

## 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

*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'androgénèse 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'androgénèse 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'androgénèse, 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'androgénèse [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'androgénèse 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 back-cross 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  $2\text{ °C} \pm 1$ , les grains de blé sont semés en pot dans une serre contrôlée (température  $25\text{ °C}/15\text{ °C}$  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'androgénèse, 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  $26\text{ °C}$ .

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  $20\text{ °C} \pm 1$ .

Les embryons provenant de l'androgénèse sont mis sur le milieu « R8 » [5]. Toutes les cultures d'embryons ont été incubées à  $25\text{ °C} \pm 1$  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.

Génotypes	Croisement « blé × maïs »			Androgenèse		
	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'androgénèse, 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'androgénèse. 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'androgénèse 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'androgénèse.

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 androgénèse. 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. Bercraft 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'Donoghue 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, Ruckebauer P, eds. Biometrics in Plant Breeding. Proc Fifth Eucarpia Meeting, Univ. Hohenheim. Vortr. Pflanzenzüchtg 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 differentiation 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.



# 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  $2^{\circ}\text{C} \pm 1$  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 :  $25^{\circ}\text{C}$  le jour et  $15^{\circ}\text{C}$  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  $4^{\circ}\text{C} \pm 1$ , 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 phényl 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  $\mu\text{m}$ . Les boîtes de culture contenant environ 40 anthères provenant d'un épi sont incubées à l'obscurité à  $28^{\circ}\text{C}$  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 embryoides sont comptés et transférés sur le milieu de régénération « R8 » [12] puis exposés à la lumière (photopériode de 16 h à  $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ ). Toutes les données ont été transformées en  $\text{Arcsin} \sqrt{x}$  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'androgénèse, embryogénèse 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'embryogénèse 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'embryogénèse et une dose de 1 mg/l diminue la totalité des paramètres d'androgénèse 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'embryogénèse 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  $\text{Arc sin } \sqrt{x}$ ) 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

\*\*\* : significatif 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 preliminary 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 acid (PAA). *Plant Cell Rep* 11 : 489-498.



# 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 embryoides 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<sub>1</sub> ont été évalués pour leur tolérance au NaCl. Six lignées R<sub>1</sub>, 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<sup>+</sup>.*

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'équilibre 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<sup>+</sup>*

Les glycophytes les plus sensibles au sel restreignent le transport de Na<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> dans leurs feuilles.

Cette contradiction apparente provient de l'existence de deux comportements distincts concernant la distribution de Na<sup>+</sup> dans les plantes. Les espèces les plus sensibles à la salinité sont incapables de compartimenter Na<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>. 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  $\text{Na}^+$  dans les feuilles existe chez le blé et les triticales : les variétés les plus résistantes sont habituellement celles qui transportent le moins de  $\text{Na}^+$  dans leurs feuilles [1].

• **Sélectivité ionique : efficacité d'utilisation de  $\text{K}^+$**

A l'interface racine/sol, l'excès de  $\text{Na}^+$  peut limiter l'approvisionnement de la plante en macroéléments essentiels, tels que  $\text{K}^+$ .

Une composante de la tolérance à la salinité sera donc l'efficacité avec laquelle  $\text{K}^+$  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  $\text{Na}^+$ .

Chez le blé et l'orge, une corrélation existe entre la croissance en milieu salin, la vitesse d'absorption de  $\text{K}^+$  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  $\text{K}^+$  en présence d'excès de  $\text{NaCl}$  [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<sup>+</sup>
    - recirculation du Na<sup>+</sup> 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 gaméto-clonale 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<sub>1</sub> 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'anthers de la variété de blé Sabine, sensible à la salinité.

Notre étude de la variation gamétoclonale induite par la culture d'anthers 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'anthers a été évaluée sur base du rapport entre le nombre de cals ou embryoides survivants sur milieux de régénération supplémentés en NaCl (0,75 % et 0,9 % globalisés) et le nombre de cals ou embryoides mis en culture sur ces milieux sélectifs (Tableau II).

**Tableau II.** Fréquence des cals et embryoides sélectionnés et des plantules vertes régénérées.

Protocole de régénération	Traitements des anthers	Nombre d'anthers cultivées	Nombre de cals ou embryoides placés sur le milieu de sélection contenant		% de cals ou embryoides 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)					
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'anthers irradiées ou non (rayons gamma à 0,43 krad), après avoir été prélevées sur des épis de plantes cultivées en serre (var. Sabine).

B : embryoides induits à partir d'anthers 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 embryoides 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 anthers 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 anthers.

