plants issus de graines, a permis d'obtenir des zymogrammes nets pour les 3 enzymes étudiées (EST, GOT et ENP). Dans une première étape, l'interprétation des zymogrammes a été faite sur la base des phénotypes électrophorétiques qui résultent de l'expression d'au moins un gène pour chaque enzyme. L'inventaire des phénotypes obtenus pour chaque enzyme est montré dans la Figure 1. Ainsi, les estérases (EST), la glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et les endopeptidases (ENP) présentent, respectivement, 11, 8 et 5 phénotypes. A l'exception des ENP migrant en une seule zone dans le gel, les EST et la GOT montrent 2 zones de migration notées, respectivement, GOT-1 et GOT-2 puis EST-1 et EST-2. Les phénotypes ayant plus de bandes d'activité sont A, B, J et K pour les EST ; A, B, G et H pour la GOT et A, D et E pour les ENP.

Afin d'exploiter les zymogrammes sur le plan génotypique, des loci à déterminisme génétique simple ont été définis [5]. Ainsi, les zones d'activité GOT-2 et EST-1 correspondent, chacune, à un locus codant pour une molécule dimérique avec 2 allèles. Les endopeptidases résultent de l'expression d'un locus à l'origine d'une enzyme monomérique avec 3 allèles. Les génotypes qui résultent de la ségrégation des allèles sont résumés dans la Figure 2. Le locus *ENP* donne naissance à 6 génotypes différents dont 3 hétérozygotes (A'B', A'C' et B'C') et 3 homozygotes (A'A', B'B' et C'C'). Les loci *EST-1* et *GOT-2* montrent, chacun, trois génotypes où les hétérozygotes sont A'B'. Ainsi, dans le cas des EST et de la GOT, un génotype peut être rencontré dans plusieurs phénotypes. Par exemple, le génotype A'B' de la GOT est retrouvé dans les phénotypes électrophorétiques A, B et G de la même enzyme. Les homozygotes A'A' et B'B' du locus EST-1 sont représentés, respectivement, par les phénotypes F, G et H, d'une part et C, D, E et I, d'autre part.

Afin d'identifier les cultivars de palmier dattier, géniteurs de résistance ou porteurs d'autres traits agronomiques, une clef d'identification de 29 cultivars des palmeraies du sud du Maroc a été établie sur la base des phénotypes électrophorétiques (Figure 3). Chaque cultivar est reconnu par la succession de 3 phénotypes isoenzymatiques détec-

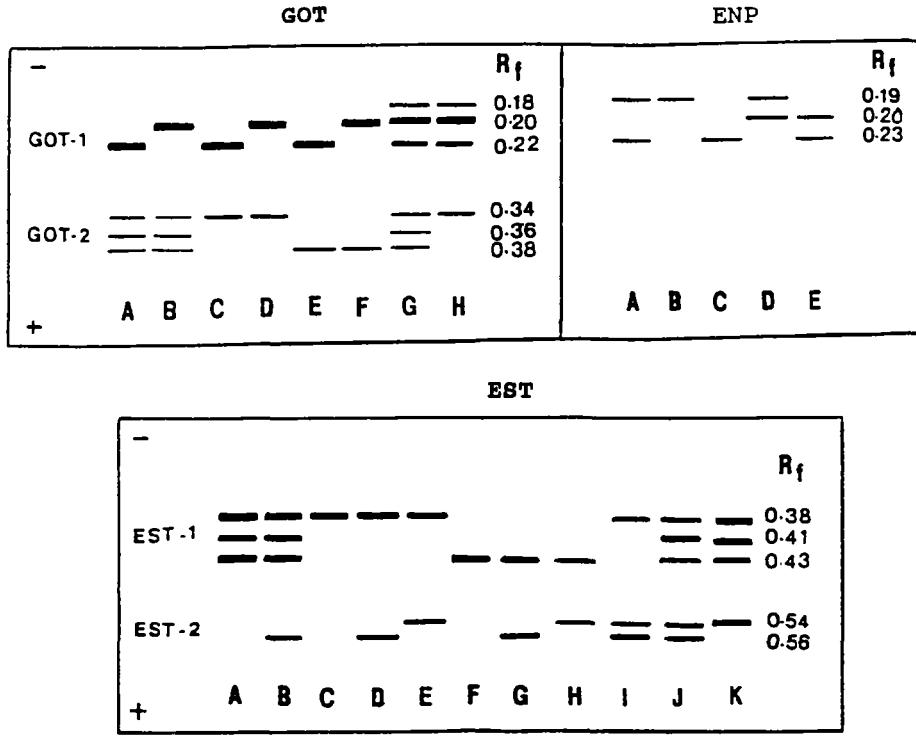


Figure 1. Phénotypes électrophorétiques (A-L) des systèmes enzymatiques constitués par la glutamate oxaloacétate transaminase (GOT), les endopeptidases (ENP) et les estérases (EST), révélés au niveau des feuilles de palmier dattier.

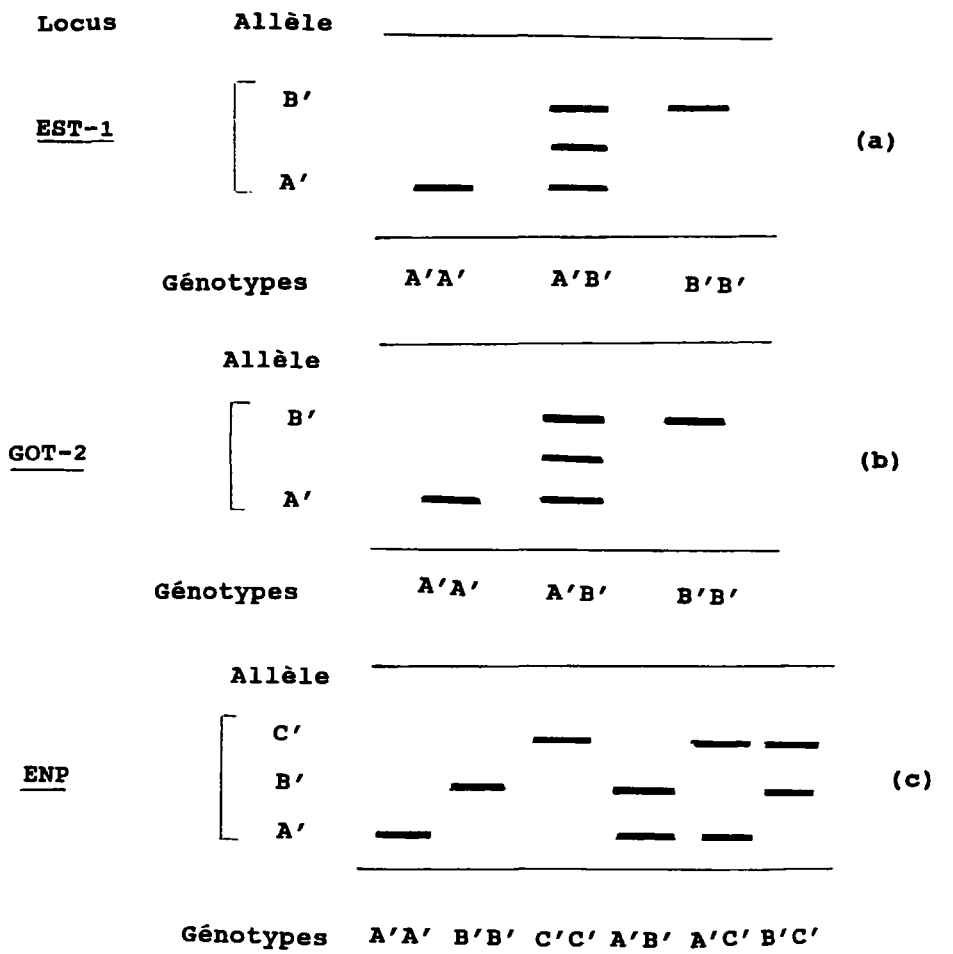


Figure 2. Interprétation génétique des isoenzymes correspondant aux loci *EST-1* (a), *GOT-2* (b) et *ENP* (c) correspondant, respectivement, aux estérases, glutamate oxaloacétate transaminase et endopeptidases révélées au niveau des feuilles du palmier dattier.

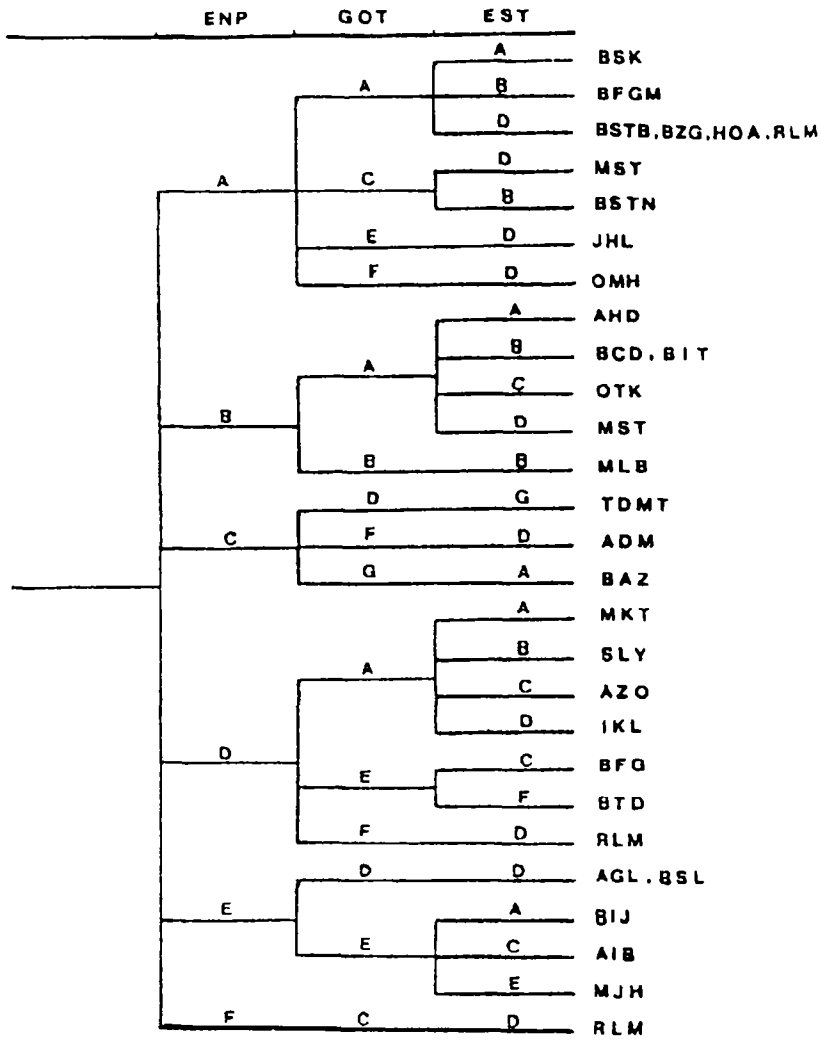


Figure 3. Clef d'identification de 29 cultivars de palmier dattier basée sur les phénotypes électrophorétiques (A-G) des endopeptidases (ENP), glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et estérases (EST), révélés au niveau des folioles de palmiers adultes.

tés au niveau des folioles. Ainsi, la variété MJH, de très bonne qualité dattière, est caractérisée par le phénotype E pour l'ensemble des enzymes. Les 6 cultivars très résistants (BFGM, BSTB, BSTN, TDMT, SLY et IKL) présentent 3 phénotypes pour les ENP ; A pour BFGM, BSTB et BSTN, C pour TDMT et D pour IKL et SLY. Une proportion de 70 % des cultivars peut être caractérisée. Néanmoins, certaines variétés peuvent former des groupes de mêmes phénotypes. Ainsi, le cultivar AGL reste associé au cultivar SLY. Aussi, 2 cultivars, RLM et MST, montrent plusieurs successions de phénotypes isoenzymatiques, démontrant leur variabilité et la difficulté de leur caractérisation. La clef d'identification variétale du palmier dattier est d'un grand apport dans la caractérisation des jeunes palmiers n'ayant pas atteint le stade de fructification. Elle permet également d'estimer la conformité génétique des jeunes plants issus de la culture de tissus et d'orienter le choix du matériel végétal pour de nouvelles plantations dans les palmeraies dévastées par le Bayoud.

La multiplication végétative du palmier dattier par des rejets identiques aux pieds mères contribue à un appauvrissement du pool génétique. La culture de palmiers provenant de croisements dirigés variés reste un moyen d'augmenter la diversité génétique du palmier dattier et d'avoir, ainsi, plus de chance dans la combinaison des traits de la résistance au Bayoud et de la bonne qualité fruitière. L'analyse électrophorétique des jeunes plants de palmier dattier constituant les populations F1 a permis de déterminer les phénotypes électrophorétiques rencontrés chez les descendants. Leurs fréquences ainsi que la comparaison des parents et des descendants sur la base des systèmes enzymatiques EST, ENP et GOT sont données dans les Tableaux I et II. Dans la majorité des cas, les 2 phénotypes les plus fréquents pour une population F1 correspondent à celui du phénotype du cultivar parent. Ainsi, la descendance du cultivar JHL (lot 6) est identifiée par les phénotypes les plus fréquents ; E, D et A pour la GOT, EST et ENP, respectivement. Le cultivar parent (JHL) montre les mêmes phénotypes pour chaque enzyme. Près de 80 des comparaisons ont montré une similitude des phénotypes entre le cultivar parent et sa descendance. Des cas d'absence de conformité phénotypique sont obtenus pour certaines enzymes. Ainsi, par exemple, dans le cas des ENP, le croisement du cultivar BSL (phénotype E, hétérozygote) avec le mâle M-2 (phénotype B, homozygote) donne naissance à une descendance dont les phénotypes les plus fréquents sont A (hétérozygote) et D (hétérozygote), tous différents du phénotype parental. Cela peut être expliqué, facilement, par la ségrégation mendélienne des allozymes. En effet, le croisement des génotypes A'B' et C'C' ne peut donner lieu qu'à 2 génotypes A'C' et B'C'. Les autres cas de non-conformité des phénotypes des descendants et du cultivar parent sont retrouvés dans les croisements d'homozygotes différents, n'entraînant la formation que d'hétérozygotes. C'est le cas des croisements IKL X M-2 pour les EST et AGL X M-1 pour la GOT.

Il résulte de cette étude une prédiction des génotypes, voire même des phénotypes des parents connaissant les génotypes des descendants ou inversement. Cela sera d'un grand intérêt dans l'identification des cultivars décimés par le Bayoud. Par ailleurs, la présence d'un génotype dans plusieurs phénotypes, généralement similaires à celui du cultivar (parent femelle), laisse suggérer la présence d'une hérédité maternelle de plusieurs isoenzymes qui ont tendance à coexister avec le génotype de type maternel.

L'association des gènes de la résistance au Bayoud avec les marqueurs à hérédité mendélienne serait de grande importance pour l'étude de la transmission de la résistance à la fusariose du palmier dattier. Ce but ne peut être atteint qu'après identification des gènes de la résistance au Bayoud et la précision de leur situation sur une carte génétique complète.

Tableau I. Fréquences des phénotypes isoenzymatiques (A-K) des estérases (EST), glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et endopeptidases (ENP), révélés dans 7 populations F1 de plants de palmier dattier issues de 7 cultivars (lot 1 : IKL ; lot 2 : BSTN ; lot 3 : SLY ; lot 4 : BSL ; lot 5 : BSK ; lot 6 : JHL et lot 7 : AGL) croisés avec 2 mâles, M-2 et M-1 de phénotypes (EST, GOT, ENP) respectifs ; (F, A, B) et (D, E, A).

Enzyme	Phénotype[a]	Lots						
		Lot 1 (52)	**Lot 2 (54)**	**Lot 3 (56)**	**Lot 4 (52)**	**Lot 5 (53)**	**Lot 6 (65)**	**Lot 7 (56)**
EST	A	0,30	–	0,02	0,18	0,16	–	–
	B	0,30	0,24	0,29	0,24	0,22	–	–
	C	–	–	–	0,16	0,10	–	0,17
	D	–	–	0,08	0,31	0,12	0,53	0,50
	E	–	–	–	0,07	0,04	0,32	0,23
	F	0,18	–	–	–	0,02	–	–
	G	0,20	0,30	0,36	–	0,06	–	–
	H	0,02	0,28	0,06	–	0,14	–	–
	I	–	–	–	–	–	0,15	0,10
	J	–	–	0,02	0,04	–	–	–
	K	–	0,18	0,17	–	0,14	–	–
GOT	A	0,50	0,36	0,43	0,58	0,46	–	1,00
	B	–	0,22	–	0,17	–	–	–
	C	0,23	0,40	0,24	0,15	0,10	–	–
	D	0,02	0,02	0,02	0,06	–	–	–
	E	0,21	–	0,31	–	0,44	0,85	–
	F	0,04	–	–	–	–	0,15	–
	G	–	–	–	0,02	–	–	–
	H	–	–	–	0,02	–	–	–
ENP	A	–	0,50	0,05	0,64	0,51	0,44	0,25
	B	0,26	0,50	0,36	0,02	0,21	0,37	–
	C	–	–	0,04	0,02	0,28	0,19	0,20
	D	0,74	–	0,55	0,32	–	–	0,21
	E	–	–	–	–	–	–	0,34

[a] Voir Figure 1 pour l'identification des différents phénotypes (A-K)

Tableau II. Comparaison des phénotypes isoenzymatiques (A-H) de la glutamate oxaloacétate transaminase (GOT), estérases (EST) et endopeptidases (ENP), révélés au niveau des feuilles de palmiers dattiers mâles (M), femelles (F) et descendants de la population F1 (F1).

Enzyme		Lots						
		1	2	3	4	5	6	7
GOT	M	A	A	A	A	E	E	E
	F	A	C	A	D	A	E	D
	F_1	(A, C)	(C, A)	(A, E)	(A, B)	(A, E)	(E, F)	(A)
EST	M	F	F	F	F	D	D	D
	F	D	B	B	D	A	D	D
	F_1	(A, B)	(G, H)	(G, B)	(D, B)	(B, A)	(D, E)	(D, E)
ENP	M	B	B	B	B	A	A	A
	F	D	A	D	E	A	A	E
	F_1	(D, B)	(A, B)	(D, B)	(A, D)	(A, C)	(A, B)	(E, A)

Remerciements

Ce travail a été financé par la Fondation Internationale pour la Science à Stockholm, Suède (IFS D/1359).

Références

1. Al-Helal AA (1988). Amylase isoenzymes and protein of date palm *(Phoenix dactylifera* L.). *Bot Bull Academia Sinica* 29 : 239-244.
2. Baaziz M (1989). The activity and preliminary characterization of peroxidases in leaves of cultivars of date palm, *Phoenix dactylifera* L. *New Phytol* 111 : 403-411.
3. Baaziz M, Saaidi M (1988). Preliminary identification of date palm cultivars by esterase isoenzymes and peroxidase activities. *Can J Bot* 66 : 89-93.
4. Baaziz M, Bendiab K, Brakez Z, Ait Chitt M (1993). Le polymorphisme enzymatique du palmier dattier *(Phoenix dactylifera* L.) utilisé comme marqueur de la conformité génétique des vitroplants. In : *Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes.* AUPELF-UREF, Ed John Libbey Eurotext, Paris : 155-158.
5. 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. Diplôme d'Études Supérieures, Université Cadi Ayyad, Marrakech.
6. 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.
7. Bennaceur M, Lanaud C, Chevallier M, Bounaga N (1991). Genetic diversity of the date palm *(Phoenix dactylifera* L.) from Algeria revealed by enzyme markers. *Plant Breed* 107 : 56-69.
8. Chandra Sekhar K, De Mason DA (1988). Quantitative ultrastructure and protein composition of date palm *(Phoenix dactylifera* L.) seeds : a comparative study of endosperm vs. embryo. *Am J Bot* 75 : 323-329.

9. Malencon G (1934). La question du Bayoud au Maroc. *Ann Cryptogam Exot* 7 : 1-41.
10. Saaidi M (1979). Contribution à la lutte contre le Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier. Thèse de Doctorat d'Université, Université de Dijon.
11. Stegemann H, Afify AMR, Hussein KRF (1987). Identification of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars by protein patterns. *Phytochemistry* 26 : 149-153.
12. Torres AM, Tisserat B (1980). Leaf isozymes as genetic markers in date palm. *Am J Bot* 67 : 162-167.
13. Toutain G, Louvet J (1974). Lutte contre le Bayoud. IV. Orientation de la lutte au Maroc. *Awamia* 53 ; 141-162.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 423-431.

43

Comparaison de la tolérance à la sécheresse chez deux génotypes de maïs marocains. Étude au niveau macroscopique, microscopique et moléculaire

M. CHOKAIRI, H. CHLYAH

Laboratoire de Physiologie Végétale, Département de Biologie, Université Mohammed V, BP 1014 Rabat, Maroc.

La capacité d'évaluer quantitativement les performances des plantes subissant un stress hydrique est très importante au niveau des programmes de recherche qui visent la réhabilitation des régions arides et l'amélioration de la production des plantes cultivées en régions semi-arides.

Les techniques de criblage des variétés qui corrèlent bien avec les réponses obtenues en champs sont nécessaires dans la mesure où elles permettent une importante réduction du temps et des efforts que demanderait une évaluation en champs.

Ces techniques doivent par ailleurs permettre l'évaluation des performances à différents stades de développement de la plante, s'accomplir dans un laps de temps réduit et requérir une faible quantité de matériel végétal.

Dans cette optique, nous proposons un test qui permet d'évaluer indirectement les différences de potentiel osmotique chez deux génotypes de maïs marocains, en déterminant le nombre de protoplastes lysés par passage d'un milieu hypertonique (1,2 MPa) à un milieu hypotonique (0,6 MPa).

La tolérance à la sécheresse est également évaluée par le test de germination dans le mannitol [1, 11, 17, 18], l'élongation des tiges en cas de stress hydrique et la capacité de rétention d'eau par les feuilles excisées [2, 13, 14, 18], qui est considérée comme un caractère héréditaire opérant seulement pendant la période végétative [4-6, 8] et corrélant positivement avec le rendement en champs durant les périodes de sécheresse [7].

L'étude des isoenzymes est réalisée en vue de caractériser les populations étudiées, évaluer leur uniformité structurale et trouver d'éventuelles corrélations avec la tolérance à la sécheresse.

Matériel et méthodes

Les génotypes étudiés proviennent de la station de recherche céréalière de Rabat où ils sont répertoriés sous les noms de Rehamna et Amizmiz 139.

La germination des caryopses est réalisée à l'obscurité et à 25 °C, en présence d'eau distillée ou d'une solution de mannitol (0,72 MPa). Le nombre de semences germées est déterminé au 4e, 5e et 6e jour. L'indice de tolérance à la sécheresse (ITS) est calculé d'après l'équation proposée par Jaradat et Duwayri (1981) :

$$ITS = IVmannitol/IVeau \text{ avec } IV = \sum (N_i \times T_i)$$

IV étant l'indice de vigueur défini par Maguire et N_i le nombre de semences ayant germé au jour T_i.

Après germination sur eau distillée, les plantules sont repiquées et placées en serre sous éclairement naturel et arrosées quotidiennement avec de l'eau déminéralisée jusqu'au 27e jour. L'apport d'eau est alors suspendu pendant 15 jours puis repris au 42e jour. Les plantes sont récoltées après 48 jours de culture.

Les pertes d'eau par les feuilles excisées sont déterminées à différents niveaux foliaires et âges de la plante. Juste après leur excision, les feuilles sont pesées et placées à l'obscurité, 25 °C et 50 % d'humidité relative. Les variations de la masse de matière fraîche sont évaluées toutes les 30 ou 60 minutes pendant 7 heures.

Les protoplastes sont préparés à partir des feuilles par incubation d'une durée de 3 heures à l'obscurité et 27 °C dans une solution CPW contenant 2 % de cellulase R10, 0,2 % de pectolyase Y23, du mannitol (0,25 M), du NaCl (0,125 M) et du MES (0,5 g/l).

Après 3 rinçages dans la même solution dépourvue d'enzymes, le pourcentage de protoplastes lysés est évalué par l'équation :

$$Z = 100 (X - Y)/X$$

X étant le nombre de protoplastes déterminé par gramme de masse de matière fraîche dans la solution de rinçage (1,2 MPa) et Y le nombre trouvé après dilution de moitié (0,6 MPa).

Les marqueurs enzymatiques étudiés (ADH, GOT, CAT, MDH, 6-PGD, PGM, IDH et ß-GLU) sont révélés par électrophorèse sur gel d'amidon suivant les techniques décrites par Cardi *et al.* [3] avec quelques modifications de détail.

Résultats et discussion

Test de germination dans le mannitol

Les résultats obtenus sur la germination (Tableau I) indiquent des différences très significatives entre les deux génotypes étudiés, Amizmiz 139 présentant un indice de tolérance à la sécheresse presque deux fois supérieur à celui de Rehamna.

Tableau I. Variation de l'indice de tolérance à la sécheresse (ITS) chez deux génotypes de maïs marocains.

Génotypes	Rehamna	Amizmiz 139
ITS	0,37	0,63*

* Différence significative à 1 %

Effet du stress hydrique sur l'élongation des tiges

L'accroissement relatif des tiges pendant la période de sécheresse (Tableau II) indique une activation de la croissance chez le génotype Rehamna. La sécheresse n'a cependant pas d'effet sur le génotype Amizmiz 139 dont les plantes stressées présentent le même accroissement que les témoins irrigués.

Après réhydratation, la croissance est stimulée pour les deux génotypes. L'accroissement relatif observé chez Amizmiz 139 est cependant deux fois supérieur à celui de Rehamna, ce qui indique une meilleure capacité d'osmorégulation et donc une plus grande tolérance à la sécheresse.

Tableau II. Effet de la sécheresse sur l'élongation de la tige de deux génotypes de maïs marocains.

Génotypes	Traitement	L_1 (mm)	L_2 (mm)	L_3 (mm)	R_1	R_2
Rehamna	Irrigué (I)	116,4	178,4	191,8	53,8	7,5
	Sec (S)	103,2	175,0	195,0	69,6	11,4
	(S/I) x 100	–	–	–	131*	155
Amizmiz 139	Irrigué (I)	152,8	240,2	255,0	57,2	6,2
	Sec (S)	156,6	251,4	312,4	60,5	24,3
	(S/I) x 100	–	–	–	103	381**

**: Différences significatives à 1 %
* : Différences significatives à 5 %
L_1 : Longueur de la tige au 27e jour (début de sécheresse)
L_2 : Longueur de la tige au 42e jour (15 jours de sécheresse)
L_3 : Longueur de la tige au 48e jour (6 jours de réhydratation)
R_1 : Croissance relative entre le 27e et le 42e jour
R_2 : Croissance relative entre le 42e et le 48e jour

$$R_1 = 100 \times (L_2 - L_1)/L_1 \qquad R_2 = 100 \times (L_3 - L_2)/L_2$$

Rétention d'eau par les feuilles excisées

Les variations des pertes d'eau foliaire en fonction du temps (Figure 1) montrent un début de courbe curviligne qui devient rectiligne 120 minutes après excision foliaire.

Les pertes d'eau, plus importantes pendant la première phase, sont dues au fonctionnement simultané des transpirations stomatique et cuticulaire, mais pendant la

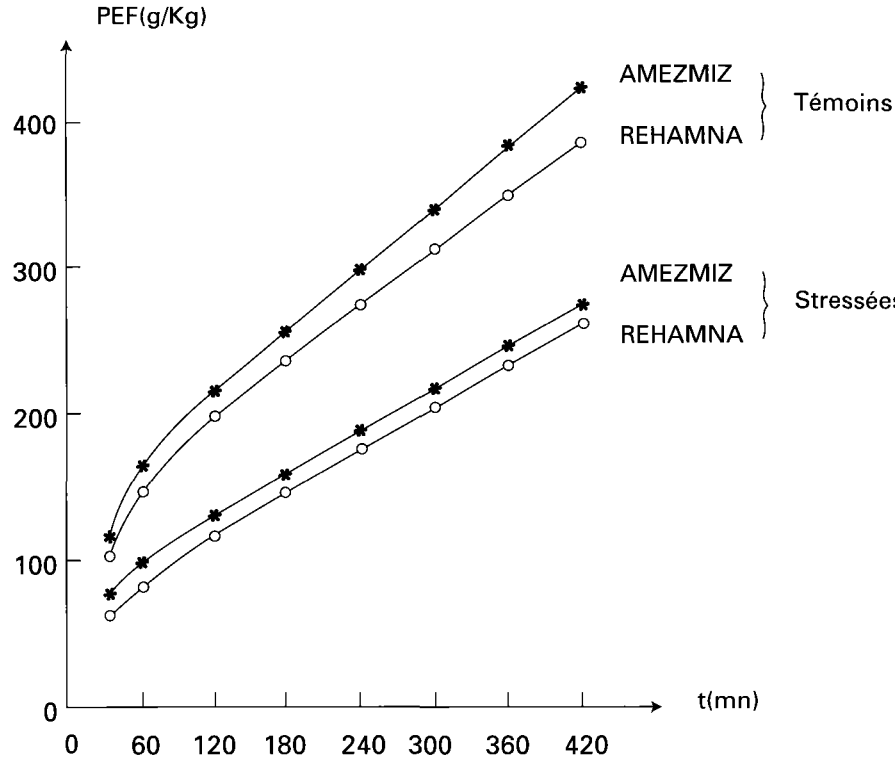


Figure 1. Variations des pertes d'eau par la troisième feuille excisée de deux génotypes de maïs marocains.

deuxième phase, seule subsiste la transpiration cuticulaire puisque les pertes d'eau varient avec une vitesse constante, ce qui indique l'absence de régulation et par conséquent la fermeture des stomates. Les pertes d'eau dépendent dans ce cas de l'épaisseur de la cuticule, dont les variations sont infimes pour les variétés d'une même espèce, et surtout du potentiel osmotique cellulaire qui représente la principale force de rétention hydrique et reflète l'importance des solutés dans les cellules, et partant, la capacité d'osmorégulation pour un génotype donné ainsi que sa tolérance à la sécheresse, qui seront déduites dans le cas présent, non pas des mesures directes des PEF, mais plutôt de leur rapport en présence et en absence du stress (S/T).

Les résultats obtenus (Tableau III) indiquent des différences très significatives entre les deux génotypes pour les trois niveaux foliaires étudiés, la variété Amizmiz 139 étant plus tolérante que la variété Rehamna.

Par ailleurs, on constate une variation des pertes d'eau en fonction de la position foliaire, qui fut signalée également chez le blé [8]. En effet, le rapport S/T est plus faible au niveau de la troisième feuille et augmente progressivement pour les deux niveaux supérieurs. Cela implique donc une concentration plus importante dans les feuilles âgées qui pourraient ainsi constituer une source de solutés pour les jeunes feuilles dans le maintien de leur turgescence par osmorégulation [16].

Durant la première phase curviligne, les variations du rapport S/T reflètent en même temps celles des transpirations stomatique et cuticulaire. Les résultats obtenus une heure après excision de la troisième feuille montrent des différences très significatives entre les deux génotypes (Tableau IV).

