

7

Les protéines de choc thermique : un modèle moléculaire de réponse des génomes végétaux aux stress abiotiques

P. du JARDIN*, C. LEJOUR**

* *Laboratoire de génétique et amélioration des plantes, faculté des sciences agronomiques, 5800 Gembloux, Belgique*

** *Station d'amélioration des plantes, Centre de recherches agronomiques, 4 rue du Bordia, 5800 Gembloux, Belgique*

Résumé

La réponse au choc thermique est un phénomène général dans le monde vivant, caractérisé par la production rapide et transitoire de protéines spécifiques à une température supra-optimale. Cette réorientation des synthèses protéiques implique l'adoption par la cellule d'un programme d'expression génique original : répression des gènes « constitutifs » et activation des gènes de choc thermique. L'implication simultanée de processus de régulation transcriptionnelle, post-transcriptionnelle et traductionnelle souligne le dynamisme de cette réponse. Chez les végétaux, le clonage, la modification *in vitro* et la fusion de gènes par les technologies du DNA recombinant, combinés aux outils de transformation génétique, ont permis une analyse fine des séquences impliquées dans ces processus de régulation génique.

Introduction

La synthèse des protéines de choc thermique (HSP, *Heat Shock Proteins*) est une réponse cellulaire très rapide, transitoire, stimulée lorsque la température excède de 8-10 °C la température optimale de croissance. Elle implique la production de polypeptides généralement classés en deux catégories de poids moléculaire et localisés dans divers compartiments subcellulaires : cytoplasme, noyau, mitochondries, plastides.

La parenté entre les protéines de choc thermique de bactéries, levures et eucaryotes supérieurs végétaux et animaux est remarquable. Un degré de conservation similaire à celui observé pour la protéine de choc thermique HSP 70 n'est rencontré que dans de rares cas, parmi lesquels le cytochrome c, la sous-unité β du complexe ATP-synthétase et des sérines protéases, suggérant une fonction physiologique importante; celle-ci demeure obscure, même si des faits récents éclairent quelque peu la signification fonctionnelle de ces protéines, sur lesquels nous reviendrons. Cet apparent paradoxe peut être mieux compris si l'on considère les premières motivations des biologistes à se pencher sur les protéines de choc thermique. L'induction simultanée (du moins considérée comme telle dans les limites des premières investigations) des produits d'expression de gènes dispersés dans le génome apparut à l'origine comme un excellent modèle de régulation génique coordonnée, tant chez les eucaryotes que chez les procaryotes.

La façon dont un génome peut répondre à un stimulus diffus comme une élévation de température — par opposition à un stimulus hormonal par exemple, moléculairement bien défini — aussi drastiquement et aussi rapidement (en moins de quelques minutes) est d'un intérêt très général. Le fait que des organismes distants répondent au choc thermique par l'induction de protéines semblables permet de comparer les gènes dirigeant leur synthèse et d'en dégager des motifs structuraux communs, potentiellement impliqués dans la fonction de leurs produits d'expression et surtout dans leur régulation.

L'expression d'un gène est un processus à étapes multiples et chacune d'elles peut agir comme levier de régulation. La réorientation des synthèses protéiques induite par un stress n'est permise que par des processus de blocage-déblocage impliquant une ou plusieurs de ces étapes. C'est sous cet angle que nous envisagerons la réponse au choc thermique. Nous décrirons comment les processus transcriptionnels, post-transcriptionnels, traductionnels et post-traductionnels sont affectés par l'élévation de température et comment ils permettent de façon aussi rapide une réorientation des synthèses cellulaires vers la production des protéines de choc thermique (fig. 1).

Notre analyse sera focalisée sur les végétaux, mais fera largement appel aux faits significatifs relevés dans les autres systèmes, dont la drosophile chez laquelle la réponse HS est très bien connue. La signification physiologique et métabolique de ces protéines et l'utilisation des gènes *heat shock* par génie génétique sera esquissée en guise de conclusion.