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 anthers, 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 callogénèse 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 callogénèse (ou d'embryogénèse) des anthères cultivées sur les milieux d'induction. Les doses plus élevées d'irradiation gamma des épis diminuent progressivement la fréquence de callogénèse ou d'embryogénèse. Afin de provoquer une quantité importante de mutations, nous avons choisi d'utiliser un traitement gamma de 0,43 krad, qui réduit la callogénèse 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'androgénèse, 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			Nombre de plantes régénérées à partir des cals			Nombre de plantes/anthères régénérées sur milieu de sélection (b)
			NaCl			NaCl			
			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<sub>1</sub> obtenus à partir des dihaploïdes. Six lignées R<sub>1</sub> 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).

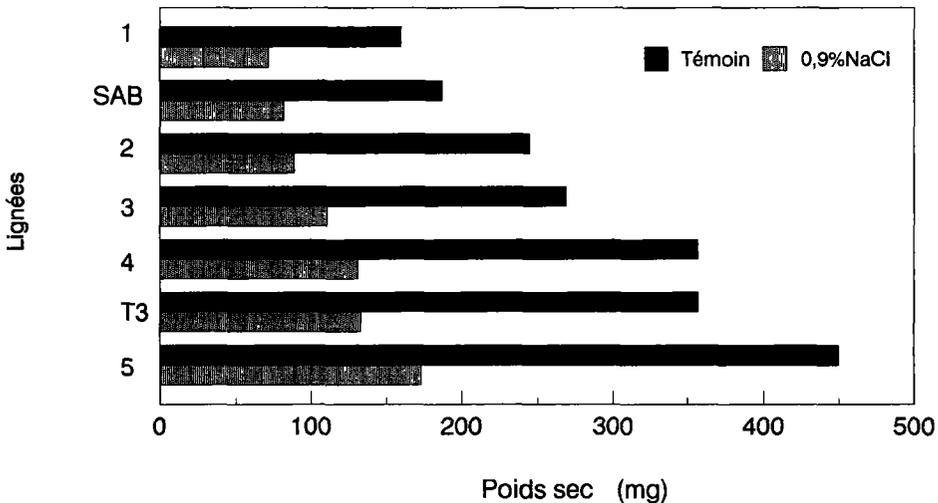
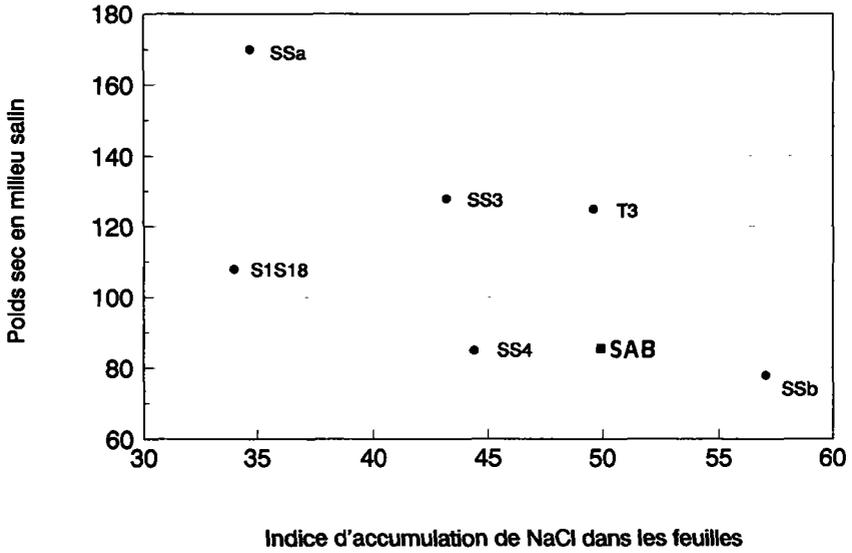


Figure 1. Poids sec de plantes androgénétiques de blé en conditions de stress salin.



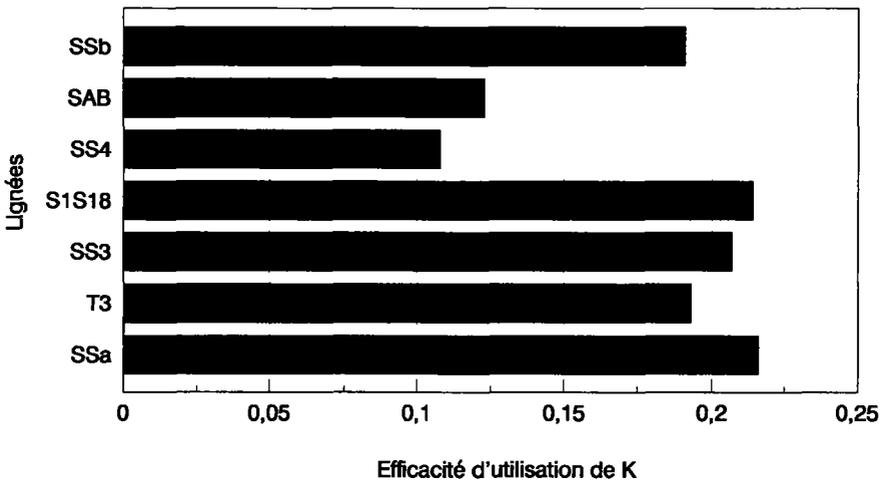
**Figure 2.** Relation entre le poids sec des feuilles en milieu sain et l'indice d'accumulation de NaCl dans les feuilles.