Le rapport S/T dans ce cas est plus grand chez Amizmiz 139, contrairement à ce qui est observé pendant la deuxième phase, et implique une perte d'eau foliaire plus importante par les plantes stressées de ce génotype.

Par ailleurs, la transpiration cuticulaire étant plus réduite chez cette variété, S/T étant plus faible par rapport à celui de Rehamna, on peut déduire dans ce cas que sa transpiration stomatique est plus importante, ce qui suppose une ouverture des ostioles et une turgescence des cellules stomatiques plus grandes et donc une augmentation plus marquée de leur potentiel osmotique.

La variété Amizmiz 139, plus tolérante à la sécheresse, serait par conséquent dotée d'un pouvoir d'osmorégulation plus important que celui de la variété Rehamna qui est plus sensible.

Des observations similaires ont été faites chez d'autres cultivars de maïs par Premachandra *et al.* [15], qui ont montré que l'ajustement osmotique chez le maïs mettait en jeu les sucres et le potassium.

Tableau III. Comparaison des pertes d'eau foliaire (PEF) chez deux génotypes de maïs marocains pendant la phase linéaire (deux heures après excision et plus).

Niveau de la feuille	Génotypes	PEF (g/Kg.h)		S/T (%)
		Témoin (T)	Stress (S)	
3	Rehamna	49,0	33,5	68,3
	Amizmiz 139	56,5	33,7	59,7*
7	Rehamna	39,0	39,7	101,9
	Amizmiz 139	46,2	42,2	91,3*
8	Rehamna	35,0	42,0	120,0
	Amizmiz 139	41,2	38,2	92,7*

* . Différences significatives à 1 %.
PEF (g/kg) = (MMFI – MMFF)/(MMFI - MMS) [18]
MMFI Masse de matière fraîche initiale
MMFF : Masse de matière fraîche finale
MMS : Masse de matière sèche

Tableau IV. Variation des pertes d'eau au niveau de la troisième feuille chez deux génotypes de maïs marocains pendant la phase curviligne (une heure aprrès excision).

Génotypes	Rehamna	Amizmiz 139
S/T (%)	60	65*

* Différence significative à 1 %
S/T représente le rapport des pertes d'eau foliaire (en g/Kg.h) en présence et en absence du stress hydrique

Étude au niveau des protoplastes

L'hypothèse retenue dans cette étude suppose l'existence d'un plus grand nombre de cellules à pression osmotique élevée chez la variété tolérante par rapport à la variété sensible. Ainsi, les protoplastes libérés initialement dans un milieu légèrement hypertonique (1,2 MPa), en passant dans un milieu hypotonique (0,6 MPa), vont absorber une quantité d'eau proportionnelle à leur pression osmotique initiale, ce qui entraînera une augmentation de leur volume et à la limite la rupture des membranes plasmiques. Par conséquent, si l'hypothèse de départ est vraie, le pourcentage de protoplastes lysés en passant du milieu hypertonique au milieu hypotonique sera plus important chez la variété tolérante que chez la variété sensible.

Les résultats obtenus sur les plantes de serre (Tableau V) indiquent un taux de lyse des protoplastes plus élevé chez Amizmiz 139 par rapport à Rehamna. Cela implique que la pression osmotique cellulaire initiale est plus importante chez la variété tolérante par rapport à la variété sensible.

Cependant, si pour les plantes de serre on observe des différences très significatives entre les deux génotypes étudiés, en revanche les essais portant sur les plantules étiolées donnent des valeurs pratiquement égales.

Le fait que ces plantules soient privées de lumière et d'éléments nutritifs réduit probablement leur capacité d'ajustement osmotique aussi bien par les sucres que par les éléments minéraux.

Tableau V. Évaluation du % de lyse des protoplastes de deux génotypes de maïs marocains lorsqu'on passe d'un milieu hypertonique (1,2 MPa) à un milieu hypotonique (0,6 MPa).

Matériel végétal	Age des plantes Niveau foliaire	Génotypes Rehamna	 Amizmiz 139
Plantules étiolées	11 jours F_1 et F_2	53 %	49 %
Plantes de serre irriguées	20 jours F_4	29 %	81 %**
	25 jours F_5	68 %	91 %**
	27 jours F_2	20 %	29 %*
	42 jours F_6	9 %	55 %**
Plantes de serre après 15 jours de sécheresse	42 jours F_6	23 %	65 %**
Moyenne des 5 valeurs obtenues sur les plantes de serre		30 %	64 %*

* : Différence significative à 5 %
**: Différence significative à 1 %

Les réserves initiales de la graine et l'apport des sels pendant les trois heures d'incubation à l'obscurité ne semblent pas suffire pour induire l'expression des différences génétiques au niveau osmotique. La photosynthèse, ou plutôt les pigments photosynthétiques, jouent probablement un rôle important dans la différenciation des génotypes par le biais de leurs synthèses glucidiques, qui contribuent à augmenter de façon plus marquée la pression osmotique chez les génotypes tolérants.

L'absence de lumière et d'éléments nutritifs semble également induire une fragilité des membranes plasmiques, ce qui pourrait expliquer l'augmentation du pourcentage de lyse des protoplastes pour les plantules étiolées du génotype Rehamna.

Par ailleurs, on constate que sous l'effet de la sécheresse il y a une augmentation des pertes en protoplastes de 14 % chez Rehamna et de 10 % chez Amizmiz 139. Cela implique un accroissement de la pression osmotique qui serait dû non pas à une déshydratation progressive, mais plutôt à l'osmorégulation.

Variabilité enzymatique

Tous les systèmes enzymatiques étudiés sont polymorphes aussi bien chez Rehamna que chez Amizmiz 139, qui présentent le même profil enzymatique dans le cas des ADH, PGD et PGM, les autres loci montrant cependant des différences d'expression alléliques caractéristiques pour chaque génotype.

La fréquence des hétérozygotes varie aussi en fonction des systèmes considérés (Tableau VI).

Tableau VI. Fréquences (en %) des hétérozygotes pour huit systèmes enzymatiques de deux génotypes de maïs marocains.

Locus	ADH	CAT	GLU	GOT	IDH	MDH	PGD	PGM
Rehamna	17	0	0	25	25	96	25	0
Amizmiz 139	25	0	50	0	0	96	50	0

Mis à part le système MDH qui montre une fréquence très élevée en hétérozygotes (96 %) pour les deux génotypes, la variété Amizmiz 139 présente souvent une fréquence de 50 % (ß-GLU et PGD) tandis que Rehamna ne dépasse pas les 25 % (GOT, IDH et PGD). Cela semble indiquer une meilleure uniformité structurale des populations de Rehamna par rapport à celles d'Amizmiz 139.

Dans le cas des ß-GLU, 50 % des individus de la variété Amizmiz 139 présentent deux bandes supplémentaires par rapport à ceux de la variété Rehamna. Chez ces individus hétérozygotes, qui présentent une interaction intralocus, quatre types d'isoenzymes sont exprimés dans le cytoplasme contrairement aux autres qui n'en montrent que deux. On pourrait donc penser que la multiplicité isoenzymatique permettrait d'augmenter le champ d'action du système enzymatique considéré et entraînerait l'hydrolyse de plusieurs types de ß-glucosides en D-glucose, ce qui aurait pour conséquence un meilleur ajustement osmotique, notamment en condition de stress hydrique.

Les catalases présentent également des différences assez nettes entre les deux génotypes. En effet, chez la variété Amizmiz 139, le locus 3 est exprimé seulement par les bandes 7 et 9, tandis que pour la variété Rehamna on trouve en plus une bande inter-

médiaire chez 40 % des individus étudiés, qui résulte probablement de l'interaction entre l'allèle nul et l'allèle 9.

Dans le cas du système GOT, les trois loci sont exprimés chez Rehamna et seul le locus GOT_2 est représenté chez Amizmiz 139.

Chez le génotype Rehamna, il semble que la voie qui aboutit à la formation de l'aspartate par transamination du glutamate soit plus activée que celle qui va dans le sens de la formation de la proline, probablement du fait de l'intervention de plus d'isoenzymes dans le transfert de l'azote aminé du glutamate sur l'oxaloacétate [10].

En revanche, chez le génotype Amizmiz 139, la formation de la proline est probablement plus favorisée, d'où une osmorégulation plus efficace et donc une meilleure tolérance au stress hydrique. Un dosage quantitatif d'enzyme et de proline est cependant nécessaire pour conforter cette hypothèse.

On observe également un polymorphisme plus important des IDH chez le génotype Rehamna et un polymorphisme plus marqué des MDH chez le génotype Amizmiz 139.

Conclusion

Le génotype Amizmiz 139 est plus tolérant à la sécheresse que le génotype Rehamna.

Les résultats obtenus dans l'étude des protoplastes sont discriminants pour ces deux génotypes et corrèlent parfaitement avec le test de germination dans le mannitol, les pertes d'eau par les feuilles excisées et la croissance en présence d'un stress hydrique. La méthode d'étude des protoplastes proposée peut donc servir d'outil efficace et utile dans le criblage pour la tolérance à la sécheresse.

Il serait cependant souhaitable d'utiliser de jeunes plantules, afin de réduire le temps et les efforts que demanderait l'entretien d'une culture de plantes plus âgées, à condition de vérifier que la présence de lumière et d'éléments nutritifs permet le maintien des différences observées chez les plantes adultes.

Au niveau moléculaire, les huit enzymes étudiées présentent des profils caractéristiques pour chaque génotype. L'importance du polymorphisme enzymatique observé permet de bien apprécier l'uniformité structurale des populations étudiées. Des corrélations avec la tolérance à la sécheresse semblent très probables par le biais du fonctionnement physiologique de la plante. Ces corrélations demandent cependant à être confortées par des dosages quantitatifs d'enzymes et d'acides aminés libres, ainsi que par des programmes de croisement intra-spécifique jusqu'à la génération F2.

Références

1. Ashraf CM, Abu-Shakra S (1978). Wheat seed germination under low temperature and moisture stress. *Agron J* 70 : 135-139.
2. Bayles BB, Taylor JW, Bartel AT (1937). Rate of water loss in wheat varieties and resistance to artificial drought. *J Am Soc Agron* 29 : 40-52.
3. Cardy BJ, Stuber CW, Goodman MM (1980). Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize. Institute of Statistics Mimeo Series N° 1317 Revised. North Carolina State University, Raleigh, NC, 31 p.
4. Clarke JM (1987). Use of physiological and morphological traits in breeding programmes to improve drought resistance of cereals. In : *Drought tolerance in winter cereals.*

Srivastava JP, Porceddu E, Acevedo E, Varma S, eds. Proceedings of an international workshop 1985, Italy. J Wiley et Sons Ltd : 171-189.

5. Clarke JM, Mc Caig TN (1982). Evaluation of techniques for screening for drought resistance in wheat. *Crop Sci* 22 : 503-506.
6. Clarke JM, Mc Caig TN (1982). Excised-leaf water retention capability as an indicator of drought resistance of *Triticum* genotypes. *Can J Plant Sci* 62 : 571-578.
7. Clarke JM, Townley-Smith TF (1986). Heritability and relationship to yield of excised-leaf water retention in durum wheat. *Crop Sci* 26 : 289-292.
8. Dedio W (1975). Water relations in wheat leaves as screening tests for drought resistance. *Can J Plant Sci* 55 : 369-378.
9. Frearson EM, Power JB, Cocking EC (1973). The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev Biol* 33 : 130-137.
10. Givan CV (1980). Aminotransferases in higher plants. In : Stumpf PK, Conn EE, eds. *The biochemistry of plants*. Vol. V. Academic Press, New York : 329-358.
11. Jaradat A, Duwayri M (1981). Effect of different moisture deficits on durum wheat seed germination and seedling growth. *Cereal Res Comm* 11 : 179-186.
12. Maguire JD (1962). Speed of germination. Aid in selection and evaluation for seedling emergence vigour. *Crop Sci* 2 : 176-177.
13. Mc Caig TN (1986). A microcomputer-controlled leaf-weighing system. *Agron J* 78 : 551-557.
14. Mc Caig TN, Romagosa I (1989). Measurement and use of excised-leaf water status in wheat. *Crop Sci* 29 : 1140-1145.
15. Premachandra GS, Saneoka H, Kanaya M, Ogata S (1989). Responses of relative growth rate, water relations and solute accumulation to increasing water deficits in maize. *J Plant Physiol* 135 : 257-260.
16. Sharp RE, Osonubi O, Wood WA, Davies WJ (1979). A simple instrument for measuring leaf extension in grasses and its application in the study of the effects of water stress on maize and *Sorghum*. *Ann Bot* 44 : 35-45.
17. Williams TV, Snel RS, Ellis JF (1967). Methods of measuring drought tolerance in corn. *Crop Sci* 7 : 179-182.
18. Winter SR, Musick JT, Porter KB (1988). Evaluation of screening techniques for breeding drought-resistant winter wheat. *Crop Sci* 28 : 512-516.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 433-434.

44

Utilisation des marqueurs RFLP pour l'évaluation des niveaux d'hétérozygotie chez *Medicago sativa*

C. SCOTTI, F. PUPILLI, S. BUSINELLI,
F. DAMIANI, S. ARCIONI, P. ROTILI

ISCF, Lodi, Italie.
IMGPF (CNR). Perugia, Italie.

L'objectif du programme de recherche sur luzerne *(Medicago sativa),* espèce autotétraploïde, mis en route chez l'ISCF de Lodi est d'arriver à savoir s'il est possible d'utiliser les marqueurs RFLP pour estimer l'hétérozygotie des plantes. Le but final des différentes méthodes d'amélioration génétique est de cumuler la vigueur liée à l'état hétérozygote avec celle liée à la qualité des gènes et linkats. Une phase d'autofécondation, en réduisant l'hétérozygotie, augmente l'efficacité de la sélection des gènes et linkats favorables à la vigueur (production de phytomasse). Les RFLP pourraient améliorer le rendement du procédé de création variétale en accélérant le choix des individus pendant la phase d'autofécondation, et en maximisant la diversité génétique des plantes constituant le nouveau cultivar.

Le programme général de recherche prévoit l'analyse de 9 plantes SO et des familles S1 correspondantes (15 individus/famille). L'ADN total est hydrolysé par 4 enzymes de restriction et hybridé avec 45 (SO) et 19 (S1) sondes issues d'une librairie génomique de *M. sativa*. Les niveaux d'hétérozygotie sont estimés par le nombre moyen de bandes dans les loci RFLP (combinaisons sonde-enzyme) considérés (60-90 en SO ; 19-25 en S1).

L'effet de l'autofécondation est estimé par la diminution du nombre de bandes par rapport à la plante mère et par la réduction de la vigueur par rapport aux familles polycross.

Au niveau SO, les 9 individus présentent un nombre moyen de bandes compris entre 4,8-3,67 ; cet écart des valeurs extrêmes est significativement différent. On retrouve fréquemment des valeurs supérieures à 4, maximum d'hétérozygotie/locus, ce qui indique soit la présence de loci dupliqués, soit la subdivision d'un même locus RFLP. La diminution du niveau d'hétérozygotie en S1 détectée par les marqueurs RFLP varie entre – 1,7 et – 9,56 dans les différentes familles (valeur attendue sous l'hypothèse d'une fréquence égale des 5 structures génotypiques possibles en SO = – 11.5). La plus faible diminution est donnée par la plante mère dont le niveau d'hétérozygotie est le plus bas. La réduction du nombre de bandes n'est pas homogène dans les différents loci RFLP. On n'a pas trouvé de corrélations significatives entre niveaux d'hétérozygotie et vigueur dans les générations SO et S1.

PARTIE VI

Approche moléculaire et amélioration des plantes

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 437-438.

45

L'application du génie génétique en Bulgarie

ATANAS I. ATANASSOV

Institute of Genetic Engineering, 2232 Kostinbrod-2, Bulgarie.

L'agriculture est, parmi les industries bulgares, la plus ancienne et la plus efficace.

Afin de maintenir la qualité des cultures agricoles prioritaires, un système national pour le génie génétique a été créé en 1985. L'Institut de génie génétique a également été établi en 1985, il fonctionne comme un centre méthodologique et scientifique, et coordonne les activités de 27 laboratoires de culture de tissus végétaux dans le pays.

La Bulgarie étant un pays plutôt petit a développé ses biotechnologies végétales en suivant strictement les programmes de sélection classique. L'approbation des projets scientifiques se fait fondamentalement à partir des problèmes rencontrés par les sélectionneurs, et à la demande de l'économie nationale. Généralement, ces objectifs ne peuvent pas être obtenus par les méthodes classiques de sélection et sont des problèmes locaux (résistance à la sécheresse, maladies spécifiques, résistance aux herbicides, etc..).

Les méthodes développées avec le plus de succès sont :

– la micropropagation clonale et l'élimination des virus chez nombre de cultures ornementales, forestières, fruitières et autres genres comme la pomme de terre, la betterave à sucre, les fraises, etc. ;

– la production d'haploïdes et de dihaploïdes chez le blé, le tabac, le triticale, le riz, le maïs, les piments, les tomates, les petits pois, les choux, les cornichons, le tournesol ;

– la sélection cellulaire chez l'orge, le tournesol, la luzerne, le riz et le blé ;

– le clonage de gènes a aussi obtenu ses premiers succès avec le virus TSWV et PPV dont les génomes ont été entièrement séquencés ; les gènes clonés ont été exprimés dans le tabac ;

– les méthodes de transfert de gènes ont été développées avec succès chez le tabac et la luzerne ; les descendances des plantes transgéniques sont à l'étude.

Aujourd'hui, la biotechnologie bulgare souffre des tendances négatives de la période de transition vers l'économie de marché ; parmi celles-ci, les plus sévères sont la désintégration des centres de recherche et les problèmes financiers drastiques. Par ailleurs, les règlements juridiques comme la loi sur la propriété intellectuelle et la législation sur les organismes ingéniérés ne sont pas encore en place. Tout cela limite le développement des recherches malgré les nouveaux enjeux de collaboration qui s'ouvrent pour les chercheurs et les industriels.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 439-446.

46

Physiologie de la tubérisation chez la pomme de terre cultivée (*Solanum tuberosum* L.) : quelques conclusions de données moléculaires

PATRICK du JARDIN

Unité de Biologie végétale, Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, avenue du Maréchal-Juin, Bât. 48, B-5030 Gembloux, Belgique.

La tubérisation de la pomme de terre désigne la formation d'un organe de réserve et de propagation par expansion radiale de l'extrémité d'un stolon, tige souterraine à croissance plagiotrope. Cet événement anatomique dépend de l'interaction entre des facteurs génotypiques et environnementaux. A l'intérieur du genre *Solanum*, certains génotypes, comme *S. brevidens*, ne forment jamais de tubercules, d'autres, comme *S. demissum*, tubérisent en jour court uniquement ; enfin *S. tuberosum* tubérise dans de larges gammes de traitement photopériodique. Parmi les facteurs environnementaux, la photopériode, la qualité de la lumière, la température et la nutrition minérale (azotée en particulier) sont reconnues comme généralement déterminantes. Les hormones jouent un rôle complexe dans ce processus, assurant probablement à la fois la transmission des stimuli environnementaux aux différents niveaux de l'organisation de la plante et conditionnant la réceptivité des tissus et cellules à ces stimuli. L'existence d'une hormone « tubérigène » a été postulée sur base d'expériences de greffe indiquant qu'une feuille préalablement exposée à des jours courts et greffée sur une plante traitée en jours longs est capable d'induire la tubérisation de cette dernière. La nature du facteur transloqué a été activement recherchée. Aucune des phytohormones « classiques » ne

semble jouer ce rôle : cytokinines, auxines, éthylène, acides gibbérellique et abscissique ont des effets divers sur la formation du tubercule mais aucune de ces molécules ne fonctionne comme inducteur direct. Leur rôle peut dès lors être limité au conditionnement des organes à émettre, à transmettre et à interpréter les signaux primaires de tubérisation. Par ailleurs, l'acide jasmonique et certains dérivés comme le méthyl-jasmonate ont été récemment identifiés comme inducteurs de tubérisation lorsqu'ils sont appliqués à des segments nodaux de tige de pomme de terre. Cette famille moléculaire s'avère intervenir dans d'autres processus physiologiques comme le contrôle de la sénescence et les réponses systémiques à des agressions entomologiques, mais leurs modes d'action et de synthèse restent largement à étudier.

Afin de mieux comprendre le contrôle de la tubérisation, on peut espérer un bénéfice substantiel d'une meilleure définition de la diversité des événements cellulaires et moléculaires sous-jacente à la formation du tubercule. Leur régulation peut être étudiée indépendamment, conduisant à l'identification de facteurs de contrôle généraux ou spécifiques. D'autre part, d'éventuelles relations d'interdépendance dans l'expression des diverses composantes de la tubérisation peuvent être précisées. Les observations présentées ci-après explicitent ce point de vue.

Tubérisation anatomique et tubérisation biochimique

La formation d'un tubercule n'est pas limitée à la région subapicale d'un stolon. Lorsqu'une plante de pomme de terre est cultivée en jours courts et qu'un segment de tige portant une feuille bien développée est prélevé et maintenu en survie dans une atmosphère humide, le bourgeon axillaire forme un tubercule sessile (Figure 1). Si le bourgeon est excisé avant le prélèvement de l'explant, aucune différenciation morphologique n'est observée, mais une coupe histologique transversale dans le pétiole révèle après coloration à l'iode que les parenchymes accumulent de grandes quantités d'amidon (Figure 2). De plus, l'analyse électrophorétique des protéines solubles de tels pétioles à différents moments après le prélèvement de l'explant indique que des protéines caractéristiques du tubercule en développement s'accumulent parallèlement à l'amidon (Figure 2). Ces observations indiquent que les composantes biochimiques de la tubérisation (l'accumulation d'amidon et de protéines de réserve) peuvent s'exprimer indépendamment de la croissance d'un organe de réserve. Inversement, peut-il y avoir différenciation anatomique en l'absence de la synthèse des macromolécules caractéristiques du tubercule, amidon et protéines de réserve ? La technologie des ARN antisens a permis de répondre à cette question par le blocage indépendant de l'expression des gènes de patatines [2] et de celle du gène codant pour une des deux sous-unités de l'ADPglucose pyrophosphorylase [3]. Si le premier travail indique que l'absence des protéines de réserve du groupe des patatines n'affecte pas le développement morphologique du tubercule, le blocage de la synthèse d'amidon conduit, lui, à la production de tubercules plus nombreux et plus petits, certains ayant un phénotype ridé (*shrunken*), comme les pois de Mendel, eux aussi déficients en amidon. Ces altérations sont probablement liées à l'accumulation de saccharose observée et à la perturbation du statut osmotique de l'organe.

En conclusion, la tubérisation dans son acception générale consiste en la juxtaposition d'une différenciation anatomique et d'une différenciation biochimique. Les événements biochimiques peuvent être observés indépendamment de la production d'un

organe de réserve. En revanche, la croissance normale d'un tubercule est tributaire de l'accumulation d'amidon, probablement parce que ce polymère permet le stockage des sucres importés sous une forme osmotiquement neutre. Le schéma de régulation présenté à la Figure 3 peut dès lors être proposé.

Accumulation de l'amidon et des protéines de réserve patatine

La différenciation biochimique peut être décomposée en deux événements principaux : l'accumulation d'amidon et celle des protéines de réserve, dont les patatines. Dans quelle mesure ces deux composantes sont-elles connectées, voire hiérarchisées sur le plan de leur régulation ? Par exemple, un précurseur de l'amidon fonctionne-t-il comme régulateur de l'expression des gènes de patatine ? Auquel cas il ne pourrait y avoir synthèse des patatines sans un parcours au moins partiel de la voie amylosynthétique.

Plusieurs éléments de réponse peuvent être apportés. Les travaux déjà cités [2, 3] indiquent en effet que la répression des gènes de patatine dans le tubercule n'affecte pas significativement la synthèse de l'amidon, mais que le blocage de la synthèse de ce polysaccharide réduit spectaculairement l'expression des patatines, et cela alors que la méthode mise en œuvre (utilisant des ARN antisens) est très ciblée sur l'inhibition d'une enzyme spécifique de l'amylosynthèse. Par ailleurs, notre groupe a démontré que les régions promotrices des gènes de patatine (des classes I et II) présentent de courtes régions nucléotidiques conservées avec des domaines répétés dans le promoteur du gène de la petite sous-unité de l'ADPglucose pyrophosphorylase. Puisque les ARNm correspondants sont coexprimés dans plusieurs contextes de développement, notamment lors de l'induction de la tubérisation biochimique dans des pétioles (Figure 4), il est probable que des facteurs protéiques nucléaires communs régulent les deux types de promoteurs par liaison aux motifs conservés. Cette hypothèse demande à être vérifiée.

A ce stade, la relation entre l'accumulation d'amidon et celle des patatines peut donc être résumée par la Figure 5, proposant d'une part l'existence de facteurs régulateurs communs et d'autre part celle d'un contrôle de l'expression des patatines par l'amylosynthèse.

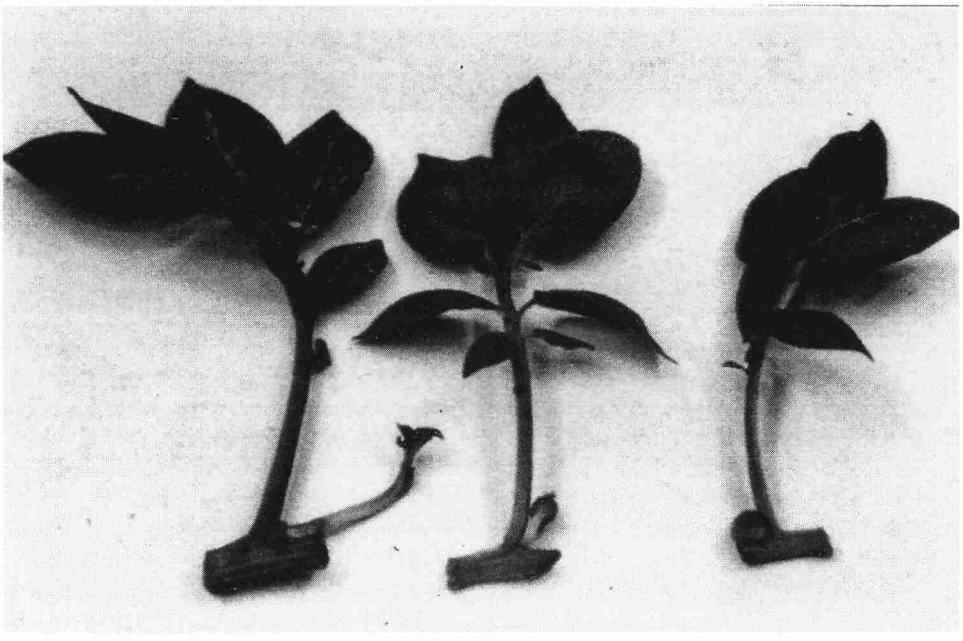


Figure 1. Formation d'un tubercule axillaire chez un explant folié de pomme de terre (cv. Désirée). L'explant de droite provient d'une plante traitée en jours courts (8 h de lumière par 24 h) et développe un tubercule sessile au départ du bourgeon axillaire lorsque, après le conditionnement photopériodique, l'explant est prélevé et maintenu en survie dans une enceinte saturée en eau. Lorsque les plantes donneuses sont cultivées sous des jours plus longs, les explants développent des tubercules à l'extrémité de courts stolons (explant du milieu) ou des pousses feuillées (explant de gauche). Cette expérience indique que la tubérisation anatomique n'est pas limitée aux stolons souterrains.

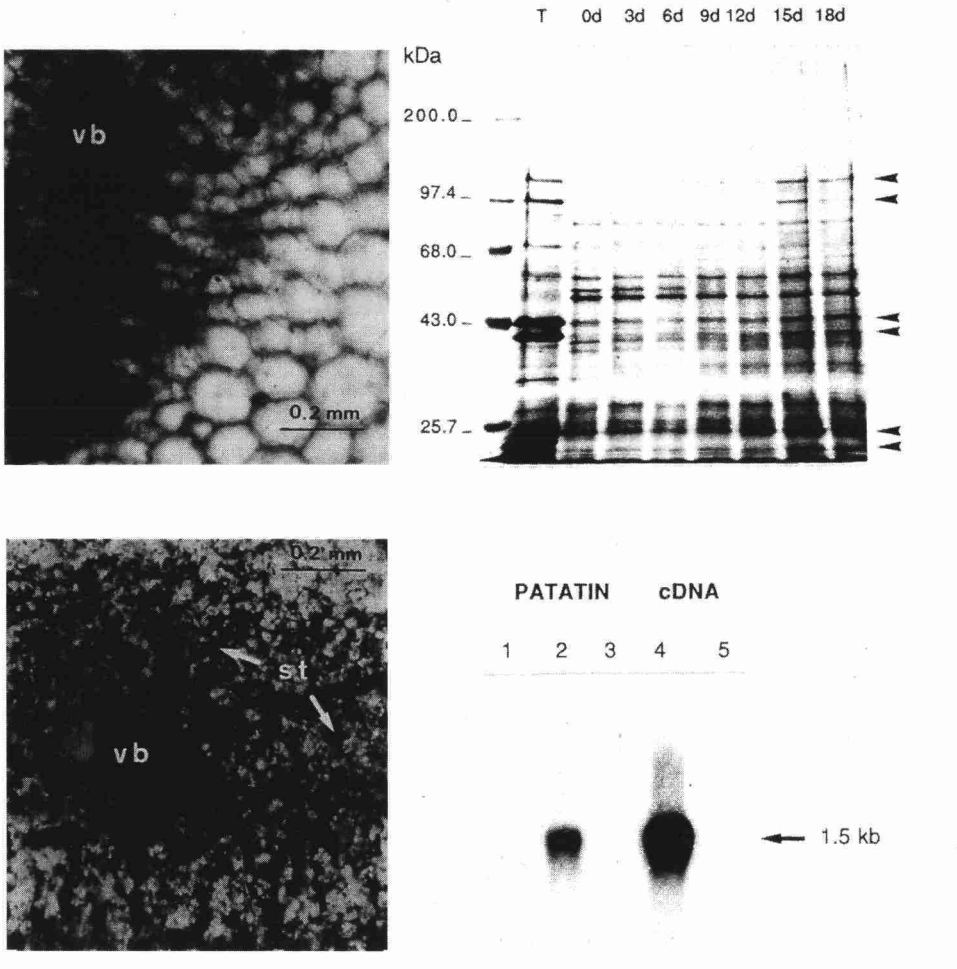


Figure 2. Tubérisation biochimique au niveau de pétioles d'explants foliés de pomme de terre dont les bourgeons axillaires ont été excisés ; les explants ont été prélevés sur des plantes cultivées en jours courts. *Au-dessus à gauche*, coupe transversale dans un pétiole témoin provenant d'une plante cultivée en serre. *En bas à gauche*, coupe transversale dans un pétiole accumulant de l'amidon suite au conditionnement photopériodique de l'explant et à l'excision du bourgeon axillaire (vb : tissus vasculaires ; st : amidon). *Au-dessus à droite*, évolution du profil des protéines totales des pétioles au cours de l'accumulation d'amidon ; des protéines spécifiques du profil tubercule (« T ») s'accumulent dans les pétioles après 3, 6, 9, etc. jours (« 3d, 6d, 9d, etc. » ; le jour 0 est celui du prélèvement de l'explant) et sont indiquées par des têtes de flèches. *En bas à droite*, l'expression des gènes de patatine est induite dans les pétioles accumulant de l'amidon (expérience de *Northern blot*, canal 2) comparativement aux pétioles témoins (canal 1) ; les canaux 3, 4 et 5 contiennent respectivement des ARN extraits de feuilles, de tubercules en développement au champ et de tubercules stockés au froid.