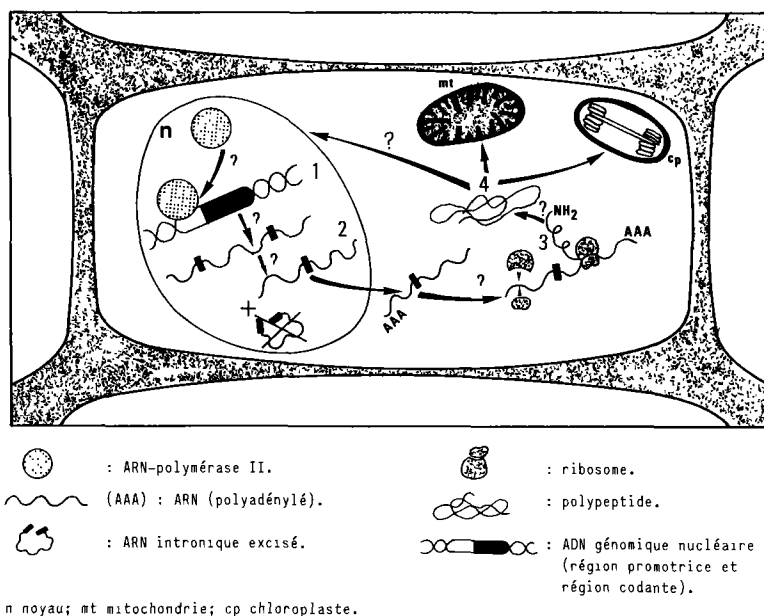


Figure 1. Représentation schématique des étapes de l'expression du gène dans une cellule végétale : 1 transcription, 2 épissage des transcrits primaires, 3 traduction, 4 localisation intra-cellulaire accompagnée ou non de modifications post-traductionnelles. Les points d'interrogation situent les étapes affectées par un choc thermique et permettant l'expression spécifique des protéines de choc thermique et leur localisation intra-cellulaire correcte, ainsi que la répression des protéines constitutivement exprimées.

Protéines et gènes *heat shock* (HS)

L'analyse électrophorétique des protéines synthétisées après un saut de température (jusqu'à une température sublétales, mais de 10 °C au moins au-dessus de la température normale de croissance) identifie de nombreuses protéines induites. Celles-ci peuvent être typiquement classées en deux catégories de poids moléculaire (65-115 kDa et 15-25 kDa) (fig. 2). Ce type de réponse a été décrite chez de nombreuses espèces appartenant à divers groupes taxonomiques importants : soja, maïs, riz, blé et autres céréales (dont le blé dur), pois, carotte, tournesol, colza...

La catégorie des protéines de bas poids moléculaire est particulièrement bien représentée chez les végétaux. Sur la base de leur poids moléculaire et de leur point isoélectrique, on distingue une trentaine de protéines par espèce.

La diversité interspécifique des protéines de bas poids moléculaire contraste avec la remarquable conservation des protéines de haut poids moléculaire. On observe de façon caractéristique au moins un polypeptide de 90-110 kDa, un ou deux de 80-90 kDa et deux ou trois de 68-75 kDa.