Indice d'accumulation = rapports des concentrations en NaCl présents dans les feuilles de plantes se développant en milieu salin ou non salin.

S<sub>1</sub>S<sub>18</sub>, SS<sub>2</sub>, SS<sub>3</sub>, SS<sub>4</sub>, SS<sub>6</sub> = lignées androgénétiques provenant de plantes régénérées à partir de cals sélectionnés en présence de NaCl.

T<sub>3</sub> = 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<sup>+</sup> (quantité de biomasse produite par unité de K<sup>+</sup> 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<sub>1</sub> et à la R<sub>2</sub>.

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<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and SO<sub>4</sub><sup>-</sup> 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* disomic 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 <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> 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 embryos. 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<sup>+</sup> utilization in tomatoes grown under K<sup>+</sup> 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'anthers 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 : Staples RC, Toenniessen 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.

# 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<sup>1,2</sup>, PHILIPPE LEPOIVRE<sup>1</sup>,  
PHILIPPE BOXUS<sup>2</sup>

*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<sub>4</sub> constitué de macro-éléments, micro-éléments et vitamines MS [6] additionné de NAA (0,3 mM), BAP (3 mM) et GA<sub>3</sub> (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<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>.

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<sub>3</sub>). 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<sub>3</sub>. 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<sub>3</sub>. Les conditions de culture sont les suivantes : photopériode de 16 heures, température de 25 ± 1 ° C, et énergie lumineuse de 22 μmol m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup> 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<sub>4</sub>. 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<sub>4</sub>.

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<sub>2</sub>O.

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 Burkner 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 × 10 <sup>6</sup> (0,7)	50 (4,9)	12 (0,9)
Feuilles médianes	15,2 × 10 <sup>6</sup> (2,3)	77 (4,5)	15 (1,4)
Feuilles basales	3,8 × 10 <sup>6</sup> (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'âge 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 × 10 <sup>6</sup> (2,3)	77 (4,5)	15 (1,4)
30 jours	1,5 × 10 <sup>6</sup> (0,3)	27 (5,8)	11 (0,8)
45 jours	0,2 × 10 <sup>6</sup> (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 ».

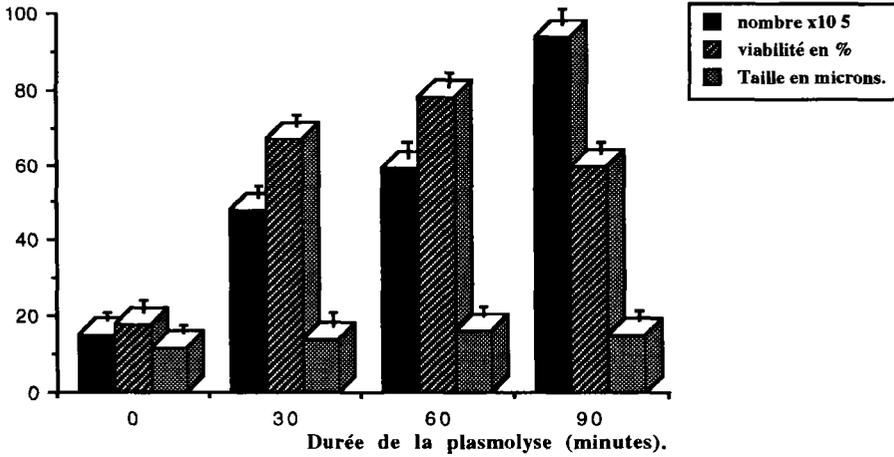
Nombre de jours après repiquage	Types de cals	Nombre moyen de protoplastes par g de poids frais	% de protoplastes vivants	Diamètre moyen des protoplastes (µm)
10 jours	Cf	3,5 × 10 <sup>6</sup> (2,7)	86 (3,2)	19 (0,1)
	Cr	6,8 × 10 <sup>6</sup> (3,8)	90 (2,6)	28 (0,03)
15 jours	Cf	2,8 × 10 <sup>6</sup> (1,1)	52 (3,7)	19 (0,52)
	Cr	7,9 × 10 <sup>6</sup> (0,9)	91 (5,4)	28 (0,3)
20 jours	Cf	0,7 × 10 <sup>6</sup> (0,2)	49 (0,9)	17 (0,1)
	Cr	4,9 × 10 <sup>6</sup> (2,1)	79 (3,6)	25 (0,2)
30 jours	Cf	0,7 × 10 <sup>6</sup> (0,5)	20 (0,7)	18 (1,1)
	Cr	2,1 × 10 <sup>6</sup> (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 macérozyyme 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.