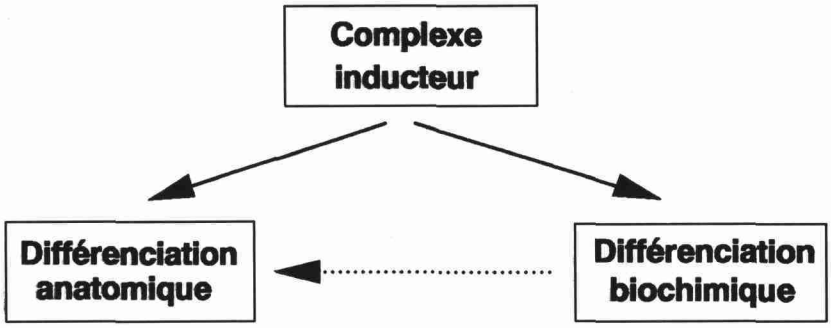


Figure 3. Modèle de régulation opérant au cours de la tubérisation de la pomme de terre. La tubérisation anatomique et la tubérisation biochimique peuvent avoir lieu indépendamment l'une de l'autre, mais une composante au moins de la tubérisation biochimique (l'accumulation d'amidon) influence le cours de la tubérisation anatomique. Le complexe inducteur est peu défini et peut comprendre des facteurs communs et spécifiques aux deux types de tubérisation.

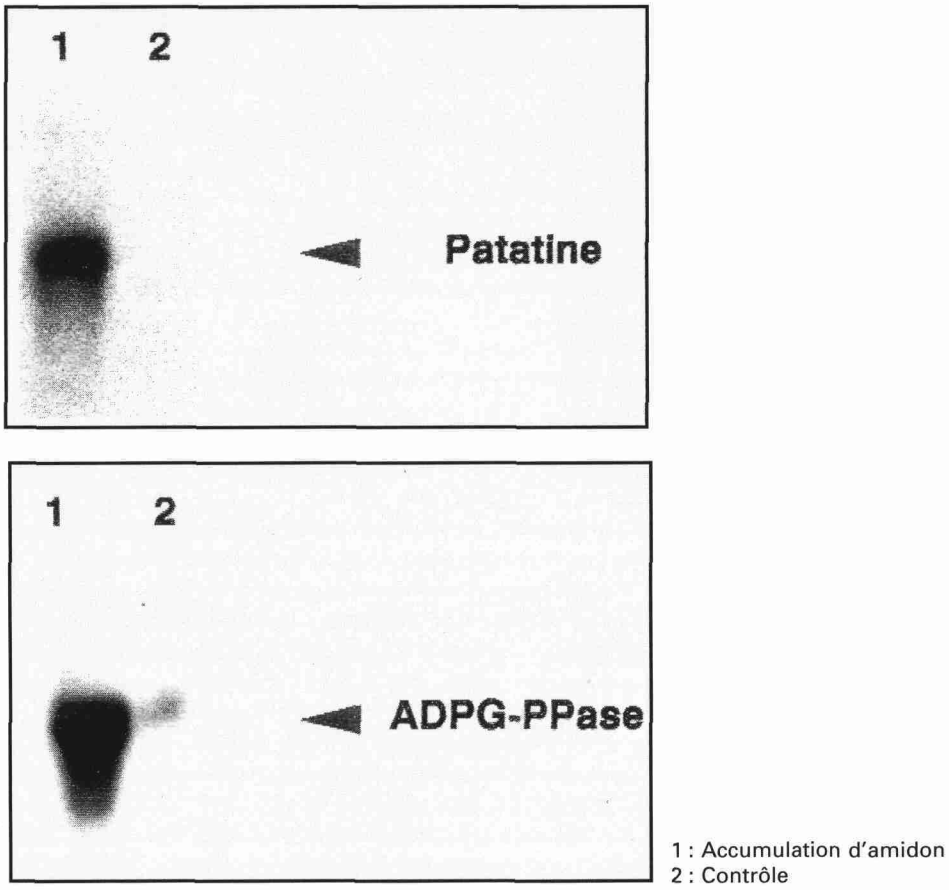


Figure 4. Accumulation coordonnée des ARNm codant pour les patatines et pour la petite sous-unité de l'ADPglucose pyrophosphorylase lors de l'induction de la tubérisation biochimique dans des pétioles d'explants foliés (se référer à la Figure 2 pour les détails du système expérimental). 10 µg d'ARN total ont été chargés par canal et transférés sur membrane de nylon, après dénaturation au glyoxal/diméthylsulfoxyde et fractionnement en gel d'agarose. L'hybridation des *Northern blots* a été réalisée au moyen de sondes d'ADNc spécifiques des patatines [4] et de la petite sous-unité de l'ADPglucose pyrophosphorylase (« ADPG-PPase » [1]).

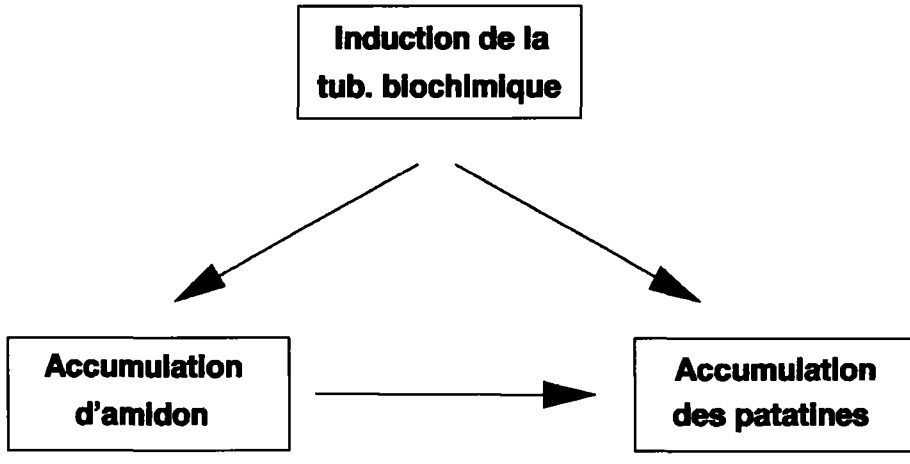


Figure 5. Modèle de régulation opérant lors de la synthèse des protéines de réserve patatine et de l'amylosynthèse dans le tubercule de pomme de terre. L'existence de facteurs communs de régulation est proposée, ainsi que celle d'un contrôle de la synthèse des protéines de réserve par l'amylosynthèse.

Conclusion

Chez le tubercule de pomme de terre en formation, différenciation anatomique et différenciation biochimique représentent deux groupes d'événements partiellement interdépendants. En effet, l'accumulation de macromolécules caractéristiques du tubercule peut être induite dans un contexte n'impliquant aucune production d'organe de réserve spécialisé, mais la formation d'un tubercule phénotypiquement normal est tributaire d'une synthèse active d'amidon. Par ailleurs, un jeu complexe – et largement ignoré dans sa nature – d'interrelations entre l'accumulation des protéines et celle de l'amidon opère dans le contexte de la tubérisation. Il ressort de ces observations que toute modulation du métabolisme de l'organe, même ciblée telle que le visent les approches de transgénèse, requiert une évaluation soigneuse de ces effets pléïotropiques. L'étude de tels effets conduira à mettre à jour des aspects essentiels de l'intégration des multiples composantes d'un processus développemental complexe comme la formation d'un organe de réserve et de propagation.

Remerciements : Les recherches originales de notre laboratoire sont financées au niveau belge par le Fonds de la Recherche Fondamentale Collective (Convention n° 2.4535.91).

Références

1. du Jardin P, Berhin A (1991). Isolation and sequence analysis of a potato cDNA clone encoding a subunit of the ADPglucose pyrophosphorylase of potato tuber amyloplasts. *Plant Mol Biol* 16 : 349-351.
2. Höfgen R, Willmitzer L (1992). Transgenic potato plants depleted for the major tuber protein patatin via expression of antisense RNA. *Plant Sci* 87 : 45-54.
3. Müller-Röber B, Sonnewald U, Willmitzer L (1992). Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J* 11 : 1229-1238.
4. Rosahl S, Eckes P, Schell J, Willmitzer L (1986). Organ-specific gene expression in potato : isolation and characterization of tuber-specific cDNA sequences. *Mol Gen Genet* 202 : 368-373.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 447-457.

47

Recherche de l'origine d'un cytoplasme CMS de *Nicotiana*, attribué à *N. glutinosa*

H. ROUSSEL, O. CHATAGNIER, H. DULIEU

Université de Bourgogne et INRA, Dijon, France.

Chez le tabac, il existe plusieurs sources de stérilité mâle (CMS) obtenues après des expériences de croisements interspécifiques avec des espèces de *Nicotiana* sauvages. Les sources les plus connues sont issues de croisements avec *N. bigelovii, N. debneyi, N. suaveolens* d'une part, et *N. glutinosa et N. plumbaginifolia*, d'autre part. Dans la première série, l'espèce sauvage est donneuse du cytoplasme, car elle fut le partenaire maternel dans le premier croisement et l'espèce cultivée fut utilisée comme parent paternel au cours de tous les croisements récurrents d'introduction du génome nucléaire *tabacum* dans la forme mâle-stérile. Dans les deux autres cas, le parent maternel fut l'espèce *N. tabacum* lors du premier croisement interspécifique et *N. tabacum* fut aussi le parent paternel au cours des croisements d'introgression [2].

Les études moléculaires sur l'ADN chloroplastique de ces différentes sources furent réalisées avec les enzymes de restriction par Frankel [7], Kung [9], en supposant que le partenaire maternel était toujours l'espèce sauvage ; cela résulte d'une mauvaise lecture de la publication de Burk [2]. Il n'est pas étonnant alors que Frankel [7] fût amené à classer les six sources analysées en deux groupes, selon qu'elles montraient le même profil électrophorétique après hydrolyse spécifique que celui de l'espèce sauvage, ou que le profil était différent de celui des deux espèces parentales, les différences portant sur deux ou trois fragments.

Ainsi, les ADNcp *debneyi, suaveolens et megalosiphon* furent groupés comme étant identiques à celui de l'espèce sauvage dont ils portent le nom, alors que les ADNcp

glutinosa, bigelovii, analysés par Frankel [7], et *plumbaginifolia*, analysé par Kung *et al.* [9], possédaient des fragments différents de ceux de chaque parent présumé.

Les interprétations données par Frankel *et al.* [7] étaient qu'il y avait eu correction de certaines séquences du génome chloroplastique sous l'influence du génome de l'espèce cultivée. Kung *et al.* [9], en revanche, firent l'hypothèse que l'ADNcp de la source *plumbaginifolia* se présentait comme une molécule recombinée à la suite d'une transmission biparentale de plastes, même si celle-ci avait eu lieu sous forme de traces.

Nous avons été intrigués par le fait que le cytoplasme de *glutinosa*, effectivement présent dans la souche *N. tabacum* var Samsun NN [3], n'entraîne aucune stérilité pollinique ; cela nous a conduits à étudier le prétendu cytoplasme *glutinosa*. Cette source fut obtenue par Burk en 1960, sous la forme d'un seul individu F1 d'une population hybride entre *N. tabacum* maternel × *N. glutinosa* paternel. Les nombreux rétro-croisements avec *N. tabacum* comme parent mâle n'ont pas fait disparaître la stérilité, liée à une morphologie florale typique : la corolle est plus courte que le style et l'androcée est totalement pétaloïde.

Les autres sources de stérilité ont aussi des morphologies florales typiques : corolle normale mais androcée pétaloïde pour *suaveolens ;* corolle très fortement laciniée et androcée stigmatoïde pour *bigelovii* ; corolle laciniée et androcée pétaloïde pour *debneyi.*

La question est donc de savoir si les différences entre l'ADNcp de *glu*CMS et ses parents putatifs sont le résultat d'un ou plusieurs remaniements à partir des molécules parentales, présentes au moins dans une cellule zygote de la population hybride F1 ou bien si l'origine ne peut être que fortuite à partir d'une graine extérieure contaminante. Il s'agit donc de pouvoir choisir entre une variation par recombinaison et une variation par divergence évolutive antérieure à l'apparition de la source *glu*CMS. La confrontation de données RFLP obtenues sur le génome entier du plaste à celles obtenues à l'échelle d'un gène, *rbcL,* gène codant la grande sous-unité de la Ribulose biphosphate carboxylase oxygénase (RUBISCO) devrait permettre d'orienter ce choix.

Grâce à la connaissance de la séquence complète de l'ADNcp de tabac [14], il est possible d'interroger n'importe quelle région du plastome des espèces voisines du tabac en l'amplifiant *in vitro*, par la réaction en chaîne par une polymérase(PCR).

Matériel et méthodes

Les sources CMS *glutinosa*, *debneyi*, *suaveolens* et *bigelovii*, appelées *glu*CMS, *deb*CMS, *suav*CMS et *big*CMS, nous ont été confiées par le Dr Frankel (Volcani Center, Israël). Elles ont été hybridées avec la variété N. *tabacum* Xanthi NC pour éviter les infections avec le virus de la Mosaïque. Les espèces sauvages N. *debneyi* et *glutinosa* proviennent des collections de l'Institut expérimental du Tabac à Bergerac (France).

L'isolement des chloroplastes pour l'amplification génique est réalisé par broyage de 5 g de feuilles ayant achevé leur croissance dans 20 ml d'un tampon à force ionique élevée, selon Bookjans *et al.* [1] : 50mM MES NaOH (pH 6,1), 25mM EDTA, 1,25M NaCl, 0,1 % albumine de bœuf, 10mM βmercaptoéthanol. Les filtrats de broyage sont centrifugés pendant 5 mn à 1 500 g ; le culot obtenu est remis en suspension dans le même tampon et centrifugé à vitesse un peu plus élevée, correspondant à 3 000 g. Le dernier culot est considéré comme une fraction chloroplastique purifiée.

L'isolement des chloroplastes pour l'analyse de restriction est réalisée de la même manière que pour l'amplification, sur une quantité de 10 à 20 g par échantillon.

L'isolement de la fraction mitochondriale se fait à partir du premier surnageant obtenu à 1 500 g. Ce surnageant est centrifugé à 3 000 g pour éliminer le contaminant chloroplastique et ensuite à 10 000 g pour sédimenter la fraction mitochondriale.

L'extraction de l'ADN chloroplastique se fait à partir du culot décollé à l'eau et dilué dans 2ml d'un milieu lytique contenant Tris 0,2 M, EDTA 0,1 M, SDS 2 %, βmercaptoéthanol 0,2 %, pH 8. Il est incubé pendant 10 mn à 60 °C et placé à 0 °C pendant quelques minutes. On ajoute alors 0,4 volume d'acétate de potassium 5 M, soit 0,8 ml, et on laisse précipiter au froid. Une centrifugation à 8 000 g pendant 15 mn permet de récupérer un surnageant clair dans un nouveau tube. Cette solution est déprotéinisée par un mélange chloroforme-phénol. On ajoute 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M à la phase aqueuse. L'ADN est alors précipité par 2,5 volumes d'éthanol froid. L'ADN séché est remis en solution à partir du précipité centrifugé à 8 000 g pendant 30 mn, dans un volume de 100 µl de tampon Tris-HCl 10 mM/EDTA 1 mM. Il peut être traité par la RNase, déprotéinisé et à nouveau précipité.

L'ADN mitochondrial est préparé selon un protocole voisin de celui proposé par Perez *et al.* [10], en mettant le culot obtenu à 10 000 g en suspension avec un tampon contenant 1,25 M NaCl, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 10 mM KH2PO4, à pH 7,2, avec 0,1 % de caséine. On ajoute MgCl2 à 10 mM. La DNase I est ajoutée à 50 µg/ml. Une incubation à froid a lieu pendant 30 mn. La réaction est arrêtée par l'ajout de trois volumes du même tampon pour un, contenant 50 mM d'EDTA. La sédimentation de la fraction mitochondriale débarrassée de l'ADN nucléaire est à nouveau réalisée à 10 000 g. Une deuxième dispersion de ce culot suivie de sédimentation est réalisée. L'ADN est alors extrait comme dans le cas des chloroplastes.

L'analyse des ADN par les enzymes de restriction est réalisée en hydrolysant 1µg d'ADN avec les endonucléases EcoRI, BamHI, PstI, XhoI et SmaI, dans les conditions conseillées par les fabricants (Boehringer M. Fr.). Les fragments sont séparés par électrophorèse en gels horizontaux à 1 % d'agarose. Les masses moléculaires apparentes sont évaluées par la comigration avec une échelle standard (BRL, 1kbp).

Les amorces utilisées pour l'amplification sont préparées à partir de la séquence complète de l'ADNcp de *Nicotiana tabacum* et correspondent aux nucléotides 57 587 à 57 607 pour le côté 5'-3' et 59 000 à 59 020 complémentaires pour le côté 3'-5'. La longueur attendue de l'amplifiat est donc de 1433 pb, soit la longueur du gène *rbcL*.

Soient 5'-AAA-GTT-TGC-TTA-ACT-CTT-T-(G)-3'
5'-AAA-GAC-TTT-CTC-AAG-ATT-C-(T)-3'

La réaction de polymérisation est préparée avec le tampon de la polymérase Taq fourni par Appligène ; 2,5 mM des dNTP, 6 pM de chaque amorce, et 1 unité de polymérase Taq (Appligène). L'ADN modèle est celui des extraits de chloroplastes, 1 à 2 ng à la concentration de 1 à 2 ng/µl. Une première dénaturation a lieu pendant 3 mn à 95 °C. Les cinq premiers cycles de polymérisation comportent un palier à 93 °C pendant 1 mn, à 51 °C pendant 1 mn et, avec une pente de 1 °C par 2 s, 72 °C pendant 1 mn 30 s. Vingt cycles semblables sans pente programmée terminent l'incubation.

Le produit obtenu est hydrolysé séparément avec des endonucléases de restriction dont le site spécifique porte sur 4 bases de façon à augmenter la probabilité de coupure : AvaI, Sau3A, HaeIII, HinfI ; à 6 bases : BamHI et SmaI. Les produits d'hydrolyse sont séparés par électrophorèse dans de l'agarose à 2,2 % à côté d'un standard de poids moléculaire (« Ladder » 1 kbp de BRL).

L'observation de plusieurs différences entre l'ADNcp du *glu*CMS et les parents putatifs a conduit à estimer la proportion p_0 de nucléotides substitués entre chaque

paire de génotypes, permettant d'évaluer le degré de divergence [8]. On a aussi utilisé la méthode d'estimation de la distance d de Nei avec l'équation proposée par Li et Nei (1979) pour les nombres de fragments de restriction, notamment pour l'ADN mitochondrial, qui constitue une molécule nettement plus grande que l'ADN chloroplastique et dont les sites de restriction ne sont pas cartographiés.

Les groupements sont ensuite faits par la méthode UPGMA *(unweighted pair group method using arithmetic averages)* (cf Swofford and Olsen, chapter 11, *Phylogeny Reconstruction* dans *Molecular systematics*, ed. Hillis et Moritz, 1990, Sinauer Ass., Inc., Sunderland, Mass., USA).

Résultats

Une première série d'analyses réalisées sur l'ADNcp total avec des enzymes de restriction reconnaissant 6 bases a préalablement montré que *glu*CMS différait de *tabacum* et de *glutinosa* par plusieurs fragments EcoRI [7].

Nous avons étendu cette analyse à d'autres enzymes.

Ainsi, BglI produit deux fragments, de 11,5 kbp et de 3,8 kbp, chez *tabacum* et chez *glutinosa* (Figure 1, puits 9, 10 et 12) ; ce fragment étant absent chez *glu*CMS (*id.* puits 11), qui possède un fragment exclusif de l'ordre de 20 kbp. Deux fragments, respectivement de 25 kbp et de 8 kbp, présents chez *glutinosa* et *glu*CMS (Figure 1, puits 10, 11 et 12) sont absents chez *tabacum* (puits 9). Un fragment de 39 kbp, présent chez *tabacum*, est absent chez les deux autres génotypes.

PstI produit un fragment de 25 kbp chez *tabacum* et *glutinosa* (Figure 1, puits 5, 6 et 8), absent chez *glu*CMS (Figure 1, puits 7).

XhoI produit un fragment de 14 kbp, chez *glutinosa* (Figure 1, puits 15 et 17), absent chez *tabacum* et chez *glu*CMS (Figure 1, puits 14 et 16). De plus, un fragment de 11 kbp est présent chez *N. tabacum* et *glu*CMS (Figure 1, puits 14 et 16), et absent chez *N. glutinosa* (Figure 1, puits 15 et 17).

Les puits 4, 8, 12 et 17 montrent les fragments obtenus avec *N. tabacum* var Samsun NN ; ils sont identiques à ceux obtenus ave *N. glutinosa*, ce qui confirme l'origine *glutinosa* des plastes chez cette variété [3].

Il est donc des cas où *glu*CMS est identique à l'un ou à l'autre des parents présumés, et d'autres où il diverge de ces derniers.

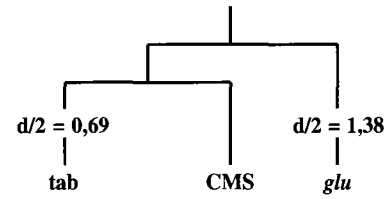
Le relevé des fragments communs c_i et différents d_i générés par six enzymes de restriction à six paires de bases (Tableau I) montre que *glu*CMS est plus proche de *glutinosa* que de *tabacum* malgré l'origine *tabacum* de ce cytoplasme indiquée par Burk [2].

Un relevé semblable, fait sur les fragments EcoRI et BamHI de l'ADN mitochondrial, manifeste une tendance à la divergence assez accentuée *du glu*CMS vis-à-vis de ses deux parents présumés (Tableau II). La Figure 2 montre la différence existant entre *glu*CMS et l'espèce *N. glutinosa* après hydrolyse avec BamHI et EcoRI.

L'explication de ces faits proposée initialement [5] était que des plastes et les mitochondries du parent paternel *glutinosa* auraient pu être transmis à un zygote exceptionnel lors du premier croisement, événement suivi d'une recombinaison interorganites (concernant plastes et mitochondries) et intermoléculaire. Cependant, la probabilité d'une telle série d'événements est d'une part très faible, et d'autant moins probable que la divergence génétique du CMS est très élevée alors qu'on s'attend à ce qu'elle soit à mi-distance entre les parents présumés, s'il s'agit d'ADN remaniés, même en plusieurs points.

Tableau I. Évaluation de la divergence entre l'ADNcp de gluCMS et ceux de *Nicotiana tabacum* (parent maternel présumé) et *N. glutinosa* (parent paternel présumé).

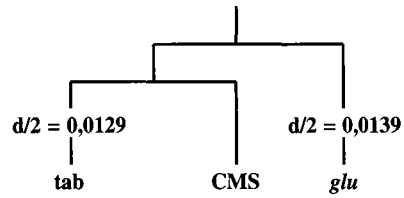
	tab/*glu*		**tab/CMS**		***glu*/CMS**	
	ci	**di**	**ci**	**di**	**ci**	**di**
BglI	6	5	4	7	7	3
PstI	11	0	10	1	10	1
XhoI	13	5	15	5	13	5
SmaI	9	5	9	5	10	2
BamH1	15	6	15	6	18	0
Eco RI	17	4	18	3	18	3
Totaux	71	25	71	27	76	14
S =	0,85		0,84		0,92	
Po (%)	2,67		2,86		1,38	



Méthode Gotoh *et al.* [8] basée sur sites de restriction.

Tableau II. Évaluation de la divergence entre l'ADNmt de *glu*CMS et ceux de *Nicotiana tabacum* (parent maternel présumé) et *N. glutinosa* (parent paternel présumé).
Nombre totaux de fragments générés par EcoRI et BamHI, sur la diagonale ; nombre de fragments communs dans les autres cases.

	N. tabacum	***N. glutinosa***	***glu*CMS**
N. tabacum	80	49 d = 0,029	47 d = 0,026
N. glutinosa	–	82	47 d = 0,026
*glu*CMS	–	–	67

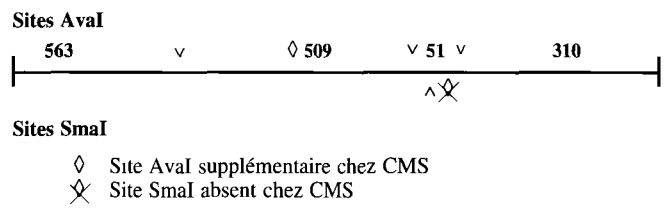


Les estimations de d sont faites selon l'équation proposée par Li et Nei (1979) pour les nombres de fragments de restriction.

Tableau III. Relevé des fragments communs ou différents observés après hydrolyse spécifique du produit d'amplification rbcL.

	tab/*glu*		*glu*/CMS		tab/CMS	
	ci	**di**	**ci**	**di**	**ci**	**di**
TaqI	7	–	7	1	6	1
HpaII	6	1	6	–	6	1
Sau3A	3	2	4	–	3	2
MaeI	1	–	1	–	1	–
HaeIII	2	2	3	–	2	2
AvaI	4	–	2	5	2	5
HinfI	3	–	5	–	4	2

Cartographie des sites variables entre CMS et tab ou *glu*



L'analyse à l'échelle du gène *rbcL*, région limitée à 1343 pb, devrait permettre d'éliminer ou de soutenir l'hypothèse de la nature éloignée ou xénique de l'ADNcp du *glu*CMS.

Le produit d'amplification obtenu est d'un poids moléculaire identique pour tous les plastotypes étudiés (Figure 3). La Figure 4 montre, en revanche, que la situation observée à l'échelle de l'ADN complet se reproduit pour une région limitée. En effet, l'hydrolyse avec AvaI et BamHI représente les cas où *glu*CMS est différent des deux parents présumés ; l'hydrolyse avec Sau3A, HaeIII et HinfI, les cas où *glu*CMS est identique à l'un des parents présumés, ici *glutinosa*.

Le relevé des fragments communs et différents (Tableau III) situe *glu*CMS plus près de *glutinosa* que de *tabacum*. L'information est cependant insuffisante pour considérer ce rapprochement comme significatif. Il est cependant certain que *glu*CMS diffère de ses deux parents présumés à l'échelle du gène *rbcL*.

Ainsi, l'analyse réalisée avec AvaI et SmaI permet de raisonner qualitativement et d'aboutir à la même conclusion. En effet, la séquence de l'ADNcp de tabac possède sur le fragment de 1433 pb 3 sites AvaI localisés sur les nucléotides n° 563, 1 072 et 1 123. La taille attendue des fragments est donc, dans l'ordre décroissant, de 563, 509, 310 et 51. On observe 4 fragments significatifs d'une longueur proche de 563, 509, 360 et 310. Le fragment de 360 indique une hydrolyse faible ou nulle du site n° 3.

N. glutinosa présente les mêmes fragments que le tabac. En revanche, le *glu*CMS montre des fragments de 563, 361, 265 et 244, correspondant à l'existence d'un nouveau site AvaI, confirmé par la disparition complète du fragment de 509.

L'hydrolyse avec SmaI, dont le tabac possède 2 sites, aux mêmes sites 1 072 et 1 123 que AvaI, devrait engendrer des fragments de 1 072, 310 et 51. On observe 1 072 et 310.

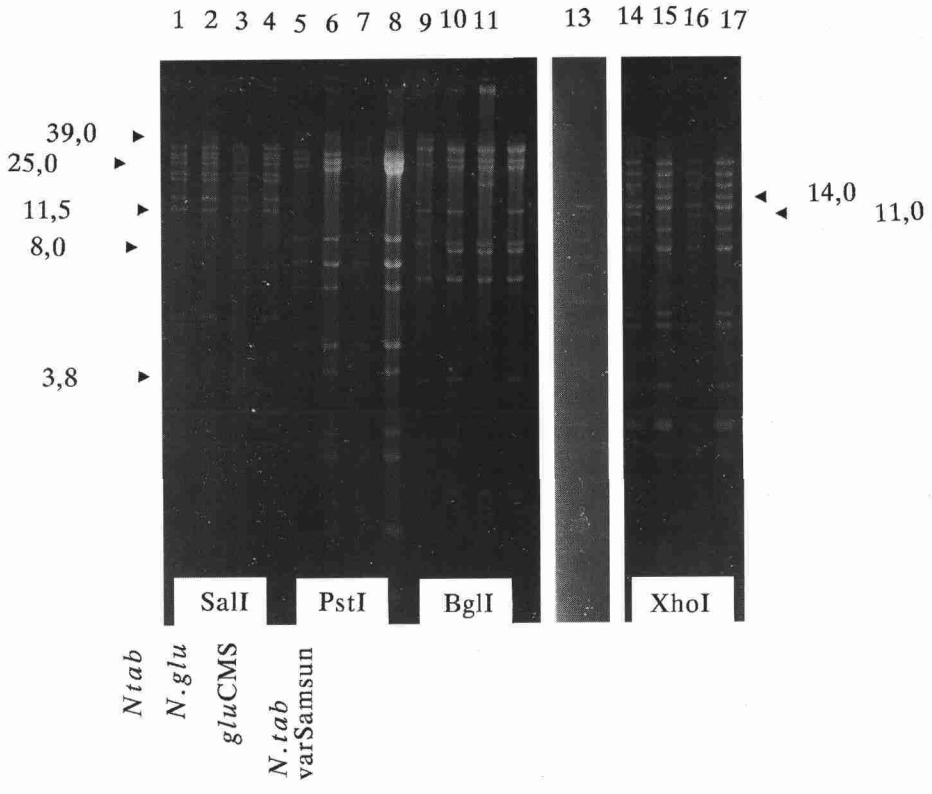


Figure 1. Électrophorèse sur gel d'agarose de 25 cm à 0,8 % des ADN chloroplastiques de *Nicotiana tabacum, N.glutinosa, glu*CMS et *N.tabacum* var. Samsun, cette dernière construite avec *N.glutinosa* comme parent maternel. Les puits 1 à 4, hydrolyse avec SalI, 5 à 8 avec PstI, 9 à 12 avec BglI ; l'échelle 1 kbp ; 13 à 16, hydrolyse avec XhoI.

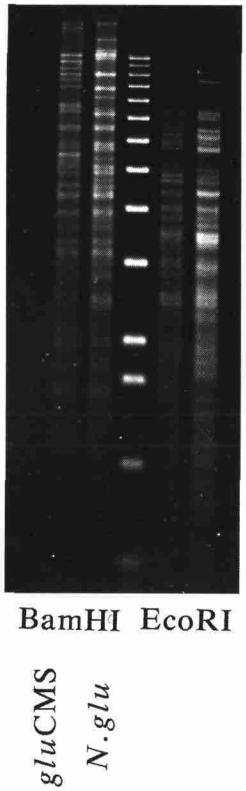


Figure 2. ADN mitochondriaux de *glu*CMS et de *N.glutinosa*, côte à côte, hydrolysés, à gauche de l'échelle, par BamHI, et à droite, par EcoRI.