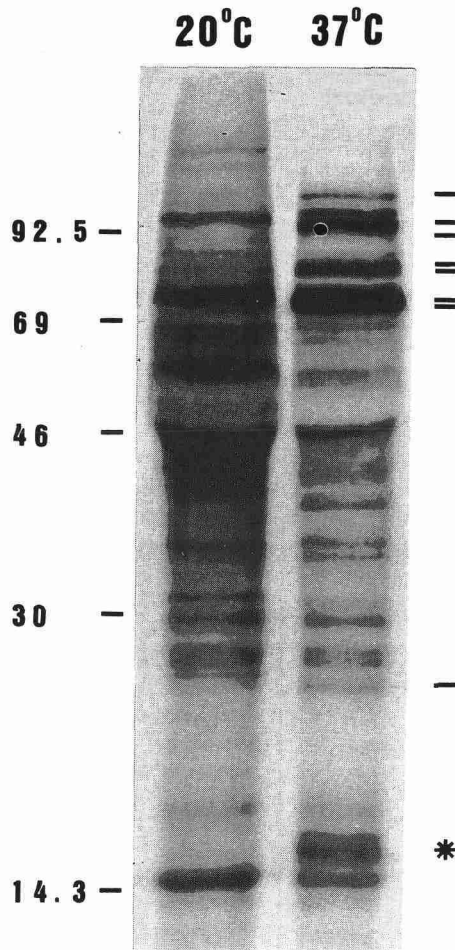


Figure 2. Réponse des synthèses protéiques à un choc thermique chez le blé. Des explants foliaires de *Triticum aestivum* cv Odéon ont été immergés dans une solution contenant de la ^{35}S -méthionine (25 $\mu\text{Ci/ml}$) à 20 °C et 37 °C. Après 1,5 h, les explants ont été rincés et les protéines solubles ont été extraites par broyage dans un tampon en présence d'un inhibiteur de protéinases (Leupeptine). Après dénaturation par ébullition en présence de sodium dodécyl sulfate et de β -mercaptoéthanol, les polypeptides ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide (15 %)-SDS en tampon Tris-Glycine. Les polypeptides radioactifs ont été révélés par autoradiographie après traitement fluorographique. Les marqueurs de poids moléculaire (kDa) sont positionnés à gauche. Les tirets à droite indiquent les protéines de choc thermique. L'astérisque montre la zone d'induction des protéines de bas poids moléculaire (pour des détails techniques voir du Jardin *et al.*, 1990).

Plusieurs séquences cDNA et génomiques (gènes HSP) ont été clonées chez les végétaux [31]. Le gène *hsp70* de maïs a été cloné par homologie avec une séquence *hsp70* de drosophile [27]. La séquence en acides aminés déduite est homologue à 68 % avec celle d'HSP70 de drosophile. Les gènes végétaux codant pour les protéines de bas poids moléculaire appartiennent à plusieurs familles multigéniques, distinctes selon des critères de séquence nucléotidiques et contenant 3 à 13 gènes [14, 24]. Certains éléments de structure impliqués dans l'expression de ces gènes seront décrits ultérieurement.

Niveaux de régulation de l'expression des gènes *heat shock* (*hsp*)

Transcription

Le choc thermique provoque l'accumulation de mRNA spécifiques (fig. 3). La modification des taux de transcription des gènes correspondants rend compte pour une bonne part de ces observations. Nous verrons toutefois, dans un second temps, que la modulation de la stabilité des messagers participe à cette régulation.

Structure de la chromatine et initiation de la transcription

L'initiation de la transcription, la première des étapes menant au produit d'expression du gène, est soumise à un contrôle développemental et environnemental étroit chez de nombreux gènes d'eucaryotes supérieurs. L'aptitude de l'ARN-polymérase II à interagir avec le promoteur du gène est fonction de la configuration de ce promoteur, de la structure de la chromatine dans la région considérée.

L'activation transcriptionnelle des gènes *heat shock* a très tôt été suggérée chez la drosophile par l'observation cytologique de la redistribution des *puffs* (des régions épaissies) au niveau des chromosomes polyténiques des glandes salivaires au cours du stress thermique [25]. L'hypothèse faisant des *puffs* les sites de transcription active fut confirmée dans le cas des gènes *heat shock* [26]. Le parallèle fut établi entre les variations du *puffing* et celles des profils de protéines après le choc thermique [39].

Cette décondensation des chromosomes associée à la transcription active des gènes est observée dans de nombreux systèmes. Il apparaît toutefois que ces structures relâchées sont une condition nécessaire à l'initiation de la transcription, mais nullement une condition suffisante. Il y a lieu de parler de « compétence transcriptionnelle » plus que d'activité transcriptionnelle. Cette accessibilité des régions promotrices à l'ARN polymérase II peut être approchée expérimentalement par l'utilisation de nucléases. La mise en évidence de leur plus ou moins grande capacité à hydrolyser le DNA de la région promotrice considérée est une mesure directe de son accessibilité à d'autres protéines (ARN-polymérase II et facteurs protéiques de régulation). Les mêmes outils enzymatiques permettent d'ailleurs d'identifier au nucléotide près les sites de liaison de ces facteurs au DNA (techniques de *DNA Footprinting*).