*Isolement de protoplastes*



**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 plasmolisés 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 × 10 <sup>6</sup> (0,3)	46 (1,6)	21 (0,1)
	Sans		3,5 × 10 <sup>6</sup> (3,4)	86 (5,1)	19 (0,4)
Cals de racines (MS3)	Avec	80 %	6,4 × 10 <sup>6</sup> (7,3)	79 (2,8)	27 (0,01)
	Sans		7,9 × 10 <sup>6</sup> (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 hémicellulase et 0,1 % de pectolyase Y-23 a permis l'obtention de 15 × 10<sup>6</sup> 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 × 10<sup>6</sup> 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 × 10<sup>6</sup> de protoplastes

avec une viabilité de 49 %. Le rendement maximum de  $3,5 \times 10^6$  et  $8 \times 10^6$  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 <sup>6</sup> )	% 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).

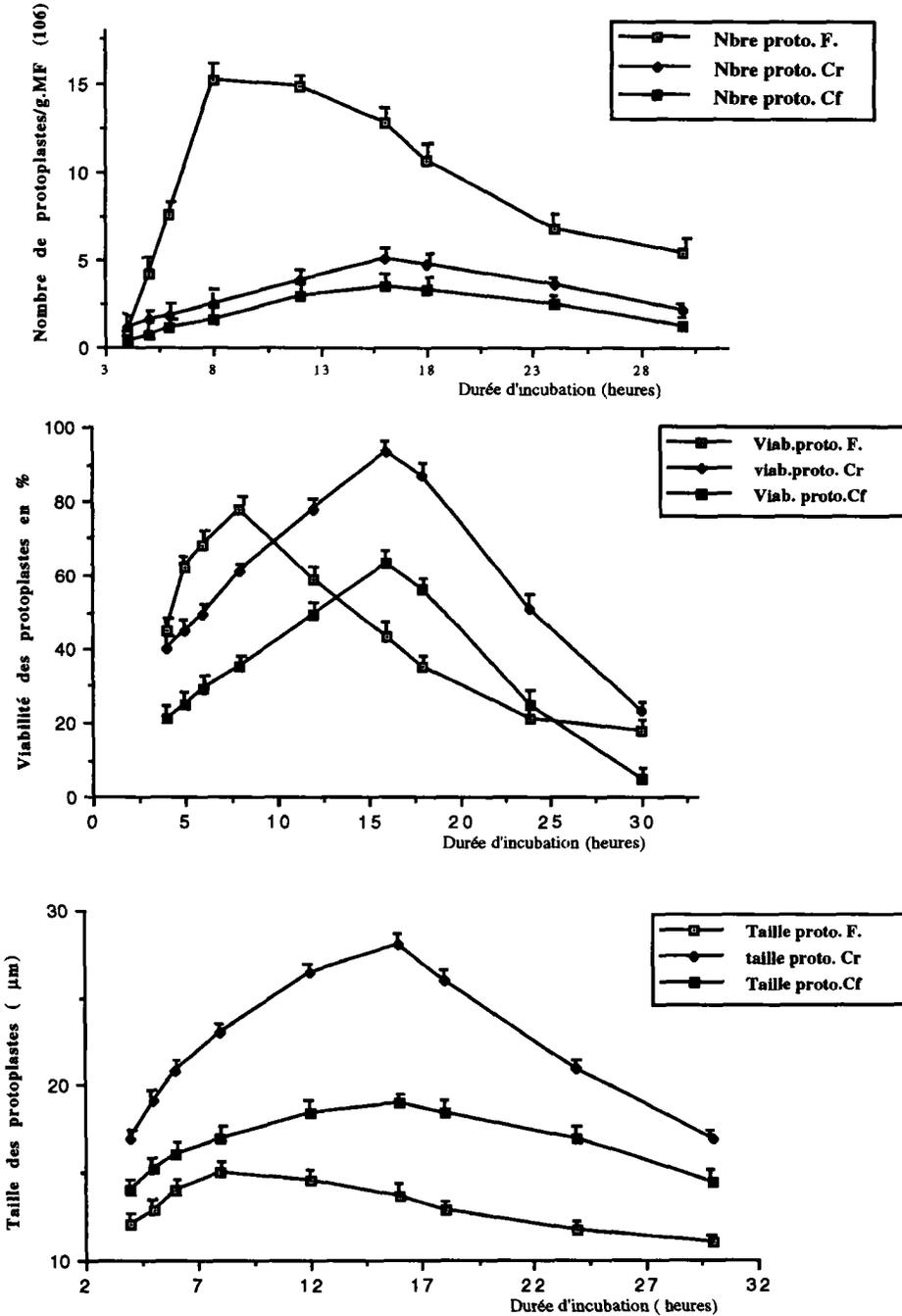
A la fin de la digestion, la taille moyenne des protoplastes diffère selon l'origine de l'explant. Les protoplastes issus de mésophylle foliaire sont petits (15 microns), riches en chloroplastes et présentent un cytoplasme dense alors que ceux de cals de racines sont plus volumineux (28 microns) et vacuolisés. 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.