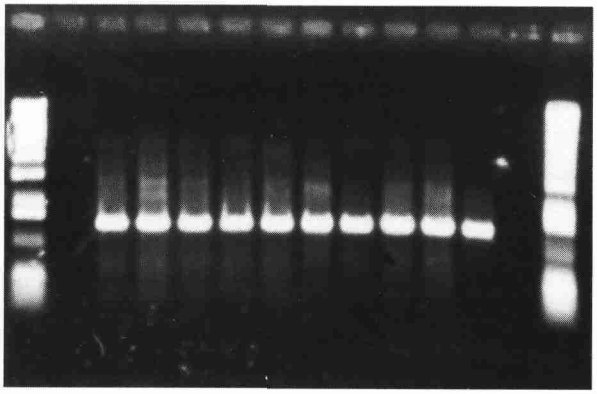


Figure 3. Électrophorèse de fragments amplifiés du gène *rbcL*, chez *N.tabacum*, puits 3 à 4 ; *glu*CMS, puits 5 à 8 ; *N.glutinosa*, puits 9 à 12. Les quantités d'ADN matrice varient de 1 ng à 16 ng.

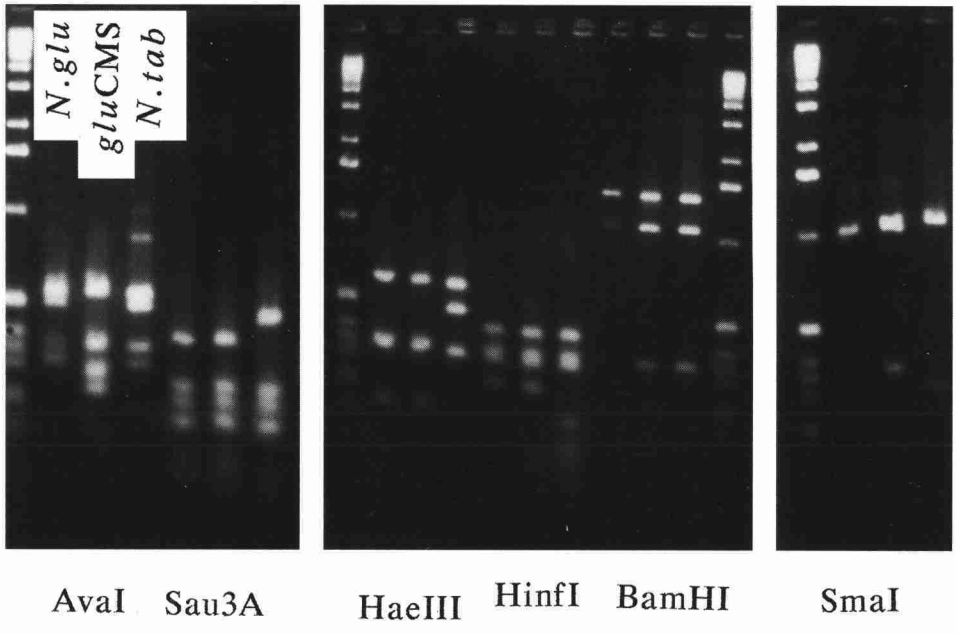


Figure 4. Électrophorèse des amplifiats du gène *rbcL* hydrolysés avec les enzymes de restriction. Puits n° 1, 8, 18 et 19. : échelle 1 kbp BRL. Les échantillons sont dans l'ordre *N.glutinosa*, *glu*-CMS, et *N.tabacum*. Puits 2, 3 et 4 : AvaI ; puits 5, 6 et 7, Sau3A ; puits 9, 10, 11, HaeIII ; puits 12, 13 et 14, HinfI ; puits 15, 16 et 17, BamHI ; puits 20, 21 et 22, SmaI.

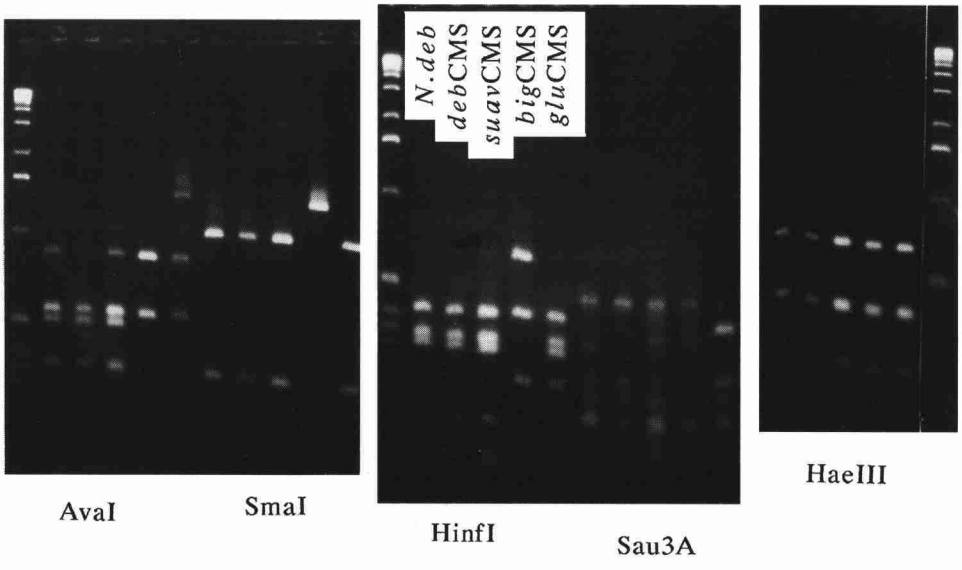


Figure 5. *Id.* Figure 2 avec les plastotypes *N. debneyi*, *deb*CMS, *suav*CMS, *big*CMS, *glu*CMS. Échelle 1 kbp aux positions 1 et 12. Puits 2 à 6, AvaI ; puits 7 à 11, SmaI ; puits 13 à 17, HinfI ; puits 19 à 22, Sau3A ; puits 23 à 27, HaeIII.

Chez *N. glutinosa*, on observe aussi 1 072 et 310. Le *glu*CMS montre des fragments de 1 072 et 360, comme les autres CMS sauf *big*. Cela correspond donc à la disparition du site SmaI 1 123 chez le *glu*CMS.

Voilà donc deux exemples : un site AvaI supplémentaire et un site SmaI en moins chez le *glu*CMS par rapport aux espèces présumées parentales qui montrent l'origine étrangère du CMS par rapport au deux parents cytoplasmiques présumés (Tableau III, cartographie).

Les autres CMS étudiés, *debneyi*, *suaveolens* et *bigelovii*, sont toutes différentes de *glu* CMS comme le montrent la Figure 5 ainsi que le Tableau 4.

Discussion – conclusion

La question posée était de savoir si le *glu*CMS, dont l'origine remonte à 1960, provenant selon Burk d'une plante parmi quelque 150 plantes hybrides normalement constituées, résulte bien d'un remaniement de ses ADN cytoplasmiques à partir de celui de ses deux parents présumés ou bien d'un cytoplasme étranger à celui de ces deux types *tabacum* et *glutinosa*.

La divergence importante déjà observée pour les sites de restriction à six bases sur les ADN chloroplastiques et mitochondriaux se trouve confirmée à l'échelle du kbp (kilo-paires de bases) par l'utilisation de l'amplification spécifique de la séquence du gène *rbcL*, obtenue grâce à la connaissance complète de la séquence de l'ADN plastidial de *N. tabacum*.

De plus, l'identification de cinq plastomes différents, dont quatre sont cotransmis avec la stérilité pollinique cytoplasmique, peut être faite rapidement par la même méthode d'amplification spécifique ou élective, suivie de l'hydrolyse avec des endonucléases de restriction à coupures fréquentes.

En conclusion, il est très probable que *glu*CMS provient d'un cytoplasme différent de tous ceux fournis par les espèces étudiées (*debneyi, suaveolens, bigelovii et glutinosa, tabacum*), et non pas d'une recombinaison qui aurait suivi une transmission paternelle de plastes et de mitochondries par *N. glutinosa*.

Un tel plasmotype pourrait résulter d'une contamination de la population de plantes hybrides par un individu présentant des anomalies florales, issu d'une autre espèce.

Références

1. Bookjans G, Stumman BM, Henningsen KW (1984). Preparation of chloroplast DNA from pea plastids isolated in a medium of high ionic strength. *Ann Biochem* 141 : 244-247.
2. Burk LG (1960). Male-sterile flower anomalies in interspecific tobacco hybrids. *J Hered* 51 : 27-31.
3. Clausen RE, Goodspeed TH (1925). Interspecific hybridization in *Nicotiana*. II. A tetraploïd *glutinosa-tabacum* hybrid, an experimental verification of Winge's hypothesis. *Genetics* 10 : 278-284.
4. Davis RW, Thomas M, Cameron J, St. John TP, Scherer S, Padgett RA (1980). Rapid DNA isolations for enzymatic and hybridization analysis. *Methods Enzymol* 65 : 404-411.
5. Dulieu H, Chatagnier O (1988). Unsuspected nucleo-cytoplasmic combinations in Tobacco,

communication n° 353, The second International Congress of Plant Molecular Biology, Jerusalem, nov. 13-18.

6. Fluhr R, Edelman M (1981). Physical mapping of *Nicotiana tabacum* chloroplast DNA. *Mol Gen Genet* 181 : 484-490.
7. Frankel R, Scowcroft WR, Whitfeld PR (1979). Chloroplast DNA variation in isonuclear male-sterile lines of *Nicotiana. Mol Gen Genet* 169 : 129-135.
8. Gotoh O, Hayashi JI, Yonekawa H, Tagashira Y (1979). An improved method for estimating sequence divergence between related DNAs from changes in restriction endonuclease cleavage sites. *J Mol Evol* 14 : 301-310.
9. Kung SD, Zhu YS, Chen K, Shen GF, Sisson VA (1981). *Nicotiana* chloroplast genome ; II. chloroplast DNA alteration. *Mol Gen Genet* 183 : 20-24.
10. Perez C, Bonnavent JF, Berville A (1990). Preparation of mitochondrial DNAs from Sunflowers *(Helianthus annuus* L.) and from Beets *(Beta vulgaris)* using a medium with a high ionic strength. *Plant Mol Biol Report* 8 (2) : 104-113.
11. Salts Y, Hermann RG, Peleg N, Lavi U, Izhar S, Beckmann JS (1984). Physical mapping of plastid DNA variation among eleven *Nicotiana* species. *Theor Appl Genet* 69 : 1-14.
12. Scowcroft WR (1979). Nucleotide polymorphism in chloroplast DNA of *Nicotiana debneyi. Theor Appl Genet* 55 : 133-137.
13. Seyer P, Kowallik KV, Herrmann RG (1981). A physical map of *Nicotiana tabacum* plastid DNA including the location of structural genes for ribosomal RNAs and the large subunit of ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Curr Genet* 3, 189-204.
14. Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng BY, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H, Sugiura M (1986). The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome ; its organization and expression. *EMBO J* 5 : 2043-2049.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 459-471.

48

Étude de la sensibilité d'*Acacia flava* et d'*Acacia nilotica* à *Agrobacterium tumefaciens*

LAURENT BRAY [1], VALÉRIE LECOUTURIER [2],
MARIA NICOLA DI MICHELE [1]

1. ISERST, Laboratoire de Lutte contre la Désertification, BP 486, Djibouti, République de Djibouti.
2. INSA, CNRS/URA 1486, Bât. 406, 20, avenue Albert-Einstein, 69621 Villeurbanne Cedex, France.

Résumé

*La sensibilité d'*A. flava *syn.* erhrenbergiana *et d'*A. nilotica *à* Agrobacterium tumefaciens *a été testée afin d'évaluer les possibilités ultérieures de transformations génétiques.*

Les inoculations sont effectuées par coculture en milieu liquide de boutures de vitro-*plants, avec une souche binaire comportant le gène* uid A *codant pour la β-glucuronidase, et un gène de résistance à la kanamycine. Il a d'abord été prouvé qu'il n'y avait aucune activité GUS endogène chez* A. flava *et chez* A. nilotica, *et que le gène* uid A *pouvait donc être considéré comme marqueur de transformation. Chez* A. flava, *des précipités de diX-indigo ont été observés dans le cytoplasme des cellules de cals formés sur les boutures inoculées, et mises en culture sur le milieu de sélection. En revanche, aucune activité GUS n'a pu être mise en évidence après l'inoculation chez* A. nilotica. *Ces résultats sont discutés, étant donné que le gène* uid A *s'exprime aussi chez les bactéries. Cependant, l'étude cytologique chez* A. flava *montre que les cristaux de diX-indigo ont une localisation uniquement cytoplasmique, et sont absents des*

noyaux et des espaces intercellulaires. Chez A. nilotica, *d'autres tests sur des tissus plus juvéniles devront être conduits. L'introduction de gènes améliorant la résistance à la salinité chez* A. flava *peut déjà être envisagée, afin de résoudre les besoins spécifiques de Djibouti en manière de lutte contre la désertification.*

Plusieurs stratégies existent pour améliorer les performances d'une espèce, la plus ancienne est la sélection sur la variabilité naturelle. Plus récemment, les techniques de transformation génétique se sont développées. Par rapport à la sélection, elles ont l'avantage d'enrichir génétiquement une espèce par l'apport de gènes étrangers d'intérêt agronomique. Ainsi, depuis 1981, date à laquelle la première plante transgénique a été obtenue [35], des gènes codant pour des résistances aux maladies virales [11], aux herbicides [4, 5] ou aux insectes [24] ont été introduits chez des plantes.

Djibouti, classé zone à climat aride [31], est confronté à un processus de désertification [10]. Ce phénomène est dû à la surexploitation par l'homme des ressources naturelles et a pour conséquence, entres autres, une salinisation progressive des eaux et des sols [28]. Le reboisement des zones affectées par la désertification doit donc être réalisé avec des végétaux résistants à la salinité. Une des possibilités est l'utilisation d'espèces halophiles pour les zones les plus marginales [17]. Cependant, étant donné que la quasi-totalité des terres affectées est constituée des terres de parcours [7], il est intéressant d'améliorer la résistance à la salinité d'espèces locales fourragères utilisées traditionnellement par les populations nomades.

Les ligneux transgéniques ont actuellement été obtenus par l'introduction d'un seul ou d'un nombre très faible de gènes : protection vis-à-vis des herbicides, des insectes ou des maladies [21, 22]. Du fait que la tolérance au sel est considérée comme un facteur polygénique dont l'ensemble des gènes impliqués n'est pas encore identifié, peu de résultats concernant des plantes transgéniques résistantes au sel sont actuellement disponibles. Cependant, il est reconnu depuis quelques années que des composés appelés osmoprotecteurs permettent à la plante qui les accumule de résister à la salinité [6, 23]. Ainsi, des tabacs transformés possédant un gène codant pour la synthèse du mannitol sont plus résistants aux fortes concentrations de NaCl que les plantes normales [29, 30].

Ces différents résultats permettent d'envisager l'amélioration de la résistance au sel des espèces ligneuses de Djibouti grâce aux transformations génétiques. La méthode de transformation la plus courante [33, 34] utilise les propriétés d'une bactérie, du genre *Agrobacterium,* qui effectue une transformation génétique naturelle des cellules végétales qu'elle infecte [12, 13]. Après la mise au point de milieux de callogenèse, cette méthode a donc été testée sur des espèces ligneuses fourragères locales considérées comme prioritaires pour Djibouti, *A. flava* et *A. nilotica.* Leur sensibilité à une souche binaire d'*Agrobacterium* comportant le gène de la β-glucuronidase (GUS) a été testée. Après avoir montré que le gène GUS peut effectivement être considéré comme marqueur de la transformation chez ces 2 espèces, une étude cytoenzymologique est effectuée afin de révéler les territoires transformés.

Matériels et méthodes

Matériels

• *Matériel végétal*

A. flava (Forsk.) Schweinf. var. *seyal* (Del.), synonyme d'*A. erhrenbergiana* [20], peuple des dépressions à sols argileux ou limoneux ; il supporte des sols modérément salés. C'est un arbre à usages multiples : principalement fourrage, mais aussi bois de chauffe, charbon, bois d'œuvre, production de tanins, clôtures sèches et pharmacopée [2].

A Djibouti, les aires de peuplements naturels de l'*A. nilotica* sont des dépressions temporairement inondées [2, 14, 20]. Son usage principal est le fourrage mais il sert aussi à la production de tanins et pour la pharmacopée [3].

• *Souche bactérienne*

Une souche binaire d'*A. tumefaciens,* dérivée de la souche LBA 4 404, est utilisée pour les tests de virulence. Cette souche, fournie par le laboratoire de génétique moléculaire microbienne de l'INSA-Lyon, contient un plasmide Ti désarmé porteur de la région *vir,* et le plasmide binaire pBI121. L'ADN-T du plasmide pBI121 inclut le gène *nptII* codant pour la néomycine transférase et le gène *uid A* codant pour la β-glucuronidase (Figure 1).

Les cellules transformées sont donc sélectionnées par leur résistance à la kanamycine due à l'expression du gène de la néomycine transférase et peuvent être mises en évidence par la cyto-enzymologie grâce à l'activité GUS.

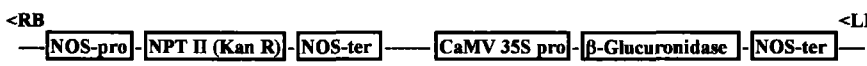


Figure 1. Schéma représentant la structure de l'ADN-T du plasmide pBI121. De la gauche vers la droite : NOS-Pro : site promoteur de la nopaline synthétase ; NPT II (Kan R) : gène codant pour la néomycine phosphotransférase et conférant la résistance à la kanamycine ; NOS-ter : site de polyadénylation de la nopaline synthétase ; CaMV 35S promoter : site promoteur de CaMV ; ß-glucuronidase : gène *uid A* codant pour la ß-glucuronidase ; NOS-ter : site de polyadénylation de la nopaline synthétase. Les différents sites de restriction ne sont pas représentés [19].

Méthodes

• *Germination et obtention de plantules stériles*

L'inhibition tégumentaire est levée par un traitement à l'acide sulfurique à 95 % (10 mn pour *A. flava* et 45 mn pour *A. nilotica).* Les semences sont ensuite nettoyées dans du papier filtre. La stérilisation est réalisée, sous hotte à flux laminaire, par de l'alcool à 70° pendant 10 mn, puis par une solution d'hypochlorite de sodium commerciale à 12° diluée à 50 % pendant 10 mn. Les semences sont finalement rincées 3 fois à l'eau distillée et stérilisée, et mises à germer par lots de 40 dans des pots de germination contenant de l'eau gélosée (agar-agar à 6 $g.l^{1}$), stérilisés à 110 °C pendant 30 mn.

La photopériode dans la chambre de culture est de 16 heures, avec une énergie

lumineuse moyenne de 100 $W.m^2$ dispensée par 4 lampes OSRAM L30W/20 Coolwhite. La température est de 27 °C.

• ***Milieu de callogenèse***

Les cotylédons et les boutures sont prélevés sur des plantules âgées de 20 jours. Tous les méristèmes sont excisés et les explants sont mis en culture horizontalement. Le milieu contient les éléments minéraux de Murashige et Skoog [25] et est additionné de 1 $ml.l^{-1}$ de la solution de vitamines de Nitsch et Nitsch [27] et de 50 $g.l^{-1}$ de saccharose. L'acide α-naphtylacétique est ajouté à raison de 1, 2 ou 3 $mg.l^{-1}$. Après 10 semaines de culture, la callogenèse est évaluée par le rapport entre la surface du cal formé et la surface de l'explant à l'état initial.

• ***Entretien de la souche bactérienne***

La souche binaire LBA 4 404 est cultivée à 26 °C, sur milieu de Luria-Bertani constitué de 5 $g.l^{-1}$ d'extrait de levure, de 10 $g.l^{-1}$ de chlorure de sodium et de 10 $g.l^{-1}$ de tryptone. Le pH est ajusté à 7,0 ± 0,1. Après la stérilisation à 110° pendant 30 mn, la kanamycine est ajoutée au milieu après la stérilisation à raison de 50 $mg.l^{-1}$.

• ***Inoculation du matériel végétal par* A. tumefaciens**

Les inoculations sont effectuées par la co-culture en milieu liquide du matériel végétal avec les bactéries en phase exponentielle de croissance [16]. Les boutures prélevées sur des *vitro*-plants âgés de 6 semaines sont blessées par l'excision de leurs méristèmes et par des coupures superficielles au scalpel. Le matériel végétal est ensuite plongé pendant 5 mn dans une culture de bactéries d'un jour (DO_{600} = 0,3 correspondant à 5.10^8 cfu/ml). Après séchage sur papier filtre stérile, les boutures sont déposées pendant deux jours sur le milieu de callogenèse. Elles sont ensuite transférées sur le même milieu additionné de kanamycine à 100 $mg.l^{-1}$ pour sélectionner les tissus transformés et de céfotaxime à 250 $mg.l^{-1}$ pour éliminer les bactéries (Figure 2). Deux repiquages sur un milieu de sélection neuf sont effectués, l'un après 10 jours, l'autre après 6 semaines. Après 10 semaines, les échantillons sont prélevés et testés pour leur activité GUS.

• ***Détection cytoenzymologique de l'activité* β-*glucuronidase***

La détection cytoenzymologique de l'activité de la β-glucuronidase est réalisée selon le protocole de Jefferson [20]. Le matériel végétal est incubé pendant 20 heures, à 37 °C au bain-marie, dans une solution de X-Glu (Sigma) à 1 mM, préparée dans du tampon phosphate pH 7 (Merck). Les coupes à main levée sont montées entre lame et lamelle dans du glycérol, et sont observées en microscopie photonique.

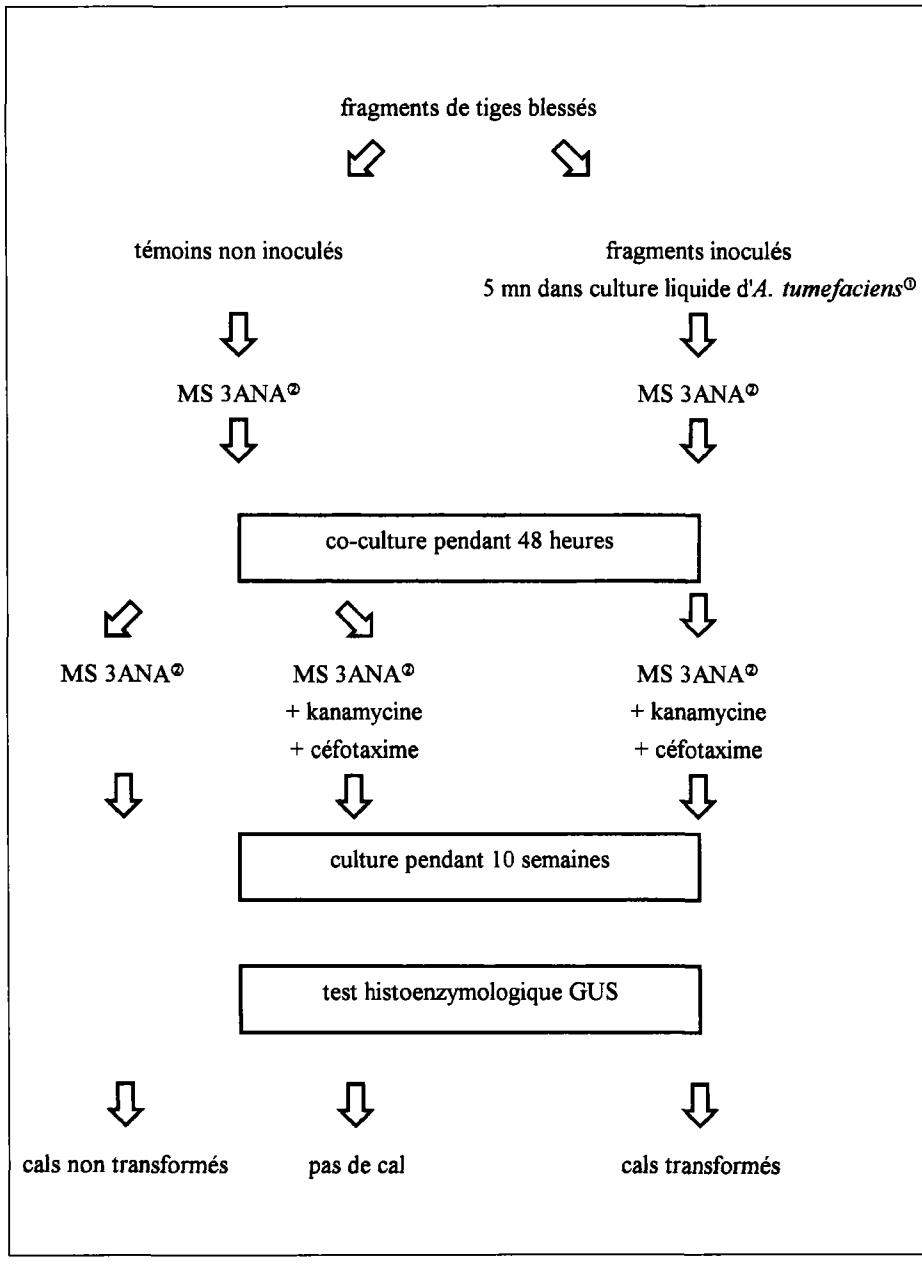


Figure 2. Schéma du protocole expérimental pour l'obtention de tissus transgéniques. ① inoculation avec la souche binaire LBA 4 404 contenant le plasmide pBI121. ② Milieu de base Murashige et Skoog (MS) additionné de 3 $mg.l^{-1}$ de ANA.

Résultats

Influence de l'origine de l'explant et de la concentration en ANA sur la callogenèse

Chez *A. flava* et *A. nilotica,* la callogenèse des boutures augmente en fonction de la concentration en ANA dans le milieu de culture (Figures 3a et b). A 3 mg.l^{-1} d'ANA, la totalité des boutures mises en culture ont formé des cals et le rapport entre la surface du cal et la surface initiale de l'explant est significativement supérieur à celui calculé pour les témoins des 2 espèces testées.

En revanche, aucun des cotylédons d'*A. flava* ou d'*A. nilotica* déposés sur les différents milieux de culture ne développe de cal, et, au bout de 10 semaines, 85 % des cotylédons chez *A. flava* et 90 % chez *A. nilotica* sont nécrosés.

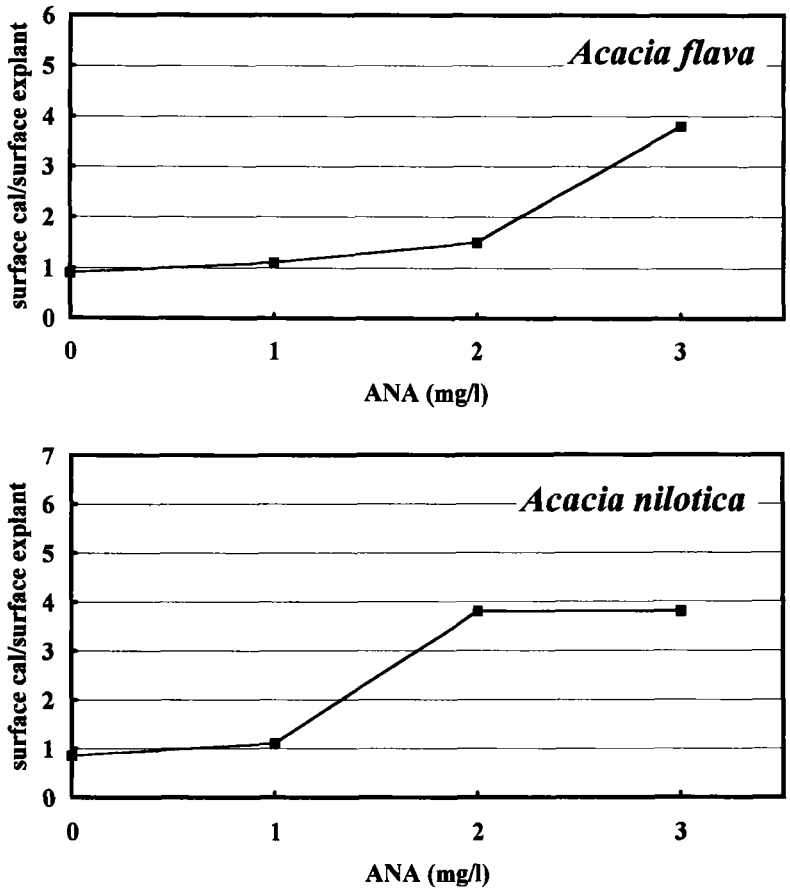


Figure 3. Influence de l'acide α–naphtylacétique sur la callogenèse d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana* et d'*Acacia nilotica*. Le rapport entre la surface du cal et la surface initiale de l'explant est calculé 10 semaines après le repiquage sur le milieu de culture contenant les éléments minéraux de Murashige et Skoog et 50 g.l^{-1} de saccharose.

Absence d'activité GUS endogène chez *A. flava* et *A. nilotica*

Aucune activité β-glucuronidase n'est mise en évidence chez les boutures d'*A. flava* non inoculées et cultivées pendant 10 semaines sur un milieu de callogenèse non sélectif, sans antibiotiques (Photo 1a). Chez *A. nilotica,* les résultats sont identiques (Photo 1b). Les 2 espèces testées sont donc naturellement dépourvues de toute activité GUS endogène.

Expression du gène GUS chez les bactéries

Des bactéries prélevées sur leur milieu de culture sont directement mises à incuber avec le X-Glu. Après 20 heures d'incubation, une coloration bleue apparaît, caractéristique du produit de la réaction GUS (Photo 2). Le gène GUS porté sur le plasmide binaire pBI121 s'exprime donc dans la bactérie.

Conséquences de l'inoculation par *A. tumefaciens*

• *Callogenèse sur milieu de sélection*

Pendant les 10 semaines de culture sur le milieu de callogenèse additionné d'antibiotiques (kanamycine et céfotaxime), aucune callogenèse n'est observée chez les boutures d'*A. flava* et *A. nilotica* non inoculées (Tableau I).

En revanche, dès 10 jours, chez *A. flava,* des cals apparaissent aux sites de blessure sur des explants inoculés. Chez *A. nilotica,* les cals n'apparaissent pas avant 30 jours. Après 10 semaines de culture, le pourcentage d'explants inoculés ayant développé un cal est de 3,6 % chez *A. nilotica* et de 10 % chez *A. flava* (Tableau I).