Chez les végétaux, un remarquable exemple est fourni par le gène *adh-1* de maïs (alcool-déshydrogénase) activité en conditions anoxiques [9, 19]. L'utilisation

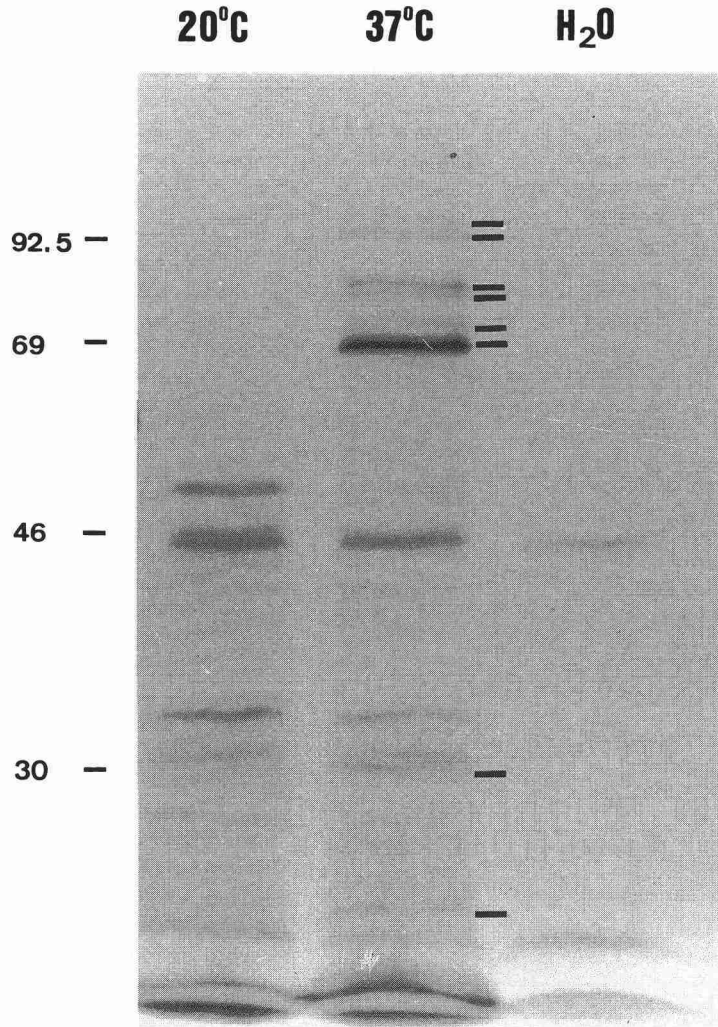


Figure 3. Analyse de l'évolution de la population de mRNA après un choc thermique chez le blé. Deux plantes entières ont été incubées aux températures constantes de 20 °C et 40 °C; après 3 h, les feuilles ont été brutalement congelées, les RNA totaux ont été extraits et traduits *in vitro* dans des lysats de réticulocytes de lapin. L'analyse électrophorétique des produits a été réalisée comme décrit à la figure 2 (pour des détails techniques voir du Jardin *et al.*, 1990). Les marqueurs de poids moléculaire (kDa) sont positionnés à gauche. Les produits de traduction *in vitro* des messagers induits par le choc thermique sont indiqués par des tirets. H₂O désigne le contrôle négatif (lysate sans RNA exogène).

d'endonucléases (DNaseI et endonucléases de restriction) a permis de corréler l'état transcriptionnel du gène à son hypersensibilité aux nucléases. Les noyaux de différents tissus soumis ou non au stress anoxique sont purifiés, incubés avec ces enzymes, lysés, et le DNA extrait et purifié est analysé par *hybridation Southern* avec une sonde ADH marquée radioactivement. La fréquence et les sites de coupure sont ainsi déterminés. L'hypersensibilité est ici liée à l'activation de la transcription et tient probablement à la désorganisation et/ou au déplacement de nucléosomes nécessaire à l'interaction d'éléments du promoteur avec des facteurs de trans-activation.