*Isolement de protoplastes*



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], Grèzes *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, Higgins 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). Coltura di protoplasti come metodo per il miglinamento genetico nelle piante da frutto. *Frutticoltura* 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.



# 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, *Kr1* 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  $2\text{ °C} \pm 1$  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  $130\text{-}300\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,
- une température de  $25\text{ °C}$  le jour et de  $15\text{ °C}$  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  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . 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  $\text{Arcsin } \sqrt{x}$  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, Hanc, 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 frequency 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*. *Heredity* 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.

# 36

## Gynogenèse chez des géotypes 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 géotypes 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 géotype 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 éclairage, 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 7<sup>e</sup> et la 10<sup>e</sup> 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 gynogénèse.

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'androgénèse 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 optimiser la qualité physiologique du matériel, que l'on sait essentielle pour tous travaux d'androgénèse ou de gynogénèse, 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 ( $\pm 2$  °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 ( $\emptyset = 5$  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 éclairage 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 ( $\pm 2$  °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<sup>1</sup>**

Les faibles effectifs des réussites (plantes entières) amènent à utiliser le test  $\chi^2$  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  $\mu$  ( $\mu$ ) :  $\chi^2 \{ \neq g/\mu \}$ , ou encore pour tous milieux confondus ( $\Sigma$  mil.) :  $\chi^2 \{ \neq g/\Sigma \text{ mil.} \}$ , 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 : ( $\chi^2 \{ \neq g/4 \} = 4,00$  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 $\mu$ $\chi^2 \{ \neq g \}$	Cultivar	Nb ov	Nb pl	% pl/ov
$\chi^2 = 8,87^*$	Bérénice	257	1	0,40
	Asni	297	9	<b>3,00</b>
	Tamelalt	313	2	0,64
$\chi^2 = 1,50$	Bérénice	268	3	1,12
	Asni	285	1	0,35
	Tamelalt	232	3	1,29
$\chi^2 = 6,44^*$	Bérénice	328	0	0,00
	Asni	286	0	0,00
	Tamelalt	194	2	1,03
$\chi^2 = 4,00$	Bérénice	240	5	2,08
	Asni	225	10	<b>4,44</b>
	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  $\chi^2$  (L) sur les effectifs de plantes obtenues :  $\chi^2$  relatif aux 3 génotypes ( $\neq g$ ) sur le milieu  $\mu$ .  $\chi^2 \{ \neq g/\mu \}$ , avec  $\alpha_{0,05} = 5,99$  (d.d.l. = 2) :

$$\chi^2 \{ \neq g/1 \} = 8,87^*$$

$$\chi^2 \{ \neq g/3 \} = 6,44^*$$

Les autres  $\chi^2$  :

tous génotypes confondus, avec  $\alpha_{0,05} = 7,81$  (d.d.l. = 3):

$$\chi^2 \{ \neq \text{mil.}/\Sigma g. \} = 18,99^{***}$$

tous milieux confondus, avec  $\alpha_{0,05} = 5,99$  (d.d.l. = 2) :

$$\chi^2 \{ \neq g/\Sigma \text{ mil.} \} = 4,81 \text{ N.S.}$$

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 ( $\chi^2 \{\neq g/2\} = 0,95$  NS) et médiocres (0 %-A-, 0,51 %-T-, 0,71 %-B-).