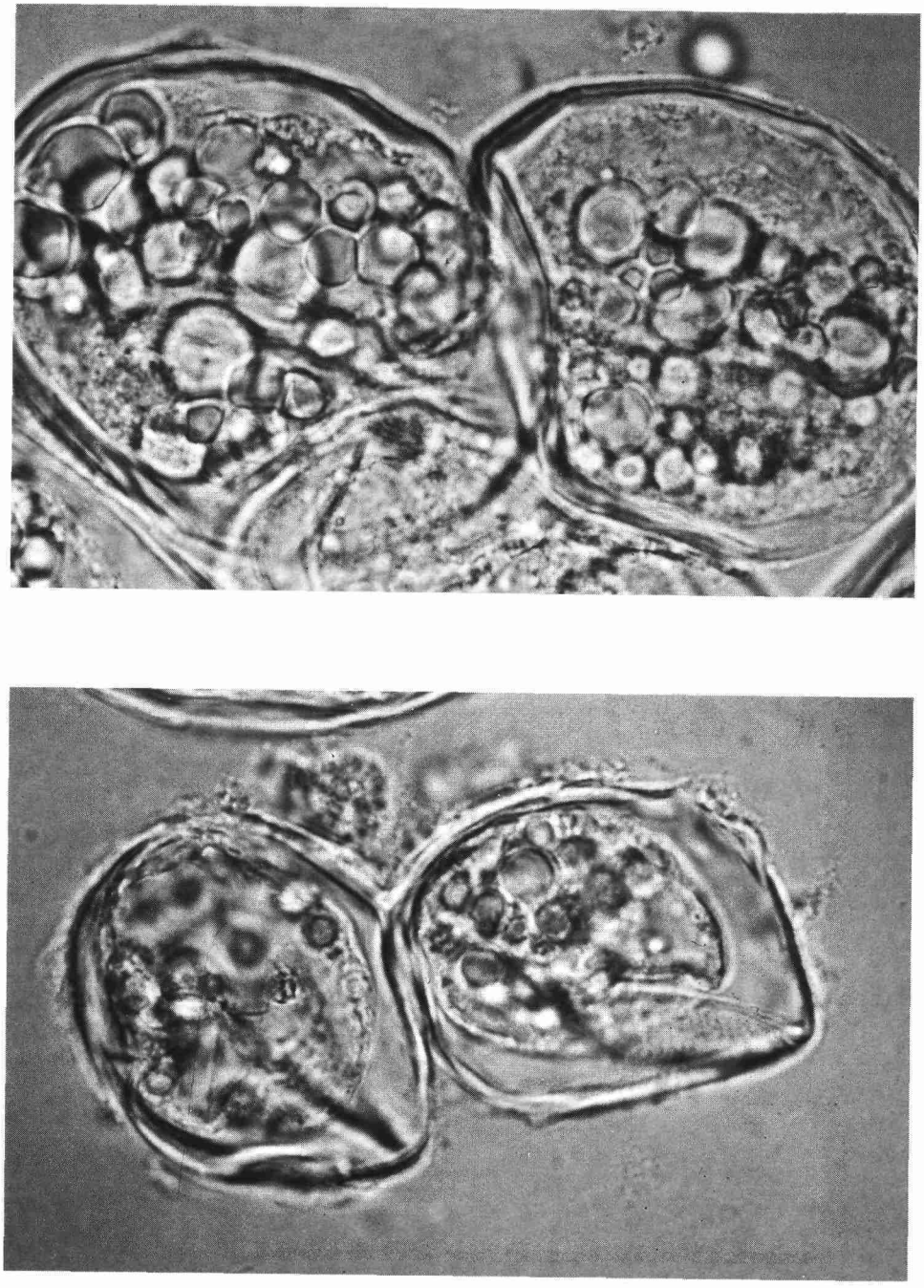
• *Activité GUS*

Les boutures non inoculées d'*A. flava,* cultivées sur le milieu de callogenèse additionné de kanamycine et de céfotaxime, ne montrent aucune activité GUS (Photo 3a). En revanche, une activité GUS est détectée dans les cellules de cals formés sur des boutures inoculées (Photo 3b). Les précipités de diX-indigo sont absents des espaces intercellulaires et des noyaux, et sont uniquement localisés dans le cytoplasme.

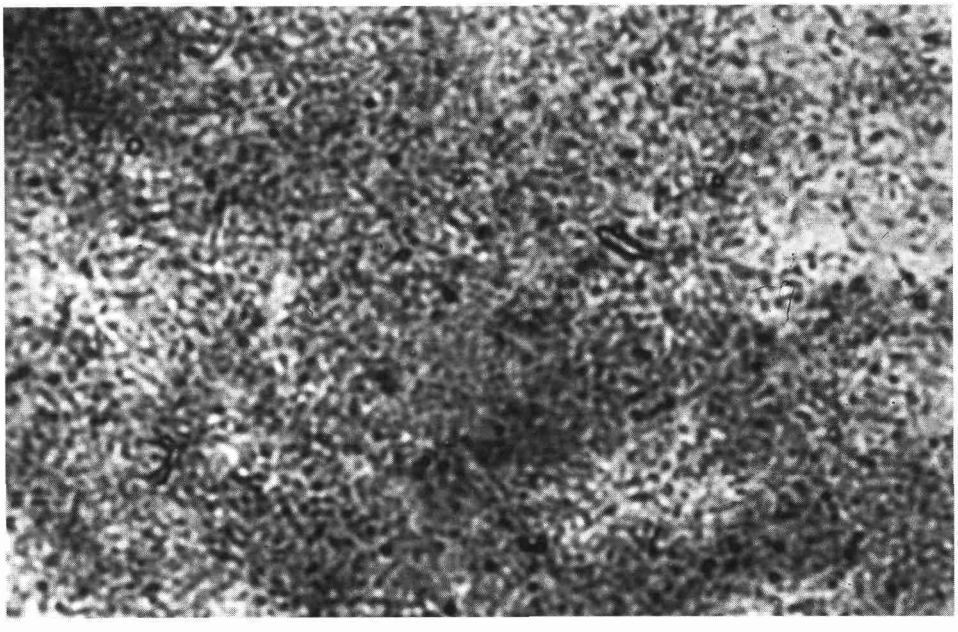
Chez *A. nilotica,* les tests GUS effectués sur les boutures témoins cultivées sur antibiotiques sont tous négatifs. De même, après 20 heures d'incubation, aucune coloration bleue n'est visible sur les différentes coupes réalisées dans les cals d'*A. nilotica* formés sur les sites de blessures des boutures inoculées.

Tableau I. Callogenèse obtenue chez *A. flava* et *A. nilotica* inoculés, après 10 semaines de culture sur milieu de base additionné de 3 mg.l^{-1} d'ANA, de 100 mg.l^{-1} de kanamycine et de 250 mg.l^{-1} de céfotaxime.

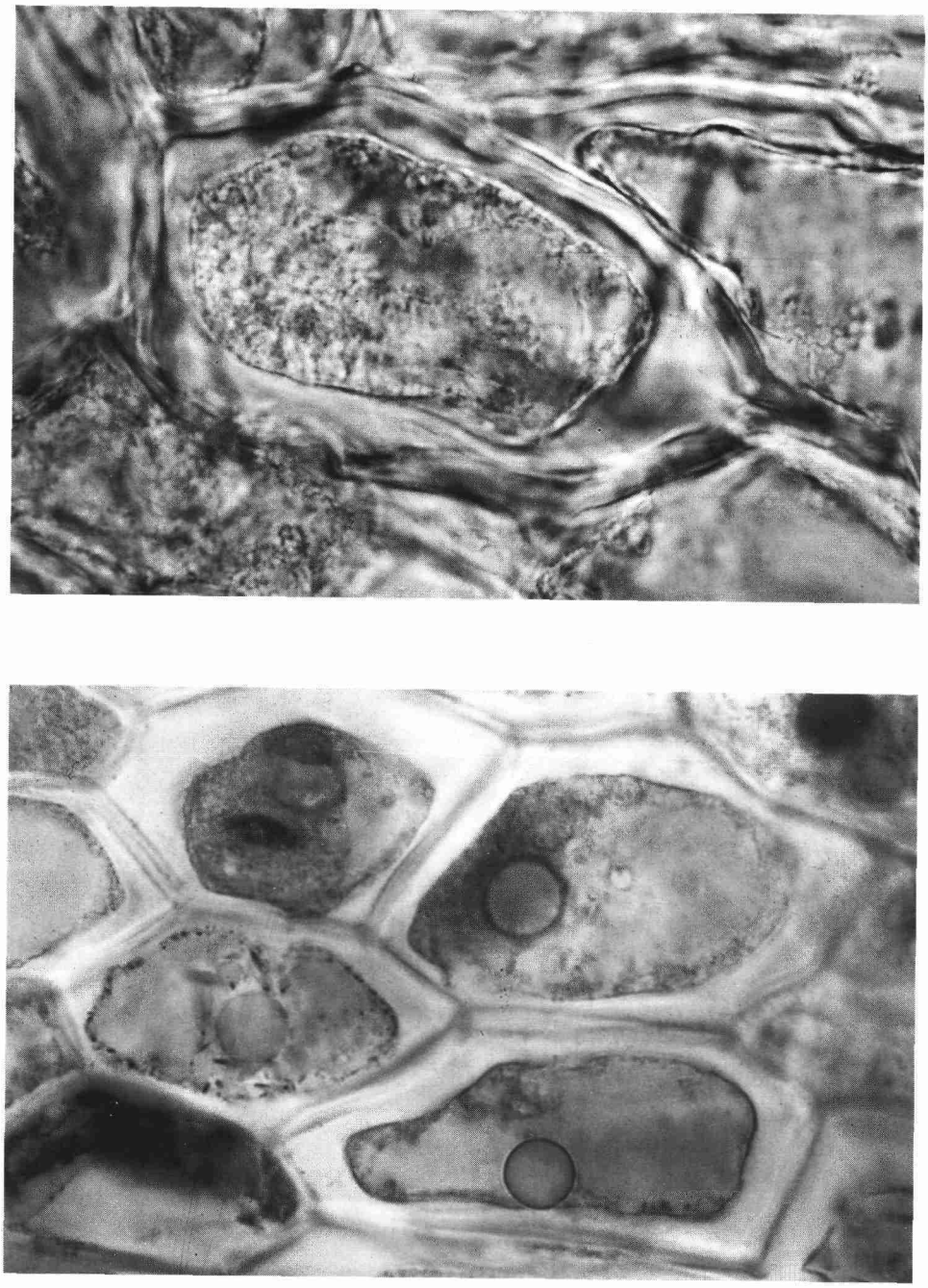
Espèce	Condition	Nombre total d'explants	Nombre d'explants ayant formé un cal	Pourcentage de callogenèse (%)
A. flava	inoculé	58	6	10
	témoin	9	0	0
A. nilotica	inoculé	56	2	3,6
	témoin	11	0	0



Photographies 1a et 1b. Absence d'activité GUS endogène dans les cellules de cals formés chez *A. flava* (1a) et chez *A. nilotica* (1b) cultivés 10 semaines sur milieu de callogenèse (a × 1 650 ; b × 1 650).



Photographie 2. Mise en évidence de l'expression du gène GUS dans la souche binaire d'*A. tumefaciens* (plasmide pBI121) (x 1 650).



Photographies 3a et 3b. *A. flava* incubé 20 heures avec X-Glu après 10 semaines de culture sur milieu de callogenèse additionné de kanamycine à 100 $mg.l^{-1}$ et de céfotaxime à 250 $mg.l^{-1}$. 3a : non inoculé ; 3b : inoculé avec la souche binaire d'*A. tumefaciens* contenant GUS (a × 1 650 ; b × 1 650).

Discussions et perspectives

Les inoculations par une souche d'*Agrobacterium tumefaciens,* contenant le gène GUS, ont permis l'obtention de cals sur milieu de sélection chez les deux espèces testées, *A. flava* et *A. nilotica.* Le gène GUS chez les 2 espèces peut être considéré comme marqueur de la transformation étant donné que, contrairement à quelques espèces végétales [26], le test GUS est négatif dans le matériel végétal normal non inoculé. D'autre part, une activité GUS a pu être mise en évidence dans les cals formés chez *A. flava* après l'inoculation par *A. tumefaciens.*

Cette activité GUS détectée après inoculation chez *A. flava* peut être discutée. En effet, nous avons montré que la souche bactérienne utilisée exprimait elle aussi le gène *uid A.* L'expression du gène GUS dans des souches d'*Agrobacterium* contenant des plasmides GUS dérivés du pBIN19 a déjà été rapportée [15,20]. Selon Jefferson [20], l'activité serait due à une transcription étendue jusqu'à la région GUS à partir du promoteur de *lac Z* présent sur le plasmide BIN19. L'inversion de la cassette GUS par rapport au promoteur de *lac Z* diminue de 20 fois l'activité GUS mesurée [20].

Selon Caissard et Chriqui [8], lorsque de telles souches sont utilisées, le caractère transformé des cellules obtenues après inoculation ne peut être affirmé que par des études ultrastructurales en microscopie électronique, grâce à un protocole associant la cytoenzymologie ultrastructurale à des contrôles en microanalyse X. Avec ce protocole, il est alors possible de déterminer si l'activité GUS provient des cellules transformées ou des bactéries [9].

Pour éviter ce type d'analyse, des souches n'exprimant pas le gène GUS contenu sur leur plasmide binaire ont été développées. Ainsi, l'insertion d'un intron dans le gène de la β-glucuronidase a permis à Vancanneyt *et al.* [32] d'obtenir une souche ne montrant aucune activité GUS. En effet, seules les cellules eucaryotes sont capables du phénomène d'épissage nécessaire pour produire une enzyme fonctionnelle à partir de ce type de construction. Janssen et Gardner [18] ont également obtenu une construction permettant l'expression exclusive dans les cellules végétales transformées, en utilisant un gène GUS dépourvu de sites de fixation pour les ribosomes bactériens.

Cependant, la microscopie photonique nous a permis de montrer que la localisation des précipités bleus dans les cellules de cals d'*A. flava* provenant de boutures inoculées par *A. tumefaciens* était uniquement cytoplasmique, et qu'ils étaient absents aussi bien des espaces intercellulaires que des noyaux.

Enfin, chez *A. nilotica,* aucune activité GUS n'a été mise en évidence dans les cals formés sur milieu de sélection à partir des boutures inoculées. Deux hypothèses peuvent expliquer la non-détection d'une activité GUS : (1) *A. nilotica* n'est pas sensible à *A. tumefaciens* et n'a pas été transformé ou (2) il y a eu transformation mais le niveau d'expression du gène GUS dans les cellules des cals était trop faible pour permettre la mise en évidence de la transformation. La 2^{e} hypothèse permet d'expliquer la formation de cals sur milieu de sélection chez les boutures inoculées d'*A. nilotica.* Cependant, d'autres tests de sensibilité devront être effectués sur des tissus plus juvéniles considérés comme plus sensibles à *A. tumefaciens* [1]. En effet, la juvénilité des tissus végétaux semble être un facteur important pour la sensibilité aux agrobactéries. Chez deux espèces d'*Eucalyptus, E. gunnii* et *E. tetrodonta,* seuls des organes très juvéniles de germination âgés au plus de 4 mois sont sensibles aux inoculations par *A. tumefaciens* ou *A. rhizogenes.*

En conclusion, la sensibilité de certaines espèces d'*Acacia* à *A. tumefaciens* nous

permet d'envisager la création de plantes fourragères transgéniques plus résistantes aux contraintes environnementales, et répondant ainsi aux besoins des pays arides, comme Djibouti, en matière de lutte contre le désertification.

Abréviations

ADN-T : ADN transféré ; ANA : Acide α-naphtylacétique ; CaMV : Virus de la mosaïque du chou-fleur *(cauliflower mosaic virus)* ; diX-indigo : 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo ; DO_{600} : Densité optique à 600 nm ; cfu : *colony forming unit ;* GUS : ß-glucuronidase ; MS : Milieu de Murashige et Skoog ; NOS : Nopaline synthétase ; NPT II : Néomycine phosphotransférase ; *vir* : région de virulence du plasmide Ti ; X-Glu : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide.

Références

1. Adam S, Chriqui D, Caissard JC (1991). Transformation génétique et régénération de bourgeons transgéniques chez *Eucalyptus gunnii.* Biotechnologies appliquées aux arbres forestiers. AFOCEL : 81-110.
2. Audru J, César J, Forgiarini G, Lebrun JP (1987). La végétation et les potentialités pastorales de la République de Djibouti. Maisons-Alfort : IEMVT : 384.
3. Audru J, Labonne M, Guérin H, Arun Bilha (1993). *Acacia nilotica*, son intérêt fourrager et son exploitation chez les éleveurs Afars de la vallée du Magdoul à Djibouti. *Bois et Forêts des Tropiques* 235 : 59-70.
4. Brasileiro ACM, Leplé JC, Muzzin J, Ounnoughi D, Michel M, Jouanin L (1991). An alternative approach for gene transfer in trees using wild-type *Agrobacterium* strains. *Plant Mol Biol* 17 : 441-452.
5. Brasileiro ACM, Tourneur C, Leplé JC, Combes V, Jouanin L (1992). Expression of the mutant *Arabidopsis thaliana* acetolactate synthase gene confers chlorsulfuron resistance to transgenic poplar plants. *Transgenic Res* 1 : 133-141.
6. Bray L, Chriqui D, Gloux K, Le Rudulier D, Meyer M, Peduzzi J (1991). Betaines and free amino acids in salt stressed vitroplants and resting buds of *Populus trichocarpa* x *deltoides. Physiol Plant* 83 : 136-143.
7. Bray L, Di Michele MN (1993). Réflexions sur la désertification et l'environnement. *Sci Env* 8 : 9-17.
8. Caissard JC, Chriqui D (1990). Ultrastructural visualization of β-glucuronidase activity in *Nicotiana tabacum* root apices harbouring the CaMV-GUS construct. *Plant Cell,* soumis.
9. Caissard JC (1993). Repérage ultrastructural de la β-glucuronidase sur des plantes transgéniques comportant le gène GUS : méthodologies et études de cas. Thèse Univ. Paris 6, 144 p.
10. Comité National pour l'Environnement (1991). Rapport National Environnement. Djibouti : ONTA/SPSE : 105.
11. Da Câmara Machado ML, da Câmara Machado A, Hanzer V, Weiss H, Regner F, Steinkellner H, Mattanovitch D, Plail R, Knapp E, Kalthoff B, Katinger H (1992). Regeneration of transgenic plants of *Prunus armeniaca* containing the coat protein gene of Plum Pox Virus. *Plant Cell Rep* 11 : 25-29.
12. De Cleene M, De Ley J (1976). The host range of crown gall. *Bot Rev* 42 : 389-464.
13. De Cleene M, De Ley J (1981). The host range of infectious hairy-root. *Bot Rev* 47 : 147-194.

14. De Framond H (1990). Valorisation des ressources génétiques forestières en République de Djibouti. Revue de l'ISERST 4 : 13-18.
15. Guivarc'h A (1990). Conséquences cellulaires de l'inoculation de disques racinaires de carotte par *Agrobacterium rhizogenes* ou *Agrobacterium tumefaciens* comportant le gène de la β-glucuronidase. DEA biologie et physiologie végétales Univ. Paris 6, 71 p.
16. Horsh RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985). A simple methode for transfering genes into plants. *Science* 227 : 1229-1231.
17. Jalludin M, Bray L, Atasi M, Gafaneh A, Zotskina E, Hirsch J, Houdart X, Weight D, Ali A (1993). Évaluation des ressources en eau et terre du site expérimental du cône de déjection de l'oued Atar. *Sci Env* 8 : 23-26.
18. Janssen BJ, Gardner RC (1989). Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium. Plant Mol Biol* 14 : 61-72.
19. Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D (1986). β-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 8447-8451.
20. Jefferson RA (1987). Assaying chimeric genes in plants : the GUS fusion system. *Plant Mol Biol Reporter* 4 : 387-405.
20. Lebrun JP, Audru J, César J (1989). Catalogue des plantes vasculaires de la République de Djibouti. Maisons-Alfort : IEMVT : 277.
21. Leplé JC, Brasileiro ACM, Michel MF, Delmotte F, Jouanin L (1992). Transgenic poplars : expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Rep* 11 : 137-141.
22. Leplé JC (1993). Transformation génétique de peupliers hybrides par *Agrobacterium tumefaciens.* Application à la résistance aux insectes. Thèse Univ. d'Orléans, 134 p.
23. Le Rudulier D, Strom AR, Dandekar AM, Smith LT, Valentine RC (1984). Molecular biology of osmoregulation. *Science* 224 : 1064-1068.
24. McCown BH, McCabe DE, Russell DR, Robinson DJ, Barton KA, Raffa KF (1991). Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particule acceleration. *Plant Cell Rep* 9 : 590-594.
25. Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium of rapid growth and assays within tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
26. Nielsen JE, Joerbo MJ, Andersen JM, Hansen B, Okkels FT (1988). The histochemical GUS assay for plant transformation, detection of background reaction in untransformed tissue from several species. Congrès Eucarpia, Helsinger (Danemark), 11-16 sept.
27. Nitsch JP, Nitsch C (1965). Néoformation de fleurs *in vitro* chez une espèce de jours courts : *Plumbago indica* L *Ann Physiol Veg* 7 : 251-256.
28. Odingo RS (1990). The definition of desertification : its programmatic consequences for UNEP and the international community. *Desertification Control Bulletin* 18 : 31-50.
29. Tarczynski MC, Jensen RG, Bohnert HJ (1992). Expression of a bacterial *mtlD* gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 2600-2604.
30. Tarczynski MC, Jensen RG, Bohnert HJ (1993). Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* 259 : 508-510.
31. UNESCO (1977). Carte de répartition mondiale des régions arides.
32. Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M (1990). Construction of an intron-containing marker gene ; splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* 220 : 245-250.
33. Walden R (1988). Vectors based on the Ti and Ri plasmid of *Agrobacterium.* In *Genetic transformation in plants.* Open University Press, Biotechnologies Series : 28-35.
34. Weising K, Schell J, Khal G (1988). Foreign genes in plants : transfer, structure, expression, and applications. *Annu Rev Genet* 22 : 421-477.
35. Wullems GJ, Molendijk L, Ooms G, Schilperoort RA (1981). Retention of tumor markers in F1 progeny plants from *in vitro* induced octopine and nopaline tumor tissues. *Cell* 24 : 719-727.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 473-481.

49

Expression chez *Brassica napus* d'une stérilité mâle génique obtenue par génie génétique. Comparaison avec trois autres stérilités mâles géniques

M. DENIS [1], J.-P. GOURRET [2], R. DELOURME [1], C. MARIANI [3], M. RENARD [1]

1. INRA, Centre de Recherche de Rennes, Station d'Amélioration des Plantes, BP 29, 35650 Le Rheu, France.
2. Laboratoire de Biologie Cellulaire, Université de Rennes I, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes, France.
3. Plant Genetic Systems NV, J. Plateaustraat 22, 9000 Gent, Belgique.

Résumé

L'expression chez Brassica napus *d'une stérilité mâle génique obtenue par transfert de gène* [20] *a été comparée à trois autres stérilités mâles géniques* [24] *(Schuster, non publié ; Rakow, non publié).*

Dans les 4 cas, une réduction du filet des étamines et une indéhiscence des anthères sont observées. Pour la stérilité mâle obtenue par génie génétique, le blocage de la microsporogenèse se produit après la libération des microspores hors de la callose, et conduit à la présence d'un amas d'exines vides aplaties dans les anthères. Cette situation est également observée pour les stérilités découvertes par Shuster et Rakow. Pour la stérilité de Takagi, l'arrêt de la microsporogenèse se situe au stade « microspores sous callose » et se traduit par la présence d'un amas de callose dans les anthères.

De par cette étude, il apparaît que la stérilité mâle génique obtenue par transfert de gène s'exprime chez le colza de façon identique à des stérilités mâles géniques apparues spontanément.

L'expression d'une stérilité mâle génique obtenue par génie génétique [20] a été étudiée chez *Brassica napus*. Le gène transféré consiste en un gène codant pour une ribonucléase, sous le contrôle d'un promoteur spécifique du tapis des anthères. A titre comparatif, trois autres stérilités mâles géniques ont été étudiées chez *Brassica napus* : deux stérilités apparues spontanément (découvertes respectivement par W. Schuster et par G. Rakow, non publiés) et une stérilité induite par irradiation avec des rayons gamma [24].

Matériels et méthodes

Matériels

Pour la stérilité obtenue par transfert de gène, la variété Drakkar (variété double zéro de Colza de printemps) a été transformée selon la méthode de De Block *et al.* [3]. L'étude de la stérilité mâle a été réalisée sur la première génération (T1) obtenue à partir du rétrocroisement de 7 transformants primaires avec des plantes de Drakkar fertile. Les transformants primaires contiennent la construction pTA29-*RNAse T1* [20]. Le gène transféré, *RNase T1,* consiste en un gène codant pour une ribonucléase. Ce gène est sous le contrôle d'un promoteur, pTA29, spécifique du tapis des anthères.

Les trois autres stérilités géniques se référant aux travaux de Takagi, Schuster et Rakow ont été étudiées sur des plantes provenant de parcelles de rétrocroisement avec les variétés de colza Bienvenu (lignée 0+), Jetneuf (lignée 0+), Darmor (lignée 00) et Samouraï (lignée 00).

Dans tous les cas, les plantes fertiles de la variété Drakkar ont servi de témoin.

Conditions de culture

Les transformants, après germination, ont été placés pendant 3 semaines en serre, puis pendant 3 semaines en chambre de vernalisation à 4 °C, 8h/4h jour/nuit. Après la phase de vernalisation, les plantules ont été transférées dans des grands pots et placées en serre jusqu'à la floraison.

Les stérilités mâles géniques, naturelles ou obtenues par mutagenèse, ont été étudiées sur des plantes en parcelles de rétrocroisement mises en place dans la pépinière d'hiver 1989-1990 à l'INRA du Rheu.

Caractérisation morphologique et cytologique des plantes mâles stériles

• ***Observation par microscopie électronique à balayage***

En complément de l'observation visuelle, les fleurs mâles stériles et fertiles ont été comparées par microscopie électronique à balayage. Des pièces florales ou des fleurs entières ont été fixées, déshydratées par la méthode du point critique et ensuite observées après métallisation des échantillons avec de l'or [13]. Cette technique a également permis d'observer le contenu des anthères.

• ***Étude de la microsporogenèse***

La coloration Alexander [1] a été utilisée pour déterminer rapidement le stade de blocage de la microsporogenèse chez les plantes mâles-stériles. Les étamines ou les boutons ont été écrasés entre lame et lamelle dans une goutte du colorant Alexander, et observés au microscope photonique directement ou après une nuit à 30 °C.

Pour l'observation d'échantillons fixés dans la résine, les anthères à différents stades de développement ont été fixées dans le glutaraldéhyde (2,5 %, w/v) pendant 14 h à 4 °C. Après lavage au tampon cacodylate 0,1 M, les pièces ont été post-fixées dans du tétroxyde d'osmium (1 %, w/v) pendant 2 h puis relavées au tampon cacodylate. Après déshydratation dans une série d'alcool à concentration croissante puis d'oxyde de propylène, les échantillons ont été déposés de façon orientée dans de l'épon fluide additionné de catalyseur. Les blocs de résine polymérisée ont été obtenus en 48 h à 60 °C. Les coupes semi-fines (1µm) obtenues à partir de chaque échantillon ont été colorées au bleu de toluidine et montées dans de la résine pour l'observation au microscope photonique [19].

Résultats

Observation visuelle

Dans les quatre cas de stérilités mâles, les plantes mâles-stériles peuvent être reconnues avant floraison du fait que leurs boutons floraux présentent un plus petit diamètre par rapport à ceux des plantes fertiles. A floraison, l'observation des fleurs entières montre, pour le colza fertile, que les étamines déhiscentes sont de longueur égale ou supérieure au stigmate. Cela n'est pas le cas pour les fleurs mâles stériles qui pour les 4 stérilités montrent une réduction de longueur du filet des étamines et une indéhiscence des anthères.

Observation au microscope électronique à balayage (MEB)

Les observations au MEB confirment les observations visuelles. Elles ont permis également d'observer qu'il n'y avait pas de différences de développement des nectaires entre les fleurs mâles-stériles et mâles-fertiles.

A l'anthèse, l'observation du contenu des anthères par MEB montre la présence de grains de pollen arrondis dans les anthères fertiles. Les épaississements de l'assise mécanique ainsi que les 3 apertures des grains de pollen sont facilement discernables.

Pour la stérilité obtenue par génie génétique, les anthères contiennent un amas d'exines vides aplaties. La coloration Alexander confirme l'absence de cytoplasme. Ce même type d'amas dans les anthères est également observé pour les stérilités de Schuster et de Rakow. Alors que pour la stérilité de Takagi, des masses arrondies sont observées dans les sacs polliniques et correspondraient à des tétrades de microspores sous callose.

Microsporogenèse

L'étude de la microsporogenèse par l'observation de coupes semi-fines colorées au bleu de toluidine a permis de définir le stade de blocage de la microsporogenèse pour

les quatre stérilités mâles. La microsporogenèse chez le colza fertile a été décrite par Grant *et al.* [12]. Le blocage de la microsporogenèse pour la stérilité mâle obtenue *via* le transfert de gènes (Figure 1) se situe au stade « microspores vacuolisées ». Les cellules tapétales sont hétérogènes de par leur forme et leur coloration au bleu de toluidine. Une lyse précoce du contenu du tapis parallèle à celle du contenu des microspores conduit à la présence d'exines vides et aplaties dans les anthères. Ces phénomènes sont similaires à ceux observés pour les stérilités de Schuster et de Rakow. La stérilité de Takagi (Figure 2) est marquée par une vacuolisation importante du tapis au stade « tétrade » et une irrégularité dans la forme des tétrades. Par la suite, il y a dégénérescence des microspores sous callose et du tapis conduisant finalement à la présence d'un amas callosique dans les anthères.