La situation des gènes *heat shock* est différente de celle décrite, même si nous retrouvons les mêmes acteurs : nucléases, éléments de promoteur, nucléosomes, facteurs de transactivation.

Les faits sont tirés de la drosophile [8]. A la température normale de croissance, une protéine est fixée sur la *TATA-box*, un élément de promoteur situé directement en amont du site d'initiation de la transcription. Plus en amont, un nucléosome est très précisément positionné. Entre les deux, la région du DNA est trop courte pour permettre le positionnement d'un deuxième nucléosome; la région est constitutivement hypersensible à la DNase I. Une molécule d'ARN polymérase II est associée au complexe formé par la *TATA-box* et sa protéine de liaison, sans pouvoir toutefois initier son activité de synthèse. Après un choc thermique, la position du facteur lié à la *TATA-box* est légèrement altérée. Au niveau du site constitutivement hypersensible à la DNase I, entre la *TATA-box* et le nucléosome, une nouvelle protéine est fixée, le facteur *heat shock*, dont nous reparlerons. Au-delà du nucléosome maintenu dans sa position initiale après le choc thermique, un deuxième site hypersensible constitutif fixe un deuxième facteur *heat shock*. Les deux sites de liaison au facteur *heat shock* sont probablement proches l'un de l'autre, *via* la formation d'une boucle stabilisée par le nucléosome. Les deux facteurs HS fixés sont en interaction. Cette configuration spatiale de la région en amont du gène de structure peut expliquer l'action coopérative de facteurs transactivateurs fixés en position distale par rapport au site d'initiation de la transcription. La situation décrite et correspondant au gène HSP26 de drosophile rejoint les premières observations relatives aux gènes HSP70 et HSP83 de la même espèce [46].

Le modèle attire donc l'attention sur l'importance du positionnement précis du nucléosome, celui-ci délimitant avec le facteur de liaison à la *TATA-box* une région exposée capable, après choc thermique, d'interagir avec le transactivateur HS dont la fixation seule permet l'initiation de la transcription. Par rapport à d'autres modèles d'activation transcriptionnelle impliquant la déstabilisation et le déplacement de nucléosomes au niveau de la région promotrice, le modèle *heat shock* permet peut-être une réponse particulièrement rapide. Il faut moins d'une minute pour détecter les mRNA-HS après un saut de température.

Compte tenu de la parenté de ces gènes de drosophile avec les gènes végétaux, il y a de bonnes raisons de penser que des mécanismes similaires sinon identiques opèrent chez les plantes, en l'absence de données expérimentales directes. La présence de consensus oligonucléotidiques dans les promoteurs végétaux et de drosophile et correspondant précisément au site de fixation du facteur HS suggèrent fortement l'existence de mécanismes communs d'activation transcriptionnelle.

Régulation positive de l'initiation de la transcription par le facteur de transactivation HSTF (Heat shock transcription factor)

La comparaison des régions promotrices de gènes thermo-induits de différentes origines taxonomiques permet de dégager un consensus de 14 pb et situé à distance variable de la *TATA-box* et du site d'initiation de la transcription. Ce consensus est appelé motif HSE (*Heat Shock Element*). Parallèlement à l'analyse des séquences, l'étude de l'activité de promoteurs tronqués d'HSP70 de drosophile transfectés en cellules COS (des cellules de singe contenant une portion du génome viral de SV40 et permettant un taux de réplication élevé d'un plasmide vecteur) permet l'identification d'un segment de DNA indispensable à l'expression thermo-induite d'HSP70 dans ce système, comprenant la *TATA-box* et un court fragment de moins de 20 pb [20]. Ce segment comprend précisément un motif HSE.