Les autres milieux amènent des résultats hétérogènes ( $\chi^2 \{\neq g/1\} = 12,16^{**}$ ,  $\chi^2 \{\neq g/2\} = 9,30^{**}$ ,  $\chi^2 \{\neq g/4\} = 11,64^{**}$ ), 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 $\mu$ $\chi^2 \{\neq g\}$	Cultivar	Nb ov	Nb pl	% pl/ov
$\chi^2 = 12,16^{**}$	Bérénice	250	4	1,60
	Asni	300	24	<b>8,00</b>
	Tamelalt	205	8	3,90
$\chi^2 = 9,30^{**}$	Bérénice	260	8	3,07
	Asni	285	25	<b>8,77</b>
	Tamelalt	230	9	3,91
$\chi^2 = 0,95$	Bérénice	280	2	0,71
	Asni	286	0	0,00
	Tamelalt	194	1	0,51
$\chi^2 = 11,64^{**}$	Bérénice	240	5	3,33
	Asni	225	20	<b>8,88</b>
	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  $\chi^2$  (O) sur les effectifs de plantes obtenues :

$\chi^2$  relatif aux 3 génotypes ( $\neq g$ ) sur le milieu  $\mu$ ,  $\chi^2 \{\neq g/\mu\}$ .

avec  $\alpha_{0,05} = 5,99$  (d.d.l. = 2) :

$$\chi^2 \{\neq g/1\} = 12,16^{**}$$

$$\chi^2 \{\neq g/2\} = 9,30^{**}$$

$$\chi^2 \{\neq g/4\} = 11,64^{**}$$

Les autres  $\chi^2$  :

tous génotypes confondus, avec  $\alpha_{0,05} = 7,81$  (d.d.l. = 3) :

$$\chi^2 \{\neq \text{mil}/\Sigma g.\} = 30,88^{***}$$

tous milieux confondus, avec  $\alpha_{0,05} = 5,99$  (d.d.l. = 2) :

$$\chi^2 \{\neq g/\Sigma \text{mil.}\} = 28,85^{***}$$

Significatif à :

\* = 5 %

\*\* = 1 %

\*\*\* = 1‰

N.S. = non significatif

### Impact des conditions d'éclairément, 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'éclairément.

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  $\chi^2$  très hautement significatif pour les deux génotypes marocains A et T ( $\chi^2$  A  $\{\neq L, O/\Sigma \text{ mil.}\} = 29,55^{***}$ ,  $\chi^2$ T  $\{\neq L, O/\Sigma \text{ mil.}\} = 10,60^{***}$ ), mais pas pour B ( $\chi^2$  B  $\{\neq L, O/\Sigma \text{ mil.}\} = 3,65\text{N.S.}$ ) 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 =					Nb pl total	% pl/ov
		1	2	3	6	8		
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 =					Nb pl total	% pl/ov
		1	2	3	6	8		
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  $\chi^2$  issus des Tableaux III (L) et IV (O)

$\chi^2$  issu des 2 conditions L/O, tous milieux confondus,  $\chi^2 \{\neq L, O/\Sigma \text{ mil.}\}$ , avec  $\alpha_{0,05} = 3,84$  (d.d.l. = 1) :

Bérénice :  $\chi^2 \{\neq L, O/\Sigma \text{ mil.}\} = 3,65 \text{ N.S.}$

Asni :  $\chi^2 \{\neq L, O/\Sigma \text{ mil.}\} = 29,55^{***}$

Tamelalt :  $\chi^2 \{\neq L, O/\Sigma \text{ mil.}\} = 10,60^{***}$

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<sup>e</sup> 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 ( $A \gg T \geq B$ ). 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 pretreatment 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). Héritéité épigénique de vitrovariants obtenus par haplodiploïdisation chez l'orge (*Hordeum vulgare*). Analyse des croisements diallèles et de leurs descendance 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 multi-usage 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). Héritéité 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  $\beta$  amylases chez les croisements diallèles. In : *Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?* Paris : AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext : 345-353.

# 37

## **Vitrovariation chez des orges (*Hordeum vulgare*) issues d'haplodiploïdisation. Analyse des $\beta$ 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'électrophorogrammes des  $\beta$  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 électrophorogrammes des  $\beta$  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 épigénétiques 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  $\Phi 1$  d'autofécondation d'haploïdes doublés d'orge vitrovariants A1, A2, A3, issus d'androgénèse, et G1, G2, issus de gynogénèse, 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<sup>e</sup>  $\Phi 4$ , 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'androgénèse comparées à celles de gynogénèse.