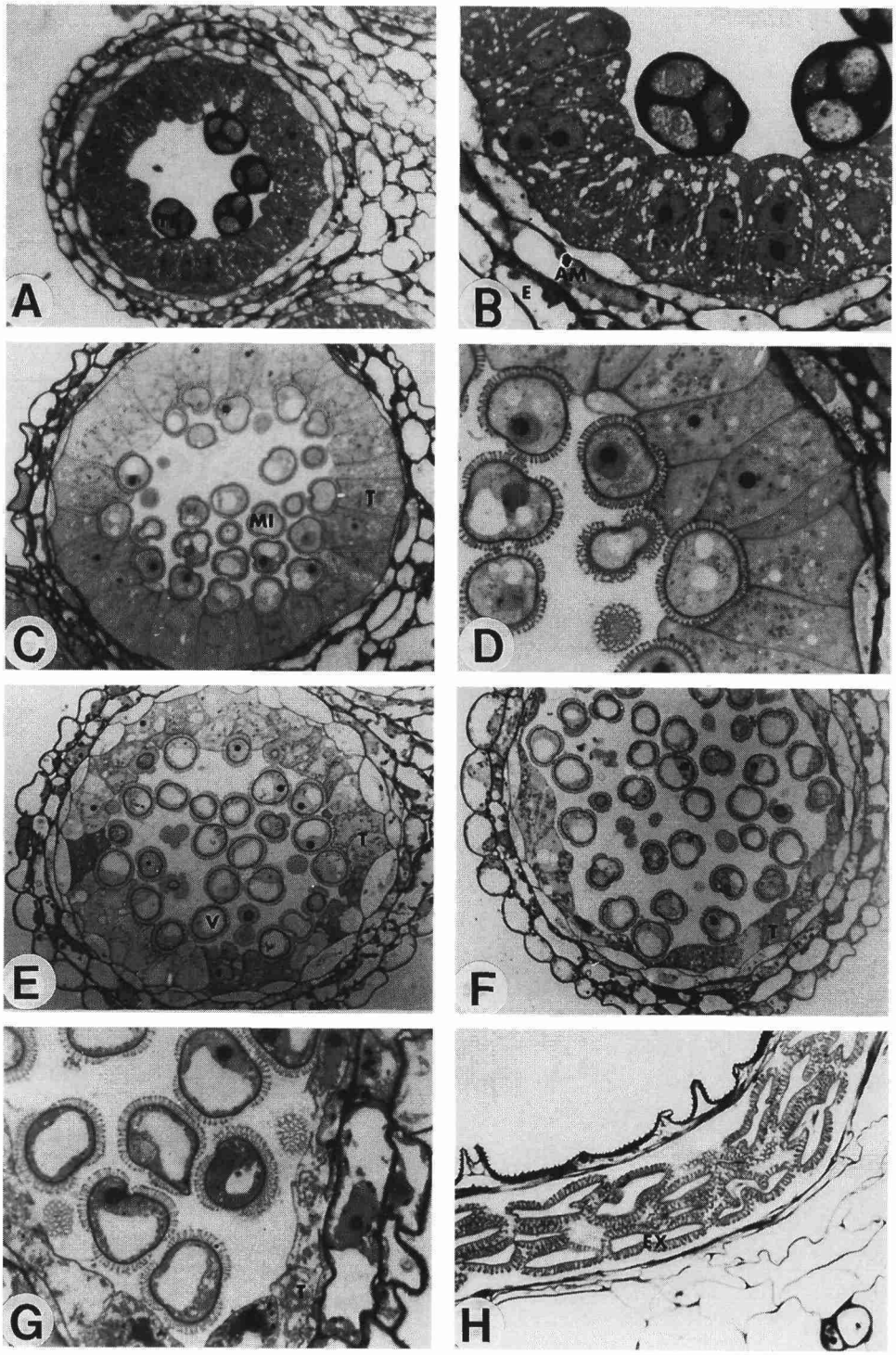
Étude de la stabilité de la stérilité mâle

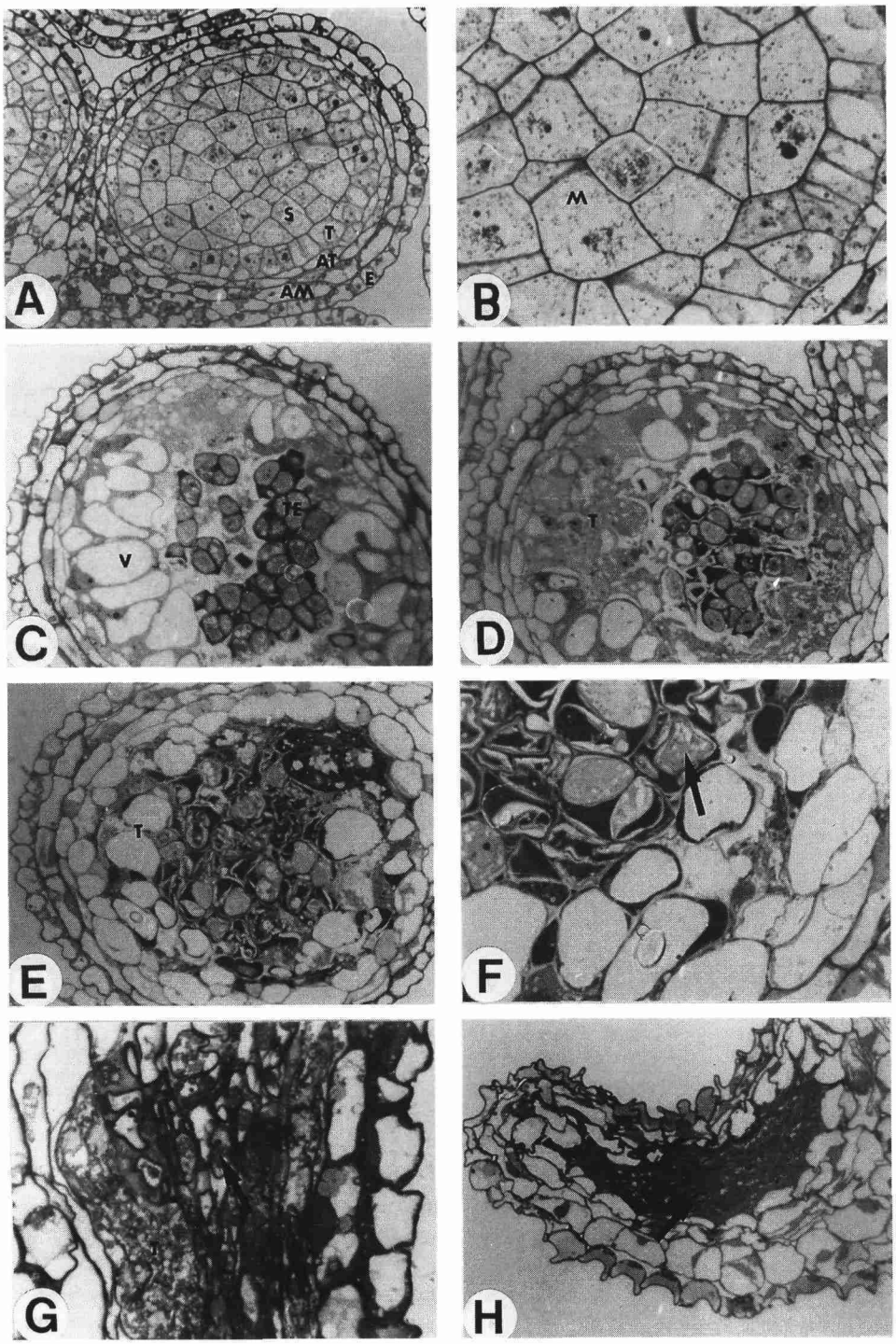
Au cours des précédentes manipulations, une instabilité de la stérilité mâle a été observée pour certains transformants ayant le gène *RNAse T1* et pour quelques génotypes, pour les stérilités mâles découvertes par Schuster et Rakow.

Cette instabilité est liée à une augmentation de la température pour la stérilité *RNAse T1* et à une diminution de la température pour les stérilités de Schuster et de Rakow [4].

Cette instabilité dans les trois cas s'exprime par une élongation du filet des étamines, une déhiscence des anthères, et la présence d'un mélange de 3 types de grains de pollen dans les anthères : des grains d'apparence normale, des grains de petite taille et des exines aplaties. De plus, en cas d'instabilité de la stérilité mâle de Rakow, certaines exines et certains pollens sont recouverts d'un manteau d'aspect granuleux. La coloration Alexander a montré la présence de cytoplasme dans les grains de pollen d'apparence normale.

Figure 1. Microsporogenèse de la stérilité mâle obtenue par transfert de gène. Les coupes observées représentent des coupes transversales de loge pollinique. A : tétrade de microspores (TE) x 370. B : tétrades à côté du tapis ; 3 des 4 microspores sous callose sont visibles ; les cellules tapétales sont binuclées (T) (É : épiderme, AM : assise mécanique) x 930. C : microspores à petites vacuoles (MI) ; les cellules tapétales sont de forme régulière (T) x 370. D : détail de la photo précédente ; les plastes autour du noyau du tapis sont très petits comparés à Drakkar fertile x 930. E : microspores à noyau excentré et à grande vacuole (V) ; les microspores ont pris une forme arrondie ; les cellules tapétales (T) sont de forme irrégulière x 370. F : début de la dégénérescence du contenu des microspores, le tapis a diminué fortement de taille (T) et son contenu commence à dégénérer x 370. G : les micropores commencent à se déformer, la dégénérescence de leur contenu s'accentue ainsi que celle du tapis (T) x 930. H : exines vides aplaties (EX) dans une loge pollinique affaissée, le tapis a totalement disparu ; aucun épaississement n'est visible dans la couche sous-épidermique x 930.


A
B
E
AM
C
MI
T
D
E
V
T
F
T
G
T
H


A
S
T
AI
AM
E
B
M
C
TE
V
D
T
E
T
F
G
H

Discussion

Le gène transféré dans *Brassica napus* conduit à une stérilité mâle qui, de par la morphologie florale, le blocage de la microsporogenèse et l'instabilité de la stérilité mâle chez certains transformants, s'exprime identiquement à des stérilités mâles géniques naturelles.

La réduction du filet des étamines est fréquente chez les plantes de colza mâles-stériles [25], et est certainement corrélée avec l'arrêt de la microsporogenèse. La réduction du filet des étamines et l'indéhiscence des anthères ont été également observées par Gourret *et al.* [11] dans les cybrides de *B. napus*, dans le cas de la stérilité mâle cytoplasmique *ogu*.

L'indéhiscence des anthères chez les 4 stérilités mâles étudiées pourrait être corrélée avec l'absence d'épaississement de lignine de l'assise mécanique, assise qui est impliquée dans la déhiscence des anthères [23].

Dans trois des quatre stérilités mâles étudiées, l'arrêt de la microsporogenèse se produit après la libération des microspores hors de la callose. Cela conduit à une masse d'exines vides aplaties dans les anthères. Cette accumulation d'exines vides a été également observée pour d'autres stérilités mâles de colza telles que chez la CMS Raphanus, les lignées Janpol, NPZ [25] et chez la CMS *ogu* [11]. Pour la stérilité mâle de Takagi, il apparaît que le blocage de la microsposrogenèse se situe plus précocement que dans le cas des trois autres stérilités mâles étudiées. Cet arrêt précoce se traduit par un amas de callose dans les anthères. Une semblable dégénérescence de la microsporogenèse a été observée chez le tournesol par Horner [17].

Il devient évident que les lésions du tapis jouent un rôle important dans l'avortement du pollen [9, 10, 11, 16, 17]. Un rôle trophique a été attribué au tapis [5, 6, 14, 21, 26] ; ce dernier produit nombre de protéines et de substances qui aident au développement du pollen et/ou deviennent des composés de la paroi du pollen [7, 18].

Chez la stérilité mâle obtenue par transfert de gène, l'arrêt de la microsporogenèse est liée à l'activité du gène chimère *TA29-RNAse T1*. L'activité ribonucléasique au sein du tapis perturbe le métabolisme cellulaire dont la synthèse protéique de celui-ci, et engendre, par conséquent, une dégénérescence précoce du tapis. Ce dernier ne peut plus alors jouer son rôle vis-à-vis des microspores, ce qui conduit à leur dégénérescence. Dans ce cas, il est supposé que la dégénérescence du tapis est la cause de la dégénérescence des microspores ; mais il est également possible que, en plus de ce phéno-

Figure 2. Microsporogenèse de la stérilité obtenue par mutagenèse. Les coupes observées représentent des coupes transversales de la loge pollinique. A : massif sporogène (E : épiderme, Am : assise mécanique, AT : assise transitoire, T : tapis, S : cellule sporogène) x 370. B : méiocytes en prophase I (m) x 930. C : tétrades (TE), les tétrades sont de forme irrégulière et le tapis est fortement vacuolisé (V) x 370. D : le tapis (T) de plus en plus important envahit la loge pollinique coinçant au centre les tétrades x 370. E : le contenu des microspores sous callose commence à dégénérer (T : tapis) x 370. F : détail de la photo précédente, la flèche indique le contenu d'une microspore x 930. G : le contenu des microspores sous callose a pratiquement disparu (flèche), le tapis (T) toujours présent commence à dégénérer x 930. H : loge pollinique affaissée avec au centre un amas de callose (flèche), le tapis a disparu, les épaississements de l'assise mécanique ne sont pas visibles x 370.

mène, il y ait transfert de la ribonucléase du tapis dans les microspores accélérant ainsi le processus de dégénérescence de celles-ci.

Une instabilité de la stérilité mâle a été observée pour trois des quatre stérilités mâles géniques. Dans les trois cas, l'instabilité s'exprime morphologiquement de façon identique. L'instabilité a été notée pour des températures élevées dans le cas de la stérilité mâle obtenue par transfert de gène [4]. Fan et Stefansson [8] ont observé que la même instabilité apparaît pour les CMS *nap* et *pol* dans les mêmes conditions de culture. Au contraire, chez les stérilités de Schuster et de Rakow, l'instabilité de la stérilité mâle a été observée à des températures basses (11°-16 °C). Bien que Salako [22] ait calculé une corrélation de 0,85 entre le test de fertilité et la coloration Alexander, la fertilité des pollens produits par les plantes instables devrait être étudiée plus en détail à l'aide d'autres techniques [2, 15] et de croisements.

Dans le cas de la stérilité obtenue par génie génétique, nous sommes incapables à ce jour de savoir sur quelles causes repose l'instabilité ; les facteurs environnementaux influencent-ils l'activité du promoteur ou déstabilisent-ils la ribonucléase ? Il est à noter que l'instabilité a été observée pour certains transformants et qu'il a été possible d'isoler des transformants ayant une stabilité de la stérilité mâle dans toutes les conditions étudiées.

Références

1. Alexander MP (1969). Differential staining of aborted pollen and non-aborted pollen. *Stain Technol* 44 : 117-122.
2. Coleman AW, Goff LJ (1985). Applications of fluorochromes to pollen biology. I. Mithramycin and 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as vital stains and for quantification of nuclear DNA. *Stain Technol* 60 : 146-154.
3. De Block M, Debrouwer D, Tenning P (1989). Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in transgenic plants. *Plant Physiol* 91 : 694-701.
4. Denis M, Delourme R, Gourret J-P, Renard M (1993). Expression of engineered nuclear male sterility in *Brassica napus*. Genetics, morphology, cytology and sensitivity to temperature. *Plant Physiol* 101 : 1295-1304.
5. Dickinson HG (1973). The role of plastids in the formation of pollen grain coatings. *Cytobios* 8 : 25-40.
6. Echlin P (1971). The role of tapetum during microsporogenesis of angiosperms. In : Heslop-Harrison, ed. *Pollen development and physiology*. Butterworths, London : 41-61.
7. Esau K (1977). *Anatomy of Seed Plants*, ed 2. John Wiley, New York.
8. Fan Z, Stefansson BR (1986). Influence of temperature on sterility of two cytoplasmic male sterility systems in rape *(Brassica napus* L.). *Can J Plant Sci* 66 : 221-227.
9. Filion WG, Christie BR (1986). The mechanism of male sterility in a clone of orchardgrass *(Dactylis glomerata* L.). *Crop Sci* 6 : 345-347.
10. Gourret J-P, Pellan-Delourme R, Renard M (1987). Light and microscopic study of radish cytoplasmic male sterility in *Brassica napus*. In : Proceedings of the 7th international Rapeseed conference. Poznan. 192-195.
11. Gourret J-P, Delourme R, Renard M (1992). Expression of *ogu* cytoplasmic male sterility in cybrids of *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 83 : 549-556.
12. Grant I, Beversdorf WD, Peterson RL (1986). A comparative light and electron microscopic study of microspore and tapetal development in male fertile and cytoplasmic male sterile oilseed rape *(Brassica napus)*. *Can J Bot* 64 : 1055-1068.

13. Hayat MA (1978). Introduction to biological scanning electron microscopy. University Park Press, Baltimore.
14. Heslop-Harrison J (1968). Tapetal origin of pollen-coat substances in Lilium. *New Phytol* 67 : 779-789.
15. Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y, Shivana HR (1984). The evaluation of pollen quality and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theor Appl Genet* 67 : 367-375.
16. Horner HT, Rogers MA (1974). A comparative light and electron microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile pepper *(Capsicum annuum). Can J Bot* 52 : 435-441.
17. Horner HT (1977). A comparative light and microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile sunflower *(Helianthus annuus). Am J Bot* 64 : 745-759.
18. Knox RB (1979). Pollen and allergy. Arnold, London.
19. Lynn JA (1965). Rapid toluidine blue staining of embedded and mounted « adjacent » sections. *Am J Clin Pathol* 44 : 57-58.
20. Mariani C, De Beuckeleer M, Truettner J, Leemans J, Goldberg RB (1990). Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347 : 737-741.
21. Mascarenhas JP (1975). The biochemestry of angiosperm pollen development. *Bot Rev* 41 : 259-314.
22. Salako S (1970). La stérilité mâle en sélection. Création d'hybrides. Cas particulier de la féverole. Mémoire de Fin d'Études. École Nationale Supérieure des Sciences Agronomiques Appliquées, Dijon.
23. Souvré A, Albertini L, Audran JC (1987). Le grain de pollen des Angiospermes. Apports de la biopalynologie et perspectives biotechnologiques. *Bull Soc Bot Fr Actual Bot* 1 : 87-112.
24. Takagi Y (1970). Monogenic recessive male sterility in oil rape *(Brassica napus* L.) induced by gamma irradiation. *Z Pflanzenzulecht* 64 : 242-247.
25. Theis R, Robbelen G (1990). Anther and microspores development in different male sterile lines or oilseed rape *(Brassica napus* L.). *Angew Bot* 64 : 419-434.
26. Vasil IK (1967). Physiology and cytology of anther development. *Biol Rev* 42 : 327-373.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 483-489.

50

La stérilité mâle cytoplasmique chez la chicorée industrielle : obtention par fusion de protoplastes et caractérisation moléculaire

C. RAMBAUD, A. BELLAMY, J. VASSEUR

Laboratoire de physiologie cellulaire et morphogenèse végétale, Université des sciences et technologies de Lille, 59655 Villeneuve-d'Ascq, France.

Résumé

Des chicorées mâles-stériles ont été obtenues par fusion de protoplastes de mésophylle de chicorée fertile et de protoplastes d'hypocotyles de tournesol mâle-stérile. Ces plantes mâles-stériles présentent quatre types de morphologie florale. L'analyse du génome mitochondrial de 10 plantes mâles-stériles par hybridation moléculaire avec des sondes spécifiques de ce génome met en évidence qu'il y a eu des recombinaisons mitochondriales entre la chicorée et le tournesol. Ces plantes sont toutes différentes les unes des autres d'un point de vue mitochondrial et l'intensité des réarrangements peut être corrélée avec le degré de stérilité des plantes. L'analyse des descendances montre qu'une stabilisation du génome mitochondrial s'effectue au cours des générations et qu'à la quatrième génération, des fragments spécifiques du tournesol mais aussi de nouveaux fragments qui témoignent de la recombinaison des génomes mitochondriaux sont encore présents.

La stérilité mâle cytoplasmique est un caractère qui s'exprime par une déficience dans le processus de la gamétogenèse mâle, elle aboutit à un avortement des organes reproducteurs mâles. Elle présente un grand intérêt agronomique car elle permet d'éviter la

castration manuelle nécessaire à la création d'hybrides dont les rendements sont très nettement supérieurs à ceux des lignées parentales. Son hérédité est de type maternel, elle permet donc la protection des nouvelles obtentions. Elle peut théoriquement apparaître spontanément dans la nature ou être obtenue par croisements intra- ou interspécifiques, et comme elle résulte d'interactions entre le génome mitochondrial (mt) et le génome nucléaire, il est possible de l'obtenir par fusion de protoplastes.

Chez la chicorée, la stérilité-mâle cytoplasmique n'existe pas et tous les essais de croisements intra- ou interspécifiques qui ont été entrepris jusqu'à présent n'ont jamais abouti (M. Desprez, communication personnelle). Nous avons donc décidé de l'induire en faisant fusionner les protoplastes de chicorée avec ceux d'une autre espèce. Des chicorées mâles-stériles ont été obtenues ; leur caractérisation moléculaire ainsi que l'étude de la transmission de ce caractère dans les descendances ont été entreprises dans le but de déterminer l'origine de cette stérilité-mâle.

Choix d'un partenaire de fusion

Il a fallu choisir un partenaire de fusion qui soit susceptible d'induire la stérilité chez la chicorée. Bien que la stérilité mâle cytoplasmique ne soit pas attribuable à un gène spécifique, nous avons choisi un partenaire de fusion qui possède des lignées mâles-stériles cytoplasmiques. Notre choix a aussi été déterminé par la distance phylogénétique entre les deux espèces à fusionner. Il fallait trouver une espèce qui soit suffisamment proche de la chicorée pour permettre la recombinaison des deux génomes mitochondriaux, mais il fallait aussi que cette espèce soit suffisamment éloignée de la chicorée pour empêcher la fusion des deux noyaux. Nous avons donc choisi le tournesol comme partenaire de fusion. Le tournesol présente un autre avantage ; ses protoplastes sont en effet incapables de régénérer des plantes dans nos conditions de culture.

Optimisation des conditions de régénération des protoplastes de chicorée

Les protoplastes de chicorée sont obtenus à partir de feuilles de jeunes plantules cultivées *in vitro*. Les conditions de culture de ces plantes ont été étudiées dans le but d'optimiser les rendements en divisions des protoplastes, mais aussi les rendements en cals et en plantes régénérées.

Les rendements les meilleurs (6 % de cals après 2 mois de culture) ont été obtenus en cultivant les plantules dans les conditions suivantes :

– photopériode : 16 h de lumière/8 h d'obscurité,

– intensité lumineuse : 150 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, c'est-à-dire le plus près possible de la source lumineuse,

– qualité de la lumière : tubes fluorescents DeLuxe Cool White.

L'âge des plantes est aussi un facteur déterminant ; plus les plantules sont jeunes, meilleurs sont les rendements. Des plantules âgées de 11 à 13 jours sont donc utilisées pour la préparation des protoplastes de chicorée.

La composition des milieux de culture a aussi été étudiée [4] et des conditions optimales ont été déterminées.

Technique de fusion et sélection des hétérocaryons

Nous utilisons une méthode classique de fusion au polyéthylène glycol (PEG) associé à des ions Ca^{2+} ; mais c'est notamment grâce à l'addition de diméthylsulfoxide (DMSO) dans la solution de PEG que les rendements en hétérocaryons obtenus sont de l'ordre de 25 %.

Pour sélectionner les hétérocaryons des protoplastes non fusionnés, les produits de fusion sont prélevés manuellement à l'aide d'une micropipette et cultivés à faible densité, dans des petits puits de culture renfermant 100 µl de milieu de culture modifié [5]. Des cals, puis des plantes ont ainsi pu être régénérés.

Caractérisation des plantes obtenues

Par cette technique, nous avons obtenu environ 600 plantes qui sont toutes des chicorées et parmi lesquelles 16 présentent une stérilité qui s'exprime différemment selon les plantes.

Quatre types de fleurs ont été observés (Figure 1) :

– des fleurs avec des anthères brunes non déhiscentes et qui renferment du pollen non viable, mis en évidence par le test d' Alexander [1],

– des fleurs avec des anthères brunes avortées et qui ne renferment pas de pollen,

– des fleurs sans anthères,

– des fleurs sans anthères et dont les styles sont soit réduits, soit complètement inexistants, ces fleurs sont complètement stériles.

Pour connaître l'origine de ces stérilités, pour savoir si elles sont bien dues à la fusion de protoplastes ou tout simplement à des variations somaclonales mais aussi pour savoir si elles sont d'origine nucléaire ou cytoplasmique, un programme de croisements a été entrepris par les sélectionneurs (Ets Florimond-Desprez) dans le but de connaître le mode de transmission de ce caractère dans les descendances. Parallèlement, la stérilité-mâle cytoplasmique étant attribuable au génome mt, nous avons entrepris une caractérisation moléculaire de ces différentes plantes mâles-stériles obtenues par fusion de protoplastes.

Dans le but de rechercher du polymorphisme dans les fragments de restriction de l'ADN mt, nous avons réalisé des hybridations moléculaires avec 6 sondes spécifiques de ce génome (*coxI, coxII, coxIII, atpA, atp6* et *cob*). L'analyse a été faite sur de l'ADN total de chicorée fertile, de tournesol mâle-stérile et de 10 plantes obtenues par fusion de protoplastes. Divers résultats ont été obtenus : lorsque l'on hybride avec le gène *coxI*, on n'observe aucune différence entre la chicorée fertile et les chicorées mâles-stériles quelle que soit l'enzyme utilisée. Les résultats sont totalement différents lorsque l'on hybride avec les 5 autres sondes. Les couples d'enzyme/sonde *Eco*RI/*coxII* et *Bam*HI/*atp6* permettent de résumer la situation [6].

Il ressort de cette analyse que ces 10 chicorées mâles-stériles obtenues par fusion de protoplastes sont toutes différentes les unes des autres et sont différentes de la chicorée fertile d'un point de vue ADN mt. Chez les plantes mâles-stériles, des fragments d'ADN mt spécifiques du tournesol sont présents, ce qui prouve que ces plantes sont bien issues de la fusion des protoplastes de tournesol et de chicorée. L'ADN mt de ces plantes est également caractérisé par la présence de nouveaux fragments d'ADN qui ne

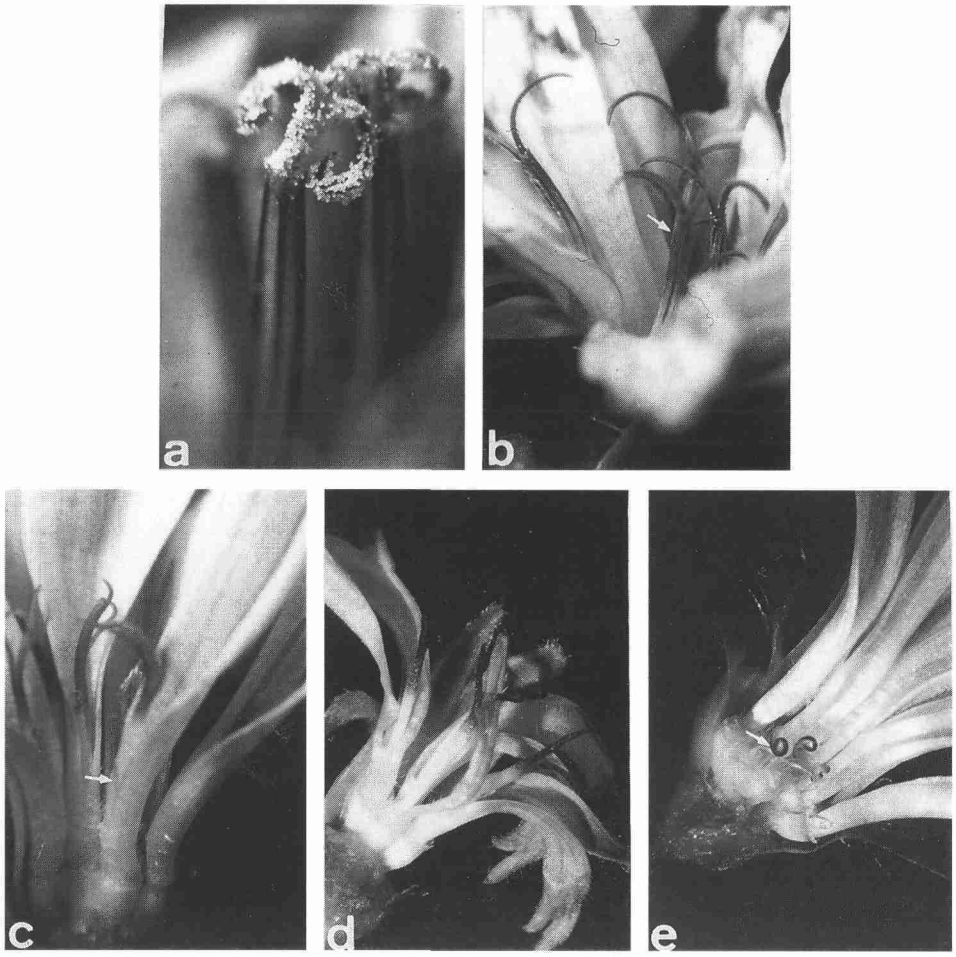


Figure 1. Différents types de fleurs observés chez les plantes obtenues par fusion de protoplastes. a. fleur fertile ; b. fleurs mâles-stériles avec anthères non déhiscentes renfermant du pollen non viable ; c. fleurs mâles-stériles avec anthères brunes sans pollen ; d. fleurs mâles-stériles sans anthères ; e. fleurs stériles avec styles avortés et sans anthères.

sont présents ni chez la chicorée fertile, ni chez le tournesol et qui témoignent de la recombinaison des 2 génomes mitochondriaux du tournesol et de la chicorée fertile. Cette analyse a aussi permis de montrer qu'il existe une relation entre la vigueur des plantes et l'intensité des recombinaisons : plus les recombinaisons sont importantes (c'est-à-dire perte de fragments spécifiques de la chicorée fertile) moins les plantes sont vigoureuses.

L'analyse des croisements entrepris par les sélectionneurs a permis de confirmer que l'origine du caractère de stérilité-mâle était bien cytoplasmique. Elle a été faite plus particulièrement sur une plante ; parmi les 16 qui ont été obtenues par fusion de protoplastes, cette plante est la plus vigoureuse et elle a l'avantage de présenter une stérilité-mâle de type « sans anthères ». Cela est un avantage pour les sélectionneurs qui ne doivent pas faire de test de viabilité pour confirmer la stérilité des plantes. Cette plante a été croisée avec divers pollinisateurs.

En première génération, une descendance très hétérogène d'un point de vue phénotypique a été observée (Tableau I). Sur 373 plantes, on a dénombré 21,7 % de plantes fertiles, 64,6 % de plantes mâles-stériles mais présentant 2 types de morphologies florales : « avec anthères brunes » ou « sans anthères » et aussi 13,7 % de plantes complètement stériles. Dans les générations suivantes, les différents types de morphologie florale ont été retrouvés mais dans des proportions différentes : en troisième génération, sur 2 695 plantes observées, la proportion des plantes fertiles n'est plus que de 2,2 %, et la majorité des plantes (52,8 %) présente une stérilité-mâle de type « sans anthères ». Ces résultats vont dans le sens d'une stabilisation du caractère mâle-stérile.

Tableau I. Répartition des différents types de morphologie florale dans les plantes de 1re, 2e et 3e générations issues d'une chicorée mâle-stérile obtenue par fusion de protoplastes (plante n° 6).

	Fleurs fertiles	**Fleurs mâles-stériles avec anthères brunes**	**Fleurs mâles-stériles sans anthères**	**Fleurs stériles**
1re génération 373 plantes	21,7 %	34 %	30,6 %	13,7 %
2e génération 5 689 plantes	4,3 %	36 %	44,4 %	15,3 %
3e génération 2 695 plantes	2,2 %	36,3 %	52,8 %	8,7 %

Analyse RFLP des descendances

Dans le but de confirmer la stabilisation du caractère mâle-stérile dans les descendances, une analyse RFLP a été entreprise sur ces plantes. Une première étude (Figure 2) a été faite sur des plantes prélevées au hasard dans les deuxième et troisième générations et en les comparant à la plante mère obtenue par fusion de protoplastes et maintenue par culture *in vitro*.