Chez la drosophile, en utilisant un système de transformation basé sur l'élément transposable P pour introduire en système homologue des promoteurs *heat shock* délétés, Dudler et Travers [6] démontrent qu'un segment plus long est ici nécessaire à une activité du gène comparable à celle d'HSP endogènes. La présence d'un deuxième motif HSE sur ce segment explique cette observation.

Les gènes *heat shock* comprennent tous plusieurs motifs HSE. La fonction participative des motifs situés en position distale par rapport à la *TATA-box* serait plus nette dans des situations où le motif proximal est moins bien conservé ou particulièrement éloigné de la *TATA-box*.

L'activation thermique d'HSP70 de *Xenopus* transfecté en cellules de mammifères n'est pas influencée par la séparation du motif HSE et de la *TATA-box*. Inséré en amont du gène de la β -globine humaine, ce motif stimule nettement la transcription en hyperthermie. La duplication de séquences HSE dans la région flanquante 5' d'HSP70 de drosophile augmente l'effet d'induction thermique en système homologue [2]. Enfin, l'orientation du motif HSE par rapport à la *TATA-box* n'est pas critique [37]. De telles évidences (effet « additif », grande liberté de localisation et d'orientation) incitent à considérer ce motif HSE comme un *enhancer* typique, analogue à ceux décrits initialement chez les mammifères et impliqués dans la spécificité tissulaire de l'expression des gènes et dans leur régulation par les facteurs de l'environnement, ainsi que dans l'expression de gènes viraux. Chez les végétaux de telles séquences à activité *enhancer* sont décrites chez les gènes photo-inductibles [38].

La fonction du motif HSE est d'interagir avec le facteur protéique de transactivation HSTF. La technique de *DNA footprinting* permettant de définir les sites nucléotidiques protégés de l'action des nucléases par la fixation de protéines de régulation identifie jusqu'à dix segments résistants chez les gènes hsp de drosophile [18] et tous partagent précisément le consensus HSE C--GAA--TTC--G identifié par l'analyse comparée des gènes hsp. Par chromatographie d'affinité avec oligonucléotides fixées, plusieurs candidats HSTF ont été purifiés, chez la drosophile [47], la levure [33] et chez l'homme (à partir de cellules HeLa) [12].

Leur fonction d'activateur transcriptionnel de gènes HS a pu être mise en évidence *in vitro* et *in vivo* (voir les mêmes références). Malgré la grande similitude des gènes hsp et de leurs produits d'expression chez la drosophile et la levure, il apparaît dès à présent que les mécanismes de régulation transcriptionnelle diffèrent chez ces deux organismes. Il semble en effet que HSTF se lie au promoteur HS

à la température normale de croissance chez la levure et que la transcription est stimulée par modification post-traductionnelle (phosphorylation) du facteur HSTF lié au DNA, permettant probablement une interaction efficace de ce facteur avec d'autres composantes de l'appareil de transcription [34]. Ceci contraste avec la situation déjà décrite chez la drosophile et corrélant l'activation transcriptionnelle avec la liaison de HSTF au DNA. La différence entre les poids moléculaires des facteurs HSTF des différentes origines taxonomiques est compatible avec cette apparente divergence des mécanismes d'activation. Il est toutefois à noter que les facteurs HSTF de levure et de cellules HeLa semblent manifester les mêmes spécificités quant aux séquences reconnues [33].

Chez les végétaux

Le séquençage des régions 5'-flanquantes des gènes hsp végétaux codant pour les protéines de bas et haut poids moléculaire [27, 24] révèle la présence de motifs homologues au consensus HSE de drosophile, en copies multiples et à une distance variable de la *TATA-box*, mais concentrés dans la région de 150 pb en amont de celle-ci. La présence de motifs HSE homologues suggère d'identiques mécanismes d'activation transcriptionnelle.