Les observations biochimiques [15] ont alors porté sur des paramètres comme les taux de protéines, ou les activités des  $\alpha$  et des  $\beta$  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  $\Phi 4$ , 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  $\alpha$  et des  $\beta$  amylases, ainsi que l'observation des électrophorégrammes des  $\beta$  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  $\alpha$  amylases, les  $\beta$  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 $\beta$ 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  $\mu$ l 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  $\beta$  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  $\Phi$  4 (produits  $\Phi$  5), puis 1989 (produits  $\Phi$  6), et 1992 (produits  $\Phi$  7) ont été analysés en parallèle pendant l'été 1993.

Par ailleurs, une partie des grains récoltés en 1989 (produits  $\Phi$  6) avait déjà été testée en 1991 [4].

• **Grains issus du croisement diallèle** : les grains  $\Phi$  6 (prélevés sur les individus de génération  $\Phi$  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  $\Phi$  7, issus du croisement entre les parents  $\Phi$  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  $5 \times 4$  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  $\Phi$  7), soit deux ans ou quatre ans (récolte 1989, respectivement /a et /b, produit  $\Phi$  6), soit cinq ans (récolte 1988, produit  $\Phi$  5).

Tous les électrophorogrammes 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 électrophorogrammes.

Si le nombre d'autofécondations était cause d'une évolution régulière des bandes, les produits successifs  $\Phi$  5,  $\Phi$  6,  $\Phi$  7 devraient présenter des spectres progressifs, avec augmentation, ou diminution cohérente. Ainsi, dans cette dernière éventualité, la récolte 1989 (produit  $\Phi$  6) devrait amener à un nombre plus restreint de bandes que celle de

1988 (produit  $\Phi$  5), ce qui n'est pas le cas, alors que pour les grains récoltés en 1992 (produit  $\Phi$  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  $\Phi$  6, les grains analysés ici sont donc les produits directs issus du croisement. Nous considérerons les autofécondations  $\Phi$  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 évanescence 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.

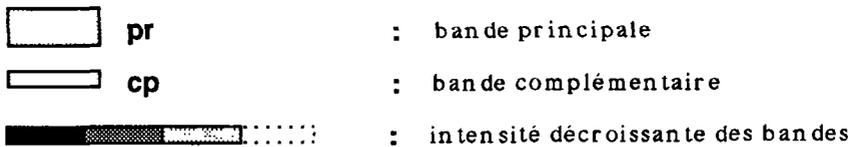
Remarquons que, outre les fréquentes dissymétries d'expression observables selon le sens de croisement, des bandes **cp** apparaissent quelquefois à partir de parents qui ne présentent que **pr**. Ainsi en est-il de TG1 (+1 **cp** intense) et de G1T (+ 2 **cp** dont une intense, et l'autre faible) ou 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 évanescence. Ce cas se reproduit encore pour G1G2, avec 2 **cp** très faibles.

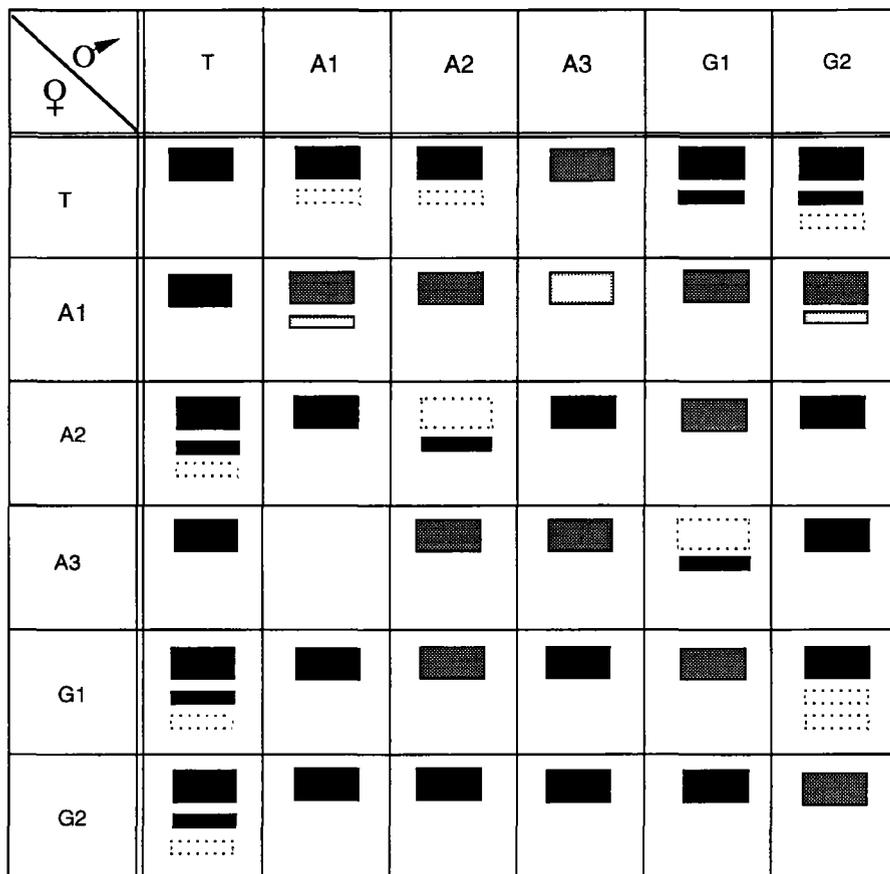
Ajoutons que A3 et G1, qui ne présentent qu'une **pr**, aboutissent à la création de A3G1 pour lequel la **pr** disparaît presque au profit d'une **cp** intense, cette expression diffère d'ailleurs de celle du réciproque G1A3 qui n'a qu'une **pr** intense.