Dans la première analyse effectuée sur 10 produits de fusion mâles-stériles, le gène *cob* s'hybridait avec 5 fragments *Bam*HI chez la plante n° 6 (Figure 2). Une nouvelle

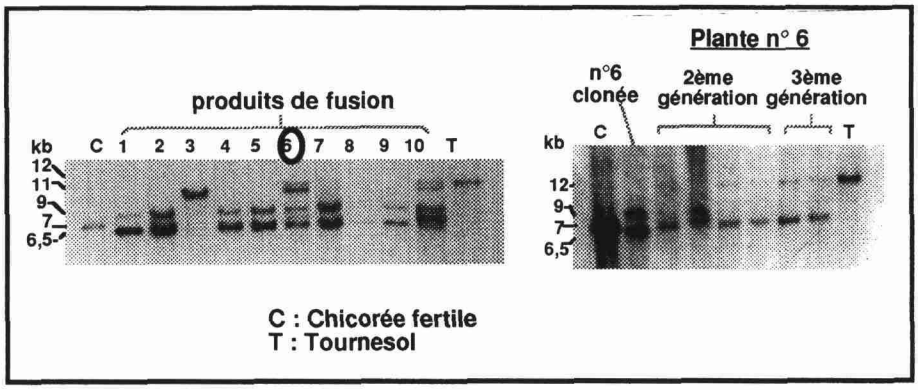


Figure 2. Analyse des descendances par RFLP. ADN total digéré par *Bam*HI et hybridé avec le gène *cob*.

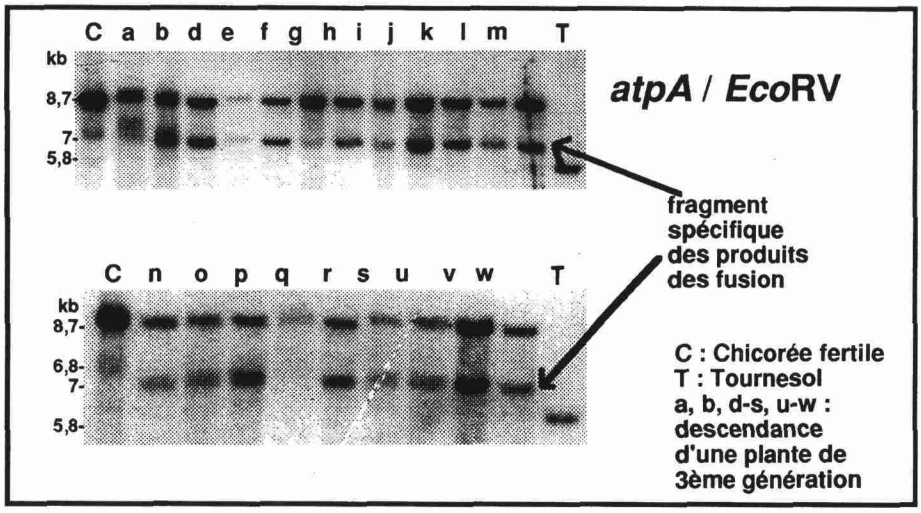


Figure 3. Analyse de la descendance d'une plante mâle-stérile de 3e génération. ADN total digéré par *Eco*RV et hybridé avec le gène *atpA*.

analyse entreprise chez cette plante a mis en évidence que le maintien du clone de cette plante pendant 3 ans en culture *in vitro* a été accompagné de remaniements du génome mt puisque le gène cob ne s'hybride plus qu'avec 2 fragments *Bam*HI. Des réarrangements se sont aussi effectués au cours des générations ; on observait de la variabilité en 2e génération, mais en 3e génération le génome mt avait tendance à se stabiliser.

Le nombre de plantes étudiées dans cette analyse étant trop faible pour en tirer des conclusions quant à la stabilité du génome mt, nous avons entrepris d'analyser la descendance d'une seule plante de 3e génération. Les premiers résultats vont dans le sens d'une stabilisation du génome. Deux constatations importantes émergent de cette analy-

se : les plantes mâles-stériles de 4e génération ont conservé des fragments d'ADN mt spécifiques du tournesol et elles ont aussi conservé des séquences d'ADN qui leur sont propres et qui sont spécifiques de la recombinaison. C'est le cas d'une région du génome mt renfermant le gène atpA (Figure 3).

L'hybridation moléculaire des plantes de 4e génération avec le gène *atpA* met en évidence une zone de recombinaison située dans la région du gène *atpA* et caractérisée par un fragment EcoRV de 7 kb (Figure 3). Cette zone de recombinaison est présente chez toutes les plantes de 4e génération que nous avons analysées, ce qui confirme la stabilisation du génome mt.

Conclusion

Des chicorées mâles-stériles ont donc été créées par fusion de protoplastes. L'origine de ce caractère est cytoplasmique comme l'ont prouvé les analyses des descendances et les hybridations moléculaires. L'état actuel de nos recherches ne nous permet pas de déterminer si le gène responsable de ce caractère est le même que celui qui a été mis en évidence chez le tournesol [2, 3] ou si un nouveau gène chimérique a été créé par recombinaison des génomes mitochondriaux.

L'acquisition de ce caractère chez cette espèce représente un gain important pour la production de lots de semences avec des taux d'hybridité optimaux.

Références

1. Alexander MP (1969). Differential staining of aborted and non-aborted pollen. *Stain Tech* 41 : 117-122.
2. Köhler RH, Horn R, Lösll A, Zetsche K (1991). Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the cotranscription of a new open reading frame with the *atpA* gene. *Mol Gen Genet* 227 : 369-376.
3. Laver HK, Reynolds SJ, Moneger F, Leaver CJ (1991). Mt genome organization and expression associated with cytoplasmic male sterility in sunflower *(Helianthus annuus). Plant J* 1(2) : 185-193.
4. Rambaud C, Dubois J, Vasseur J (1990). Some factors related to protoplast culture and plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of Magdeburg chicory *(Cichorium intybus* L. var. Magdeburg) *Agronomie* 10 : 767-772.
5. Rambaud C, Dubois J, Vasseur J (1992). The induction of tetraploidy in Chicory *(Cichorium intybus* L. var. Magdebourg) by protoplast fusion. *Euphytica* 62 : 63-67.
6. Rambaud C, Dubois J, Vasseur J (1993). Male-sterile chicory cybrids obtained by intergeneric protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 87 : 347-352.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 491-500.

51

Application de la technique biolistique pour la transformation génétique du froment

F. DELPORTE, J.-M. JACQUEMIN

Centre de Recherches Agronomiques, Station d'Amélioration des Plantes, 4, rue du Bordia, B-5030 Gembloux, Belgique.

Résumé

*L'utilisation du canon à particules représente une méthode supplémentaire de transformation génétique des espèces végétales. Au sein des céréales, le système de transformation exploitant les propriétés naturelles d'*Agrobacterium tumefaciens *est inopérant. Dans le cas précis du blé, la technique dite biolistique, en offrant la possibilité de délivrer de l'ADN dans des amas cellulaires, permet de contourner la difficulté à régénérer une plante fertile au départ d'une cellule unique, pré-requis aux méthodes de transfert direct d'ADN dans des protoplastes (électroporation, traitement au polyéthylène glycol, choc osmotique ou microinjection).*

Nous appliquons cette technologie en vue de l'obtention de transformants stables de blé. A cet effet, des embryons immatures ainsi que des agrégats cellulaires d'embryons matures sont utilisés comme cibles en vue de générer des plantules par voie d'embryogenèse, embryogenèse somatique ou organogenèse.

De plus, dans le souci d'accroître l'efficacité de la méthode de transformation, nous testons l'effet de la juxtaposition d'une séquence d'ADN génomique de froment à un gène marqueur.

Le présent travail s'inscrit dans la volonté d'offrir à la sélection classique l'opportunité d'insérer un ou plusieurs gènes dans le génome de variétés existantes, de concevoir un outil supplémentaire permettant de créer des cultivars qui ne pourraient pas être obtenus par les méthodes traditionnelles de croisement.

Le succès de la 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 la transformation (Tableau I). Cette dernière repose sur des analyses moléculaires prouvant l'insertion des séquences exogènes au sein du génome nucléaire, des tests biochimiques démontrant la présence des protéines correspondantes et leur activité éventuelle, ainsi que sur la vérification de la ségrégation du caractère selon le schéma attendu.

Tableau I. Principe de la transformation génétique des végétaux.

Vecteur de transformation	**Matériel régénéré**
A. tumefaciens	Protoplastes
(spectre plante-hôtes réduit)	Cellules
	agrégats cellulaires
Transfert direct ADN nu	tissus
(fréq. de transformants stables faible)	organe
Électroporation	
PEG, cations divalents (Ca, Mg)	
Liposomes	
polycations	
microinjection	
canon à particules	

↓

Sélection des transformants

↓

Validation du phénomène de transformation

Le choix de cette combinaison idéale pour les monocotylées en général, et les céréales en particulier, reste très ardu. Le vecteur de transformation le plus communément employé, *Agrobacterium tumefaciens,* présente un spectre de plantes-hôtes qui se réduit presque exclusivement aux dicotylées. Cette bactérie du sol peut transformer génétiquement les cellules des plantes qu'elle infecte par transfert dans le génome nucléaire de celles-ci d'un fragment de son propre matériel génétique : le T-DNA. Selon l'hypothèse de Potrikus [22], le succès de l'utilisation de ce vecteur repose sur la faculté de réponse à la blessure des cellules-hôtes, inexistante chez les plantes monocotylées. Quoique l'on ait signalé la transformation du riz [23] et celle du maïs [11] par l'emploi d'*Agrobacterium tumefaciens*, ce dernier est généralement peu efficace chez les céréales.

Devant l'incapacité d'exploiter les propriétés naturelles d'*A. tumefaciens*, et suite au développement de la biologie cellulaire et des techniques de régénération de plantes, on a développé des méthodes de transfert direct d'ADN. Ces méthodes requièrent une technologie qui permette le passage de l'ADN au travers des structures cellulaires : au travers du plasmalemme dans le cas de protoplastes, au travers du plasmalemme et de la paroi cellulaire dans le cas de cellules, d'agrégats cellulaires ou de tissus. Cela est possible par le traitement des cellules par des voies chimiques, électriques ou physiques.

Parmi les trois céréales majeures (riz, maïs, froment) qui couvrent presque la moitié de l'alimentation mondiale, les méthodes conduisant de manière reproductible à l'obtention de plantes transgéniques sont, comme le résume le Tableau II, celles qui appliquent une méthode de transfert direct d'ADN :

– transfert direct d'ADN dans des protoplastes par la production d'un choc osmotique ou électrique dans le cas du riz, et régénération subséquente de plantules au départ des protoplastes transformés ;

– transfert direct d'ADN dans des cellules intactes dans le cas du maïs, du riz et tout récemment dans le cas du blé également, au moyen du canon à particules.

La technique dite biolistique est une méthode physique de transfert direct d'ADN qui utilise des microprojectiles métalliques enrobés d'ADN. Ceux-ci sont soumis à une grande vélocité en direction des tissus ou des cellules isolées choisis comme cible pour y délivrer l'information génétique dont ils sont porteurs. Depuis que le concept en a été décrit par Sanford [24], cette méthode a démontré son efficacité pour réaliser l'introduction d'ADN dans un matériel biologique très varié appartenant tant aux procaryotes qu'aux eucaryotes, qu'il s'agisse de cellules bactériennes [25], de levures [2], de champignons [6], de cellules animales [16, 30, 3] ou végétales [4]. De même, le type d'explant manipulé peut être très diversifié : cellule unique, agrégat cellulaire indifférencié ou tissu organisé, organe.

Dans le domaine de la transformation génétique des végétaux, depuis le premier rapport décrivant l'observation de l'expression transitoire d'informations génétiques étrangères dans les cellules épidermiques d'oignon [17], l'intérêt du bombardement de particules est clairement établi pour délivrer l'ADN dans des espèces végétales d'intérêt agronomique récalcitrantes aux techniques classiques. Dans le cas précis du blé, l'avantage réside dans la possibilité d'introduire l'ADN dans des amas cellulaires, nous

Tableau II. Résumé des méthodes permettant l'obtention de manière reproductible de céréales transgéniques.

Vecteur de transformation	Riz	Maïs	Blé
A. tumefaciens	[23]	[11]	
Transfert direct dans des protoplastes			
Choc osmotique (PEG)	[7] [13]		
Choc électrique	[26-28, 31]		
Transfert direct dans des cellules au moyen du canon à particules			
Suspensions cellulaires		[9] [10]	
Cals embryogènes			[29]
Scutellum d'embryons immatures	[5]		

permettant de contourner la difficulté à régénérer une plante fertile au départ d'une cellule unique. Vasil [29] décrit pour la première fois l'obtention de blés transgéniques en faisant appel à cette méthode : l'auteur utilise comme cible des cals embryogéniques desquels il induit la formation, et ensuite la germination, d'embryons somatiques.

Matériel et méthode

La technique biolistique

Dans l'appareillage qui nous permet de contrôler les caractéristiques balistiques de cette méthode, l'accélération des projectiles est produite par la détente d'un gaz (hélium).

Le dispositif est muni (Figure 1) :

– d'une chambre à dépression ;

– dans laquelle est introduit un tube d'accélération, connecté à une bonbonne d'alimentation en hélium comprimé ;

– celui-ci déclenche, pour une valeur déterminée de la pression, la rupture d'une membrane (disque de rupture) ;

– la vélocité des particules est acquise suite à la propulsion d'un support (macrocarrier) ;

– le macrocarrier portant à sa face inférieure les particules métalliques sur lesquelles est précipité l'ADN est brutalement arrêté dans sa course par une plaque d'arrêt, tandis que les microprojectiles poursuivent leur trajectoire avec une vitesse qui est déterminée par : leur masse, l'impulsion initiale, elle-même fonction de la pression de rupture, et enfin, les positions relatives du macrocarrier et de la plaque d'arrêt par rapport à l'échantillon.

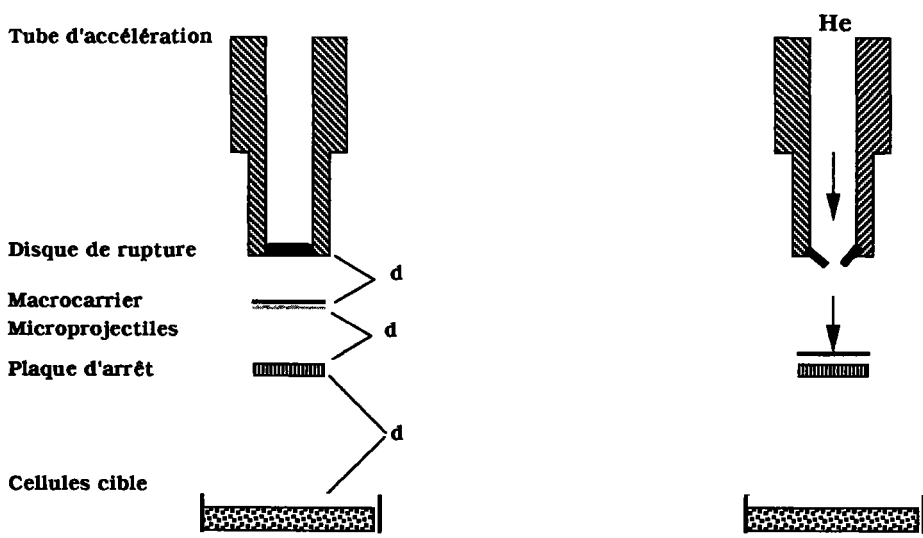


Figure 1. Schéma du canon à particules.

Construction plasmidique

La construction utilisée porte, comme gène marqueur sélectionnable, le gène *bar,* isolé en premier lieu à partir du champignon *Streptomyces hygroscopicus* [8], codant pour la phosphinotricine acétyle transférase (PAT), inséré dans le plasmide pUC (Figure 2). L'enzyme PAT catalyse la réaction de détoxication par acétylation de la phosphinotricine (PPT), matière active constitutive de l'herbicide Basta. A ce marqueur nous avons associé le gène bactérien *gus* [15], codant pour l'enzyme ß-glucuronidase, comme gène rapporteur.

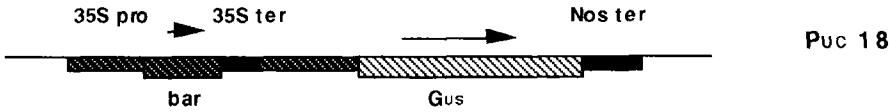


Figure 2. Construction plasmidique 1.

Méthodologie de travail

Des embryons zygotiques immatures et des agrégats cellulaires d'embryons matures sont utilisés comme tissus-cibles en vue de générer des plantules par voie d'embryogenèse, d'embryogenèse somatique ou d'organogenèse.

L'utilisation du canon à particule est couplée à l'un de ces trois modes de régénération (Tableau III), dans le souci de définir la meilleure combinaison, c'est-à-dire celle qui conduira à l'obtention du plus grand nombre de candidats transformés, tout en induisant le moins de mutations. On sait en effet que les processus de dédifférenciation et de régénération occasionnent des dommages génétiques. Ce dernier aspect sera contrôlé par le dénombrement chromosomique dans les cellules méristématiques des extrémités de jeunes racines bloquées en métaphase par du α-bromonaphtalène et colorées au réactif de Schiff et au carmin acétique [14].

Selon l'option de la régénération par embryogenèse somatique, des agrégats cellulaires d'embryons matures sont obtenus par extrusion de ces derniers au travers d'un fin tamis en nylon en conditions aseptiques. Les explants sont mis en culture pour induire la formation d'embryons somatiques en présence d'auxine et leur germination

Tableau III. Schéma de la méthodologie de travail.

Vecteur de transformation	Méthode de régénération
Canon à particules [24]	Embryogènese Embryogènese somatique Organogenèse

↓

Taux des transformants

↓

Stabilité génotypique

en présence de cytokinines. Ces phases de culture successives sont effectuées sous la pression de sélection du sel d'ammonium de la PPT, dont la concentration est graduellement accrue de 1 à 5, 10, 20 et finalement 40 mg/l.

Dans le cas de la régénération par embryogenèse et organogenèse, les tissus méristématiques d'embryons immatures et les agrégats cellulaires d'embryons matures respectivement sont traités pour la transformation, puis mis en culture en présence de cytokinines pour la régénération immédiate d'une jeune plantule, sans le passage par une phase cal indifférencié. Les plantules sont initiées sur un milieu de culture dépourvu de toute pression de sélection pendant 5 à 20 jours, cette étape correspondant à une période de remise en condition de division cellulaire comme suggéré par Christou [5]. La culture de ces tissus est ensuite effectuée sous la pression de sélection de la même matière active dont la concentration est graduellement accrue de 1 à 5 et 10 mg/l.

Les plantules initiées en boîte de Pétri sont transférées en tube pendant la phase de sélection, repiquées ensuite en terrine de tourbe pour leur acclimatation, et enfin transplantées en pot pour la croissance.

Le Tableau IV décrit les conditions de culture utilisées pour chacun des procédés de régénération.

De plus, dans le souci d'accroître l'efficacité de la méthode de transformation, nous testons l'effet de la juxtaposition d'une séquence d'ADN génomique de blé à un gène marqueur. Dans ce dernier cas, la construction utilisée porte le gène marqueur sélectionnable *nptII* codant pour la néomycine phosphotransférase (NPT) jouxtant ou non des séquences d'ADN génomique de blé (W1, W5, W10, W11) [1]. Celles-ci sont fonctionnelles en tant qu'origines de réplication chez la levure et sont généralement des séquences hautement répétées dans le génome du froment. Elles pourraient accroître l'efficacité de la transformation, soit par le maintien de la construction dans la cellule-hôte, soit en favorisant l'intégration des séquences adjacentes dans le génome-hôte par recombinaison homologue.

Tableau IV. Tableau récapitulatif des conditions de culture et pressions de sélection appliquées pour chacun des procédés de régénération.

	Procédés de régénération		
	Embryogenèse somatique	**Embryogenèse**	**Organogenèse**
Tissu d'origine	embryon mature	embryon immature	embryon mature
Explant traité	agrégats cellulaires	embryon	agrégats cellulaires
Millieux et hormones de croissance	induction : (1) 2,4 D 10^{-5} germination : (2) IAA 10^{-6} Zeatine 10^{-6}	régénération : (1) IAA 10^{-6}	régénération : (2) IAA 10^{-6} Zeatine 10^{-6}
Pression de sélection PPT-glufosinate NH_4	40 mg/l	5-10 mg/l	5-10 mg/l

(1) : [21]
(2) : [20]

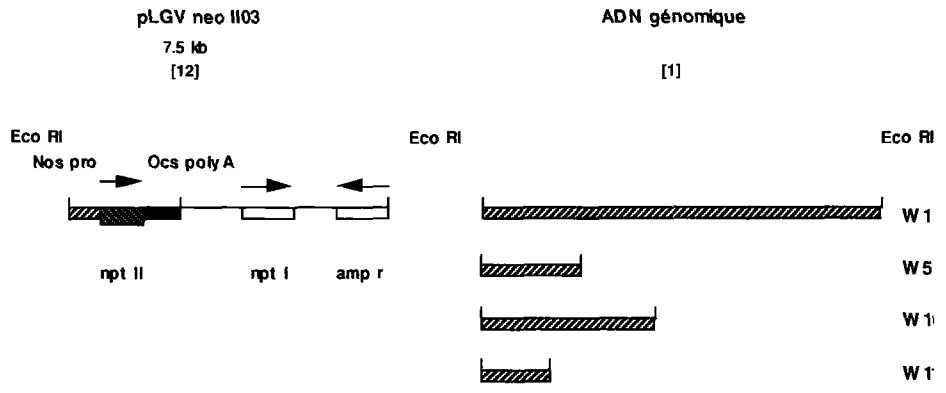


Figure 3. Construction plasmidique 2.

Des agrégats cellulaires d'embryons matures bombardés avec cette construction sont l'objet d'une pression de sélection en présence de l'antibiotique kanamycine à des concentrations graduellement accrues de 50 à 100 et 150 mg/l.

Résultats

Selon la régénération par embryogenèse somatique, des plantes ont été obtenues lors des essais préliminaires d'induction et de germination d'embryons somatiques, en l'absence de toute manipulation génétique et de sélection : 0,7 % des explants ont conduit à une plante enracinée fertile. Les graines récoltées seront mises à germer afin d'effectuer le comptage chromosomique. Après le traitement de transformation, nous avons obtenu de nombreux cals résistant à la pression de sélection finale de 40 mg/l de PPT depuis plusieurs mois. Cependant, aucune plantule n'a encore pu être générée au départ de ces cals. L'essai est à reproduire en réduisant la période de sélection afin de préserver la compétence à la régénération de ces tissus.

Dans le cas de la régénération par embryogenèse, 118 plantes enracinées ont été obtenues au départ de 2 757 embryons immatures bombardés et sélectionnés : 4,2 % des embryons ont donné naissance à une plantule qui a résisté aux différentes phases de sélection, d'enracinement et d'acclimatation. Ce taux est supérieur à celui obtenu dans le cas des témoins non bombardés mais soumis à la même pression de sélection.

L'activité enzymatique de la ß-glucuronidase a été observée de manière transitoire dans des cals produits selon le mode de régénération par embryogenèse somatique et dans les feuilles de plantes générées par embryogenèse, 15 jours après le traitement de transformation.

Selon la régénération par organogenèse, 11 % des explants conduisent à une plante enracinée. Deux plantes résistantes à la pression de sélection ont été obtenues par ce procédé.

Discussion

Il est à noter que la nature du système de régénération influence l'ampleur des phénomènes de variation génotypique et détermine également le degré de chimère qui sera observé dans les candidats à la transformation.

Le procédé de régénération par embryogenèse somatique donne l'avantage d'espérer observer la croissance préférentielle des cellules modifiées avant l'induction de l'embryogenèse, et ainsi, la régénération de plantules au départ d'un matériel non chimérique. Cependant, la durée de culture qu'il suppose est relativement longue et peut produire un effet négatif sur la compétence à la régénération et la stabilité génotypique. De plus, on a montré dans d'autres systèmes que toutes les plantes générées au départ de tissus embryogéniques sélectionnés ne sont pas nécessairement transformées : il semble que, lorsque des cellules transformées sont capables de détoxifier l'agent de sélection, les tissus adjacents non transformés bénéficiant de cette capacité survivent et donnent naissance également à une plantule. Pour la même raison, on n'est pas à l'abri de générer des plantes chimériques [5].

Selon les méthodologies de travail impliquant la régénération par embryogenèse et par organogenèse, on peut s'attendre à un degré de chimérisme élevé. On sait par les travaux de Christou et McCabbe chez le soja [19] et de McCabbé chez le coton [18] qu'il est possible d'obtenir des plantes transgéniques par voie d'organogenèse, suite au bombardement de tissus méristématiques. Un très grand nombre de plantes sont chimériques, néanmoins quelques plantes clonales ont été obtenues. La fréquence de transformation de la lignée germinale de ces plantes chimériques est relativement faible, la transmission du caractère se fait de manière non mendélienne de RO à R1, cependant, l'analyse de R2 indique une héritabilité conforme aux lois de Mendel [4].

Conclusion

L'utilisation du canon à particules est une méthode physique de transfert direct d'ADN qui représente une approche supplémentaire pour réaliser la transformation génétique d'espèces végétales d'intérêt agronomique récalcitrantes aux autres techniques. Le type d'explant manipulé peut être très diversifié.

Trois méthodes de régénération sont couplées à cette méthode afin de définir la combinaison qui conduise à l'obtention du plus grand nombre de transformants tout en réduisant au minimum les problèmes de variations génétiques inhérents aux conditions de culture.

La vérification de l'intégration des séquences exogènes dans le génome nucléaire par la méthode Southern et l'analyse de l'expression du caractère ainsi que de son héritabilité mendélienne seront suivies du comptage chromosomique dans les cellules méristématiques racinaires afin d'apprécier l'impact des différentes méthodes de régénération sur la stabilité chromosomique.

Références

1. André D, Jacquemin JM, Masson P (1983). Isolation and characterization of DNA sequences from *Triticum aestivum* which function as origin of replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Cell Rep* 2 : 175-178.
2. Armaleo D, Ye Gn, Klein TM, Shark KB, Sanford JC, Johnston SA (1990). Biolistic nuclear transformation of *Sacharomyces cerevisiae* and other fungi. *Curr Genet* 17 : 97-103.
3. Baldarelli RM, Lengyl JA (1990). Transient expression of DNA after ballistic introduction into *Drosophila* embryos. *Nucleic Acid Res* 18 : 5903-5904.
4. Christou P (1992). Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *Plant J* 2(3) : 275-281.
5. Christou P, Ford TL, Kofron M (1991). Production of transgenic rice *(Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature Zygotic embryos. *Bio/Technology* 9 : 957-962.
6. Cummings DJ, Domenico JM, Sandford JC (1990). Mitochondrial DNA from *Podospora anserina :* transformation to senescence via projectile injection of plasmids. *Mol Biol Aging* 123 : 91-101.
7. Datta SK, Peterhans A, Datta K, Potrykus I (1990). Genetically engineered fertile indica rice recovered from protoplasts. *Bio/Technology* 8 : 736-740.
8. De Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gossele V, Movva NR, Thompson C, Van Montagu M, Leemans J (1987). Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J* 6 : 2515-2518.
9. Fromm ME, Morrish F, Armstrong C, Williams R, Thomas J, Klein TM (1990). Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Technology* 8 : 833-839.
10. Gordon-Kamm WJ, Spencer TM, Mangano ML, Chambers SA, Adams TR, Daines RJ, Start WG, O'Brien JV, Chambers SA, Adams WR, Willets NG, Rice TB, Mackey CJ, Kruger RW, Kausch A.P, Lemaux PG (1990). Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2 : 603-618.
11. Gould J, Devey M, Hasegawa O, Ulian EC, Peterson G, Smith RH (1991). Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiol* 95 : 426-434.
12. Hain R, Stabel P, Czernilofsky AP, Steinbib HH, Herrera-Estrella L, Schell J (1985). Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimaeric gene by plant protoplasts. *Mol Gen Genet* 199 : 161-168.
13. Hayashimoto A, Li Z, Murai N (1990). A PEG-mediated transformation system for production of fertile transgenic rice plants. *Plant Physiol* 93 : 857-863.
14. Jahier J, Chèvre F, Delourme R, Eber F, Tanguy AM (1992). In : Jahier J, ed. *Techniques de cytogénétique végétale*. NRA Éditions.
15. Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. (1987). GUS fusion : β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6 : 3901-3907.
16. Johnston SA, Riedy M, De Vit MJ, Sanford JC, McElligott S, Williams RS. (1991). Biolistic transformation of animal tissue. *In Vitro Cell Dev Biol* 27 : 11-14.
17. Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC (1987). High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327 : 70-73.
18. McCabe DE, Martinell BJ (1993). Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. *Bio/Technology* 11 : 596-598.
19. McCabe DE, Swain WF, Martinell BJ, Christou P (1988). Stable transformation of soyabean *(Glycin max)* by particle acceleration. *Bio/Technology* 6 : 923-926.
20. Ozias-Akins P, Vasil IK (1982). Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat) : evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma* 110 : 95-105.

21. Picard E, De Buyser J (1977). High production of embryoids in anther culture of pollen derived homozygous spring wheats. *Ann Amelior Plantes* 27 (4) 483-488.
22. Potrykus I. 1990). Gene transfer to cereals : an assessment. *Bio/Technology* 8 : 535-542.
23. Raineri DM, Bottino P, Gordon MP, Nester EW (1990). *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oriza sativa* L.). *Bio/Technology* 8 : 33-38.
24. Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J Part Sci Tech* 6 : 559-563.
25. Shark KB, Smith FD, Harpending PR, Rasmussen JL, Sanford JC (1991). Biolistic transportation of a prokariote *Bacillius megaterium. Appl Environ Microbiol* 57 : 480-485.
26. Shimamoto K, Terada R, Izawa T, Fujimoto H (1989). Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338 : 274-276.
27. Tada Y, Sakamoto M, Fujimura T (1990). Efficient gene introduction into rice by electroporation and analysis of transgenic plants : use of electroporation buffer lacking chloride ions. *Theor Appl Genet* 80 : 475-480.
28. Toriyama K, Arimoto Y, Uchimiya H, Hinata K (1988). Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *Bio/Technology* 6 : 1072-1074.
29. Vasil V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK (1992). Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology* 10 : 667-674.
30. Zelenin AV, Alimov AA, Barmintzev VA, Beniumov AO, Zelenina IA, Krasnov AM, Kolesnikov VA (1991). The delivery of foreign genes into fertilized fish eggs using high velocity microprojectiles. *FEBS Lett* 287 : 118-120.
31. Zhang W, Wu R (1988). Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. *Theor Appl Genet* 76 : 835-840.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 501-505.

52

Des plants de vignes transgéniques obtenus par embryogenèse somatique

M.-C. MAURO, S. TOUTAIN, A. DELOIRE

Moët et Chandon, 20, avenue de Champagne, BP 140, 51333 Epernay, France.

La vigne est une des cultures fruitières la plus largement cultivée dans le monde, mais aussi l'une des cultures la plus chimiquement traitée.

Dans le cas du virus du court-noué (*grapevine fanleaf virus* (GFLV)) par exemple, les méthodes utilisées actuellement, comme la sélection sanitaire, la désinfection des sols ou la thermothérapie, ont parfois une efficacité limitée. Dans tous les cas, la recontamination ne peut être évitée.