Les techniques de transformation ont permis de tester directement cette hypothèse. Le gène marqueur *nptII* codant pour la néomycine phospho-transférase fusionné au promoteur *heat shock* d'HSP70 de drosophile a été introduit dans le génome du tabac via *Agrobacterium tumefaciens* [35]. La démonstration de l'inductibilité thermique de l'expression du marqueur dans cette construction souligne le rôle clé du contrôle transcriptionnel de la réponse au choc thermique et l'extraordinaire conservation des mécanismes d'activation entre des organismes aussi distants que le tabac et la drosophile. Rien d'étonnant dès lors qu'un promoteur HS de maïs fonctionne chez le pétunia [27] ou qu'un promoteur de soja fonctionne chez le tournesol [29].

Tout comme pour les gènes hsp de drosophile et de Xenope, les régions promotrices essentielles à l'inductibilité thermique de l'expression des gènes végétaux ont été analysées par délétions partielles des promoteurs *heat shock* et détermination de l'activité de ces promoteurs tronqués dans des plantes transgéniques [1, 13]. Les résultats convergent et soulignent à nouveau le rôle essentiel des motifs HSE dans la transcription thermo-inductible des gènes *heat shock*.

L'analyse des séquences nucléotidiques des régions 5'-flanquantes des gènes codant pour les protéines HS de bas poids moléculaire [28] révèle la présence de répétitions très riches en bases A+T en amont de la région du promoteur comprenant les motifs HSE. Cette observation est sans précédent chez les gènes *heat shock* d'autres organismes. Si cette région riche en A+T n'est pas indispensable à la stimulation de la transcription par l'hyperthermie, sa présence assure un haut niveau de transcription [1]. La fonction précise de ces séquences n'est pas encore connue. La complexion de cette région avec des protéines nucléaires [30] est en toute probabilité impliquée dans son activité *enhancer*.

Notons toutefois que les régions SAR (*Scaffold-Attached Region*) chez les eucaryotes contiennent des motifs riches en A+T [10]. Il s'agit de séquences extragéniques étroitement associées à des unités de transcription, jouant un rôle

structural dans l'organisation nucléaire et qui permettrait une interaction optimale des cis-éléments de régulation des gènes avec l'appareil de transcription.

Processus post-transcriptionnels

Chez la drosophile, il a été suggéré que la réorientation rapide des synthèses protéiques en hyperthermie et le retour à une situation normale après le stress était permise par l'intervention de processus post-transcriptionnels [21]. Ceux-ci impliquent les modifications après synthèses des transcrits primaires des gènes et en particulier l'excision des introns (épissage). Ces modifications interviennent lorsque le RNA forme avec des protéines nucléaires un complexe appelé « particule ribonucléoprotéique » (hnRNP : *heterogeneous nuclear ribonucleic protein particle*).

Pendant le stress thermique, le blocage de l'assemblage de ces particules hnRNP serait responsable de celui de processus post-transcriptionnels et plus particulièrement de l'épissage. Les transcrits *heat shock* ne seraient pas concernés puisqu'ils ne contiennent pas de séquences introniques. Le seul gène *heat shock* de drosophile contenant un intron, HSP83, est transcrit à la température contrôlée et la synthèse d'HSP83 serait régulée au niveau traductionnel. Les gènes hsc (*heat shock cognate*) sont des gènes tout à fait homologues aux gènes hsp, mais qui ne sont pas régulés par la chaleur. Ils ont précisément pour particularité de contenir des introns. Aussi séduisant que paraisse ce modèle de blocage post-transcriptionnel de l'expression des gènes interrompus, il ne peut être appliqué aux plantes : quelques gènes hsp végétaux contiennent des introns. Le gène HSP70 de maïs contient un intron localisé à l'endroit précis de celui du gène hsc1 de drosophile, l'homologue hsc d'HSP70 chez l'insecte [27]. Chez le soja, une séquence codant pour un polypeptide *heat shock* de 27 kDa reconnaît deux transcrits, dont l'un serait un précurseur non épissé [3]. Chez le pétunia, des transcrits HSP70 non-épissés sont induits par un traitement au cadmium [45].