Chez les grains issus de croisement, 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).

série	1988 Φ5 5 ans	1989 a Φ6 2 ans	1989 b Φ6 4 ans	1992 Φ7 1 an
T				
A1				
A2				
A3				
G1				
G2				



**Figure 1.** Électrophorégrammes des  $\beta$  amylases du grain pour les autofécondations des vitro-variants et du témoin. Comparaison des grains issus des récoltes : 1988 (produits  $\Phi 5$ , grains de 5 ans), 1989 (produits  $\Phi 6$ ), 1989/a : analysé en 1991 (grains de 2 ans), 1989/b : analysé en 1993 (grains de 4 ans), 1992 (produits  $\Phi 7$ , grains de 1 an). Dans la majorité des cas, il apparaît une bande principale **pr**, il peut aussi y avoir des bandes complémentaires **cp**.



**pr** : bande principale  
**cp** : bande complémentaire  
 : intensité décroissante des bandes

**Figure 2.** Électrophorogrammes des  $\beta$  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 électrophorogrammes des  $\beta$  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 descendance 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). Hérité épigénique de vitrovariants obtenus par haplodiploïdisation chez l'orge (*Hordeum vulgare*). Analyse des croisements diallèles et de leurs descendance 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  $\beta$  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). Héritéité 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 *Lycopersicon 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 haploïdes 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.



# 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 succinct 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 accélérerait l'introgresion 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 héréditaires, 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 vitrovations ou des phénomènes de sélection *in vitro*, conduisant à des distorsions par rapport aux disjonctions observées en autofécondation (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 vitrovariations 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 brocolis, 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 ambiguïté 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<sup>-1</sup>. 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 <i>et al.</i> [74]
UM-UT	PC puis MI	Orge	Igri	Hoekstra <i>et al.</i> [35]
UM-BJ	PC puis MI	Orge	Igri and Gimpel	Mordhorst and Lörz [46]
BJ-BM	MI	Orge	Sabarlis	Wei <i>et al.</i> [69]
UT-BJ	PC puis MI	Riz	Type Indica	Cho and Zapata [9]
UJ-UM	SP	Riz	Types Indica and Japonica	Datta <i>et al.</i> (1990) [16]
UT	MI	Maïs	Seneca 60	Coumans <i>et al.</i> [13]
UT-BJ	MI	Maïs	DH5 × DH7	Gaillard <i>et al.</i> [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 <i>et al.</i> [40]
UT-BJ	MI	Colza	Topaz	Pechan and Keller [53]
BM-T	MI	Chou blanc		Cao <i>et al.</i> [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'hydrolysate 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<sup>-1</sup>, 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 Igrî 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 Igrî. 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 régèrent 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 proplastides en amyloplastides 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 amyloplastides étant observables pendant toute la gamétogenèse. Ces organites cytoplasmiques sont connus pour ne pas pouvoir se différencier *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. Tuveesson *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'androgénèse 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'androgénèse *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 androgénèse qu'en gynogénèse *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'androgénèse *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 environnementaux (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 internationaux 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 première 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 Buysier 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). Embryogénèse 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 chloroplasts. *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 countries*, 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, Voorrips RE, Visser DL, Custer JBM (1992). Microspore 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 haploids : 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 induction 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. Jähne 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*. Nij 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 development 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'anthere ou isolé de l'anthere. *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, Gnanbe 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'haplo-diploïdisation 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, Quéfier 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, Quéfier 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 haplo-diploïdes 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'haplodiploidisation. Analyses des  $\beta$  amylases chez les croisements dialléles*. Actes du colloque AUELF 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. Tuvevsson IKD, Pedersen S, Andersen SB (1989). Nuclear genes affecting albinism in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Theor Appl Genet* 78 : 879-883.
67. Tuvevsson 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 Pflanzenphysiol* 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, Rosnagel 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.