De plus, les produits nématicides utilisés pour lutter contre le nématode vecteur du virus présentent des risques importants de pollution des eaux souterraines, et leur utilisation est déjà interdite dans plusieurs pays viticoles.

Plusieurs voies de recherche sont actuellement à l'étude pour lutter contre cette maladie virale. Parmi les plus récentes : la prémunition et l'introduction de gènes de résistance dans le génome de la vigne. C'est cette dernière voie biotechnologique que le laboratoire de Moet & Chandon a choisi de développer.

Des publications récentes rapportent la possibilité de transformer génétiquement des cellules, des embryons ou des bourgeons de vigne [1, 3, 6], plus rarement d'obtenir la régénération des plantes transformées [7, 8].

Dans cet article, nous décrivons le système de régénération de la vigne qui nous a permis de mettre au point une technique de transformation génétique reproductible et applicable à deux porte-greffes, le 41B et le SO4, ainsi qu'à un cépage, le Chardonnay. L'obtention de plants de vigne transformés avec les gènes GUS et NPTII pour ces trois génotypes est ici mise en évidence.

Résultats

La technique d'embryogenèse somatique

La technique d'embryogenèse somatique développée par le laboratoire de Moët & Chandon a été améliorée grâce à la collaboration de plusieurs laboratoires de recherche publique dans le cadre de programmes français soutenus par le ministère de la Recherche et de l'Espace.

Cette technique a d'abord été mise au point pour le porte-greffes 41B *(Vitis vinifera* × *Vitis berlandieri).* Des suspensions cellulaires embryogènes de ce génotype sont entretenues en milieu liquide depuis cinq ans sans perte du pouvoir embryogène de la culture. Ces cellules produisent en moyenne cent embryons somatiques par µl de cellules embryogènes.

Cependant, la qualité des embryons peut varier. Elle serait surtout liée à l'excrétion dans le milieu de culture par les embryons de protéines inhibitrices à leur développement [5]. D'où l'idée d'éliminer ces protéines en renouvelant chaque jour le milieu de culture des embryons [4]. Cela permet d'obtenir un développement en plants des embryons avec un taux de 70 %.

Ce protocole a été appliqué à différents clones de 41B avec le même taux de réussite.

Pour un autre porte-greffes, le SO4, et un cépage, le Chardonnay, le nombre d'embryons somatiques obtenus par µl de cellules est inférieur à celui du 41B (60 embryons/µl de cellules). Cependant, ce nombre d'embryons et leur bon développement, ensuite, en plantules reste suffisant pour développer une technique de transformation génétique.

La transformation génétique par l'intermédiaire d'*Agrobacterium tumefaciens*

• *La coculture et la sélection des cellules transformées*

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisée pour la mise au point de la technique de transformation nous a été fournie par L. Willmitzer [10]. Le plasmide vecteur renferme le gène GUS sous le contrôle d'un promoteur 35S et le gène NPTII sous le contrôle d'un promoteur NOS. Le gène marqueur GUS permet, deux à trois jours après la coculture des cellules embryogènes avec les bactéries, de visualiser le pourcentage de cellules transformées. Pour les trois génotypes, 41B, SO4 et Chardonnay, des pourcentages de cellules transformées de l'ordre de 70 % à 80 % peuvent être obtenus. En moyenne, ce pourcentage est de 80 % pour le 41B, 45 % pour le SO4 , et 22 % pour le Chardonnay. Deux mois après la coculture, ce pourcentage se stabilise autour de 40 % à 50 %. Ce taux peut être progressivement augmenté par l'ajout de paromomycine dans les milieux de culture. Les cellules embryogènes de vigne sont très sensibles à cet antibiotique, et une dose de 5 mg/l est suffisante pour inhiber la multiplication des cellules non transformées. Nous possédons maintenant une culture embryogène de 41B dont 90 % des cellules sont transformées. Cette culture se multiplie depuis un an de façon comparable à une culture témoin.

• *La régénération d'embryons somatiques et de plants*

La technique classique de régénération d'embryons et de plants est appliquée aux cellules transformées. L'antibiotique à la concentration de 5 mg/l est ajouté le premier jour de la culture. Alors que des embryons témoin produisent les premières plantules après cinq semaines de culture, pour le matériel transformé, il faudra deux semaines de plus, soit sept semaines pour obtenir les premières plantes.

Le nombre d'embryons obtenus est également inférieur. Pour cent embryons régénérés par µl de cellules témoin, 52 embryons en moyenne seront obtenus à partir d'un microlitre de cellules transformées de 41B. En revanche, le pourcentage d'embryons se développant en plantes reste le même pour le matériel témoin et pour le matériel transformé, soit 70 %.

• ***L'analyse des plants transformés***

Des tests GUS ainsi que des enracinements de microboutures sur des milieux supplémentés en kanamycine ont été réalisés.

Pour le 41B, soixante-neuf plants issus de trois expériences différentes donnent respectivement au test GUS, 87 %, 65 % et 57 % de plants positifs. Des analyses d'ADN par *Southern* réalisées sur une dizaine de plants confirment la présence de ce gène (Figure 1).

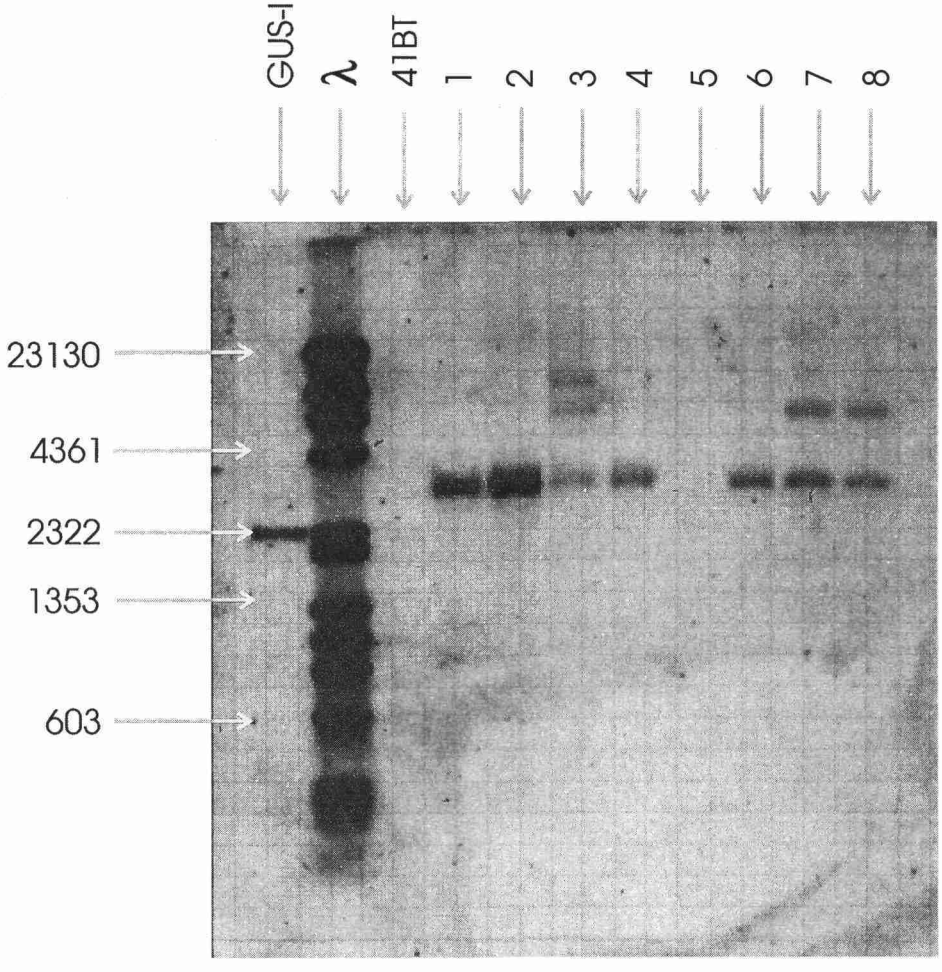


Figure 1. Autoradiographie d'une hybridation *Southern* d'ADN extrait de plants de 41B.
GUS-I : fragment d'ADN correspondant à la sonde utilisée pour cette hybridation.
41BT : ADN de plants témoins.
1 à 8 : ADN de plants transformés.
Les nombres de gauche indiquent la taille des fragments d'ADN en paires de bases (pb).

L'enracinement de microboutures sur des milieux supplémentés en kanamycine (10 mg/l, concentration inhibant tout enracinement du témoin) a été réalisé pour 38 plants positifs au test GUS. 90 % sont résistants à la kanamycine et émettent, après 10 à 12 jours de culture, des racines à la base des microboutures.

Pour le Chardonnay, sur 31 plants testés, 22 (71 %) présentent une activité du gène GUS. En ce qui concerne le SO4, les premiers plants obtenus jusqu'alors présentent également une coloration bleue en présence de X.Gluc.

Conclusion

La technique de transformation mise au point pour le 41B peut être appliquée au SO4 et au Chardonnay. Dans ces trois cas, des suspensions embryogènes de cellules transformées sont obtenues et se multiplient. Les performances embryogènes des trois génotypes sont différentes, mais suffisantes pour obtenir de façon reproductible des embryons somatiques et des plants exprimant les nouveaux gènes intégrés.

La première application agronomique de ces techniques est l'introduction du gène de la capside du GFLV isolé par Serghini *et al.* [9] dans le génome du 41B. L'INRA de Colmar et l'IBMP de Strasbourg participent à ce programme soutenu par l'ANVAR. 300 plants environ ont été régénérés dont 86 % résistent à la kanamycine. D'autres analyses se poursuivent ainsi que des essais en serre, afin de confirmer le meilleur comportement de tels plants en cas d'attaque par le virus.

Références

1. Baribault TJ, Skene KGM, Steele Scott N (1989). Genetic transformation of grapevine cells. *Plant Cell Rep* 8 : 137-140.
2. Baribault TJ, Skene KGM, Cain PA, Steele Scott N (1990). *J Exp Botany,* 41 : 105-111.
3. Berres R, Otten L, Tinland B, Malgarini-Clog E, Walter B (1992). Transformation of *Vitis* tissue by different strains of *Agrobacterium tumefaciens* containing the T.6b gene. *Plant Cell Rep* 11 : 192-195.
4. Coutos-Thevenot P, Goebel-Tourand I, Mauro MC, Jouanneau JP, Boulay M, Deloire A, Guern J (1992). Somatic embryogenesis from grapevine cells. I. Improvement of embryo development by changes in culture conditions. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture* 29 : 125-133.
5. Coutos-Thevenot P, Maes O, Jouenne T, Mauro MC, Boulay M, Deloire A, Guern J (1992). Extracellular protein patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and non embryogenic situations. *Plant Sci,* 86 : 137-145.
6. Guellec V, Netzer MH, Robin O, David C, Mauro MC, Deloire A, Tempe J (1990). *Agrobacterium*-mediated transformation of grapevine embryogenic calli. VIIth International Congress on plant tissue and cell culture, Amsterdam, June 1990.
7. Mauro MC, Toutain S, Deloire A (1992). Genetic transformation of 41B grapevine rootstock through *Agrobacterium tumefaciens.* XIIIth Eucarpia Congress, July 6-11th, Angers.
8. Mullins MG, Archie Tang FC, Facciotti D (1990). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevines. Transgenic plants of *Vitis rupestris* SCHEELE and buds of *Vitis vinifera* L. *Biotechnology,* vol. 8 : 1041-1045.
9. Serghini MA, Fuchs M, Pinck M, Reinbolt J, Walter B, Pinck L (1990). RNA2 of grapevine

fanleaf virus : sequence analysis and coat protein cistron location. *J Gen Virol* 71 : 1433-1441.

10. Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M (1990). Construction of an intron-containing marker gene : splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* 220 : 245-250.

Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 507-513.

53

Expériences de manipulations génétiques de l'orge par l'utilisation du bombardement biolistique

J. DE LAFONTEYNE, M. SORMANN, B. VAN DE COTTE

Laboratoire de Génétique Moléculaire, Faculté d'Agronomie et de Biologie Appliquée Université de Gand, Coupure L, 653 Gand, B-9000, Belgique.

Résumé

*Deux méthodes sont présentées qui permettent la transformation de céréales. Dans la première méthode, des fleurs, avant la fertilisation, sont imbibées d'un mélange de cultures d'*Agrobacterium *induits, portant l'un, sur son ADN-T, un gène de transposase* Ac *sans bordures de transposon et l'autre, sur son ADN-T, le gène à introduire, flanqué par les bordures du transposon* Ac. *Dans la seconde méthode, des microcals, provenant de microspores, sont bombardés avec un mélange de gènes de transposase* Ac *sans bordures de transposon et le(s) gène(s) à introduire, flanqués par les bordures du transposon* Ac.

En 1982, le président de l'IBA *(International Breeders Association),* M. L. Matton, nous a posé la question de savoir s'il n'y avait pas moyen de transformer les céréales, dans le but d'augmenter leur résistance aux maladies.

A cette époque, le rêve de manipuler le génome des plantes venait d'être réalisé chez le tabac.

Concernant les céréales, on ne trouvait, dans la littérature que quelques articles décrivant des techniques susceptibles de faciliter la transformation des céréales et notamment, des techniques permettant la régénération de céréales à partir de cellules isolées : la culture de microspores et d'ovules.

Notre premier but était de mettre au point la régénération de l'orge à partir de microspores, par la technique de culture d'anthères. Les techniques décrites en 1982 pouvaient en général être utilisées avec un nombre limité de lignées d'orge de printemps et il fallait donc améliorer cette méthode afin de permettre la régénération de toutes les lignées, aussi bien d'orge de printemps que d'orge d'hiver. Cette mise au point nous a pris presque dix ans, mais on est maintenant capable de régénérer la majorité des orges par culture de microspores.

Une fois que la culture d'anthères commençait à donner des plantes vertes et fertiles, vers les années 1985, nous avons abordé le problème de la transformation génétique des céréales.

Malheureusement, à part la micro-injection, nous n'avions pas alors à notre disposition d'autres méthodes de manipulation génétique qui pouvaient être pratiquées sur microspores directement.

Entre-temps, la transformation par *Agrobacterium* était déjà bien établie. Cette technique ne pouvait pas être appliquée aux monocotylédones, à part quelques exceptions, qui, d'ailleurs, se sont avérées difficilement reproductibles.

Quelques observations faites par l'équipe de B. Hohn à Bâle et de R. Flavell à Cambridge [1, 4] permettaient d'affirmer qu'*Agrobacterium* était capable de délivrer son ADN-T dans des cellules de maïs et de blé, et que cet ADN-T était dirigé vers le noyau, puisque le virus à ADN, WDV *(wheat dwarf virus),* se multipliait dans des plantules de blé infectées avec une bactérie *Agrobacterium,* portant une copie du génome viral sur son ADN-T.

Comme les expériences de transformation de céréales avec *Agrobacterium* n'avaient jamais donné de résultats concluants, nous avons émis l'hypothèse que c'était le mécanisme moléculaire de l'intégration de l'ADN-T d'*Agrobacterium* qui ne fonctionnait pas bien dans les monocotylédones, pour une raison inconnue.

Dès lors nous avons essayé de combiner la capacité d'*Agrobacterium* de transférer son ADN-T dans le noyau des cellules de céréales, avec la capacité d'un transposon comme *Ac (Activator)* de se transposer d'une section d'ADN à une autre, c'est-à-dire à s'exciser et à s'intégrer ailleurs. Le transposon *Ac* a été isolé et caractérisé en 1984 par l'équipe de N. Fedoroff à New York et de P. Starlinger à Cologne [2, 7].

Des expériences réalisées à base de cette méthode ont donné des résultats positifs, mais ils nous ont montré en plus une technique à suivre pour la transformation génétique des microspores de céréales.

La découverte d'un système pour accélérer des particules métalliques couvertes d'ADN (bombardement biolistique), par Klein *et al.*[5], permet un transfert d'ADN indépendant d'*Agrobacterium,* en même temps que le transfert dans un grand nombre de cellules.

Une combinaison du bombardement biolistique et du système d'intégration de transposons, utilisée sur microspores, promet beaucoup pour la transformation de monocotylédones.

Expériences utilisant le transfert d'ADN par *Agrobacterium* et l'intégration par la transposase *Ac*

L'infection par *Agrobacterium* est réalisée par micro-injection dans le méristème apical de germes, comme décrit par Grimsley *et al.* [4] ou par injection de bactéries dans les

fleurs, quelques jours avant la fertilisation. Les bactéries sont induites pour le transfert par culture en milieu minimum contenant de l'acétosyringone. Sur l'ADN-T se trouvent le gène de transposase et le gène à transférer. Nous avons utilisé le clone *Ac9Wx*.

Dans les constructions finales, le gène de transposase n'est pas encadré par les bordures du transposon, tandis que le gène à transférer l'est. En d'autres termes, nous utilisons pour l'intégration un système à deux composantes : un transposon chimérique, dans lequel le gène de transposase a été remplacé par le gène à introduire, et un gène de transposase sans bordures de transposon. Le gène de transposase peut se trouver sur l'ADN-T d'un *Agrobacterium*, tandis que le transposon chimérique peut se trouver sur l'ADN-T d'un autre *Agrobacterium*. Dans ce dernier cas, on utilise un mélange des deux *Agrobacterium* pour faire la transformation et les bactéries non-mélangées peuvent servir de contrôle.

Dans les premières expériences, nous avons testé l'expression du gène *uidA* d'*Escherichia coli*, dans une cassette d'expression p-35S de CAMV *(Cauliflower mosaic virus)* et pA-*nos* (GUS, reçu de R. Jefferson), 7 jours après l'infection, avec un mélange d'*Agrobacterium* (A) portant le transposon *Ac* complet, et d'*Agrobacterium* (B) portant un transposon chimérique, contenant le gène GUS.

Dans environ 5 % à 7 % des germes injectés nous avons trouvé une activité β-glucuronidase en utilisant le substrat X-gluc (bromo-chloro-indolyl-β-D-glucuronide). Cette activité se montrait dans les cellules, aussi bien par analyse en microscopie fond-noir, qu'en microscopie électronique. Une analyse dans la génération suivante montrait un nombre de plantes (0,5 %) avec des expressions de β-glucuronidase localisées, sous forme de secteurs, dans lesquels nous avons pu démontrer l'activité enzymatique intracellulaire en microscopie fond-noir et électronique.

En 1990 nous avons infecté les fleurs d'un grand nombre de lignées de blé et des dihaploïdes d'orge, obtenues par culture d'anthères, avec un mélange d'*Agrobacterium* (A) contenant le gène de transposase sous contrôle de son propre promoteur (TPNptpn), le promoteur 35S du virus ADN CAMV *(cauliflower mosaic virus)* (TPNp35S) ou le promoteur pTR1' de l'ADN-T d'*Agrobacterium* du type mannopine (TPNpTR), et d'*Agrobacterium* (B) contenant un transposon chimérique, constitué soit du gène GUS, soit du gène *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* (reçu de *Plant Genetic Systems*) dans une cassette d'expression p-TR, pA-gène-7 (BAR).

Les semences ont été récoltées et resemées en 1991. Les plantules F1 traitées avec le gène GUS en F0 ont été analysées avec le substrat X-gluc. L'expression de GUS se manifeste surtout autour du système vasculaire du coléoptile (contraste bleu/blanc), mais aussi dans les feuilles (après décoloration). Les plantes F1 traitées avec le gène BAR ont été arrosées trois fois avec l'herbicide Basta (Hoechst) (1/2 dose, 1 dose et 2 doses) et la semence des plantes survivantes a été resemée en 1992.

L'ADN des feuilles de plantes positives a été analysé plus en détail par PCR *(polymerase chain reaction)* et par hybridation moléculaire du type *Southern*.

Dans la majorité des plantes positives pour GUS ou BAR, un fragment correspondant au gène utilisé pour la transformation peut être amplifié en utilisant des amorces spécifiques pour *uidA* ou *bar* et nous avons pu montrer que les fragments générés après digestion par des enzymes de restriction, à partir du gène d'origine et du gène amplifié par PCR des orges transformés, sont identiques. Une analyse pour le gène *bar* est montrée dans la Figure 1.

L'hybridation moléculaire *Southern* montre que dans le cas de plantes résistantes au Basta, l'ADN des feuilles contient les gènes *bar* et *nptII* (deuxième gène de sélection).

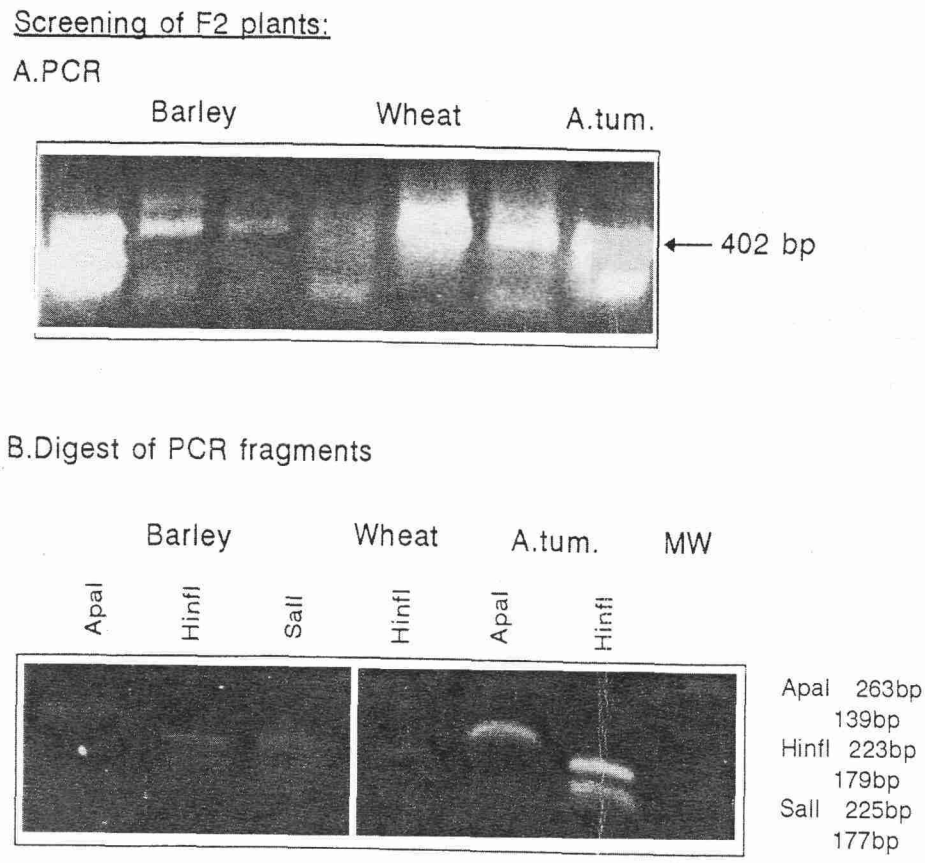


Figure 1. Analyse par PCR du gène *bar* dans l'ADN de plantes résistantes au Basta et dans l'ADN de l'*Agrobacterium* utilisé pour la transformation de céréales par injection des fleurs. A. PCR. B. Digestion des fragments obtenus par PCR.

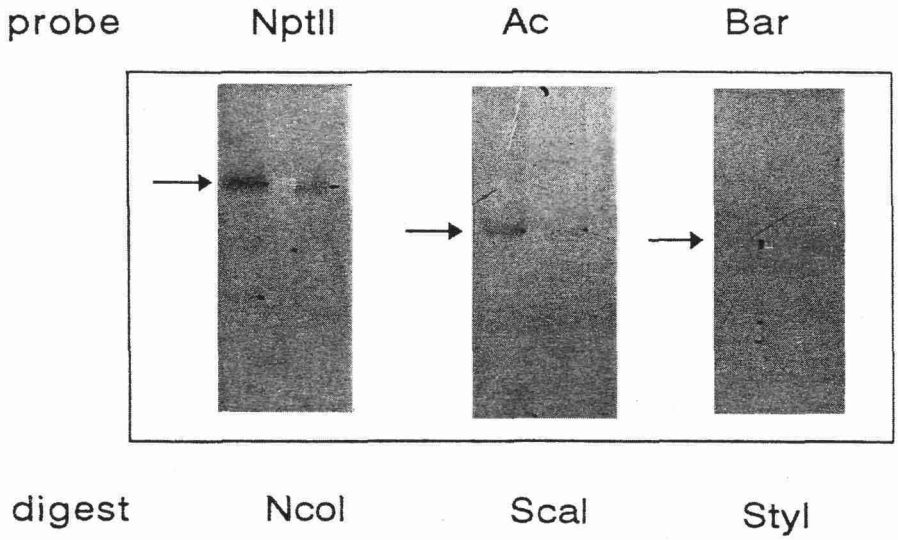


Figure 2. Analyse par hybridation *Southern* des gènes introduits dans les orges résistant au Basta.

Longueur des fragments:

Gène	Sonde	Orge	*A. tumef.*
nptII	1, 2 Kbp	8 Kbp	9, 5 Kbp
bordures *Ac*	1, 8 Kbp	4, 5 Kbp	7, 3 Kbp
bar	1, 4 Kbp	4, 5 Kbp	4, 8 Kbp

Des séquences bordures d'*Ac* et la longueur des fragments indiquent que l'intégration s'est faite par transposition (Figure 2).
En conclusion, il semble que la combinaison d'*Agrobacterium* pour le transfert, et *Ac* pour l'intégration donne lieu à une transformation génétique chez l'orge. La méthodologie par injection des fleurs est applicable, en principe, sur toutes les plantes en floraison. Pour les autres plantes la micro-injection de méristèmes est la méthode de choix.

Expériences utilisant le transfert d'ADN par bombardement biolistique et intégration par transposase *Ac*

Dans ces expériences, nous avons utilisé des microspores d'orge « Igri » et de blé « Jo » pour la mise au point de la technique de bombardement et la sélection des plantules transformées.

Le stade de développement des microspores pour cette mise au point n'était pas idéal pour l'obtention de plantes transformées. Nous avons donc pris des cals et des embryons en développement, passé le stade de 32 cellules.

Les gènes utilisés ont été pourvus d'une séquence d'amplification d'expression *sh1-ex1-in1* (exint) provenant du gène de la sucrose synthase 1 de maïs [6]. Cette séquence permet une expression 1 000 fois plus élevée d'un ARNm dans les céréales. Le gène de transposase *Ac*, le gène *uidA* et le gène *bar* ont été mis sous contrôle du promoteur 35S et leur traduction sous contrôle de *sh1-ex1-in1*. La partie terminale des gènes n'a pas été modifiée.

Des microcals embryogènes, provenant de microspores d'« Igri », sont filtrés sur une membrane de fibre de verre et bombardés avec des particules d'or de 1,6 microns sur lesquels un ADN plasmidique, contenant le gène GUS (exint), est fixé. En utilisant une pression de 1 300 psi (90 bars) et une distance de 6 cm, jusqu'à 25 % des microcals développent des taches bleues lors d'une incubation avec X-gluc, 24 ou 48 heures après le bombardement.

Il s'agit, dans ce cas, d'une expression transitoire.

Des microcals embryogènes, provenant de microspores de Jo, ont été traités de la même manière avec un mélange d'ADN plasmidique contenant (A) le gène BAR35S(exint) encadré des bordures d'*Ac* et (B) contenant le gène de transposase *Ac* TPN35S (exint). Une semaine après le bombardement, les microcals sont mis sur un milieu sélectif contenant 10 µg/ml de phosphinotricine (substance active du Basta).

Après un mois, 3/40 (7 %) des cals ont développé des feuilles vertes, les autres étant complètement nécrosés. On n'a pas observé de racines.

Cette dernière expérience montre qu'il est possible de transformer efficacement une partie du tissu embryogène par un bombardement biolistique, si l'on utilise un système de transposition et des promoteurs forts, combinés avec des amplificateurs de traduction.

Dans le futur, le bombardement de microspores sera effectué avant la première division, afin d'éviter la production de plantes chimères qui ne sont que partiellement transformées.

Cette méthodologie est applicable, en principe, à toutes les plantes qui peuvent être régénérées à partir d'une seule cellule. Dans le cas de microspores, on peut obtenir, en une seule étape, des plantes, homozygotes pour le gène introduit.

Note et remerciements :

Ce travail a été publié sous forme de brevet :
Canada : 2089072
Europe : PCT/EP91/01883
États-Unis : 984, 436
Japon : 3-515938
Date de priorité : 27/09/90

Nous remercions Mrs L. Matton et P. Matton de la S.A. Clovis Matton et le Gouvernement Flamand pour le support de ce travail.

Références

1. Dale P, Marks M, Brown M, Woolston C, Gunn H, Mullineaux P, Kemp J, Chen D, Gilmour M, Flavell R (1988). Seventh Wheat Genetics Symposium, Cambridge UK : 719-722.
2. Döring HP, Tiilmann E, Starlinger P (1984). *Nature* 307 : 127-130.
3. Grimsley N, Hohn T, Davies JW, Hohn B (1987). *Nature* 325 : 177-179.
4. Grimsley N, Ramos C, Hein T, Hohn B (1988). *Biotechnology* 6 : 185-189.
5. Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC (1987). *Nature* 327 : 70-73.
6. Maas C, Laufs J, Grant S, Korfhage C, Werr W (1991). *Plant Mol Biol* 16 : 199-207.
7. Pohlman R, Fedoroff N, Messing J (1984). *Cell* 37 : 635-643.

Littérature récente sur la transformation des céréales :

Forgeois *et al.* (1993). Actes du colloque AUPELF UREF de Rabat.
Creissen G, Smith C, Francis R, Reynolds H, Mullineaux P (1990). *Plant Cell Rep* 8 : 680-683.
Klein TM, Arentzen R, Lewis PA, Fitzpatrick-McElligott S (1992). *Biotechnology* 10 : 286-291.
Vasil IK (1993). *Biotechnology* 11 : 1153-1157.

Achevé d'imprimer par Corlet, Imprimeur, S A
14110 Condé-sur-Noireau (France)
N° d'Imprimeur . 7204/232 - Dépôt légal mars 1995
Mise en pages Reprotyp - 14110 Condé-sur-Noireau
Imprimé en C.E E

La collection ***Universités francophones,*** créée en 1988 à l'initiative de l'UREF, propose des ouvrages de référence, des manuels spécialisés et des actes de colloques scientifiques aux étudiants de 2e et 3e cycle universitaire ainsi qu'aux chercheurs francophones et se compose de titres originaux paraissant régulièrement.

Leurs auteurs appartiennent conjointement aux pays du Sud et du Nord et rendent compte des résultats de recherches et des études récentes entreprises en français à travers le monde. Ils permettent à cette collection pluri-disciplinaire de couvrir progressivement l'ensemble des enseignements universitaires en français.

Enfin, la vente des ouvrages à un prix préférentiel destiné aux pays du Sud tient compte des exigences économiques nationales et assure une diffusion adaptée aux pays francophones.

Ainsi, la collection Universités francophones constitue une bibliothèque de référence comprenant des ouvrages universitaires répondant aux besoins des étudiants de langue française.

220,00 FF
60,00 FF – UREF / Prix préférentiel : Afrique, Asie, Amérique du Sud, Haïti

59.4639.7
9 782742 000753

AUPELF•UREF

John Libbey EUROTEXT