À côté du problème de la répression des synthèses protéiques constitutives après le saut de température, il y a celui de la répression des synthèses *heat shock* après retour à une température normale. Chez la drosophile, la répression de la synthèse d'HSP70 est opérée partiellement au niveau post-transcriptionnel, par déstabilisation des HSP70-mRNA, un processus auquel les protéines HS participent elles-mêmes [5].

Une grande instabilité des messagers HS est en partie responsable de leur très bas niveau à la température normale de croissance. Il a été démontré que le HSP70-mRNA produit sous le contrôle d'un promoteur métallothionéine (inducible par les métaux lourds) est hautement instable à 25 °C et stabilisé en hyperthermie [22].

Avant, pendant et après le stress, les processus régissant la maturation et la stabilité des messagers participeraient donc activement à l'expression sélective et étroitement régulée des gènes hsp.

Traduction

Chez les eucaryotes, la traduction du mRNA peut également être sujette à une régulation fine au cours du développement et en réponse aux stimuli de l'envi-

ronnement. Dans certains cas, la traduction sélective de mRNA implique la reconnaissance par des facteurs d'initiation d'une structure particulière au niveau de la séquence *leader* non traduite du messenger (cette région est comprise entre l'extrémité 5' du messenger et le codon d'initiation).

Les messagers HS ont la particularité d'avoir une séquence *leader* relativement longue (200 nucléotides en moyenne) et riche en résidus A. Cette structure est probablement impliquée dans l'initiation sélective de la traduction des messagers HS observée en hyperthermie. Les messagers constitutivement exprimés ne sont pas dégradés après le saut de température, ils sont au contraire particulièrement stables, mais non reconnus par la machinerie de traduction [15].

Des essais de traduction *in vitro* de mélanges de messagers constitutifs et HS dans des lysats cellulaires préparés à partir de cellules de drosophile « contrôle » ou soumises à un choc thermique ont démontré que le système de traduction est modifié par l'hyperthermie et reconnaît spécifiquement les messagers induits [36]. Cette modification toucherait les ribosomes puisque l'ajout de ribosomes purifiés de cellules incubées à température normale à des lysats préparés à partir de cellules stressées rétablit la traduction des messagers constitutifs dans ces derniers [11]. La déphosphorylation de la protéine ribosomique 6S joue peut-être un rôle incompréhensible, bien que chez la tomate l'absence de synchronisme strict entre cet événement et la réorientation des synthèses protéiques tende à nier un lien causal direct [28].

L'importance de la séquence *leader* des messagers HS dans l'expression des gènes thermo-induits a été remarquablement mise en évidence chez les végétaux. Schöffl et ses collaborateurs [31] ont fusionné le gène rapporteur CAT (chloramphenicol acétyl transférase) à un promoteur *heat shock* de soja, ces deux séquences étant ou non séparées par le *leader* du gène HS. Ils ont transformé *N. tabacum* avec ces constructions et ont analysé comparativement les niveaux des transcrits et l'activité CAT lors d'un choc thermique et du retour à des conditions normales. De façon tout à fait intéressante, l'activité CAT n'est pas détectée en hyperthermie chez les plantes contenant la construction dépourvue de *leader*, et ce malgré la présence du messenger CAT, contrairement à la situation observée avec la construction incluant le *leader* et caractérisée par une nette stimulation thermique de l'activité CAT chez les plantes transgéniques. La séquence *leader* est donc essentielle à la traduction efficace du messenger CAT en hyperthermie.

Localisation intra-cellulaire et modification post-traductionnelle des protéines de choc thermique

La localisation intra-cellulaire des protéines de choc thermique peut être analysée par fractionnement d'un lysat cellulaire après marquage radioactif *in vivo* des polypeptides synthétisés au cours d'une incubation à température supra-optimale. Les polypeptides marqués sont extraits des différentes fractions et analysés par électrophorèse. Cette approche [4, 16] impose la prudence : le fractionnement de polypeptides avec un type particulier d'organites cellulaires peut résulter d'une fixation non spécifique de protéines à la surface de ces organites ; de plus certaines protéines HS forment, chez les végétaux, de grands agrégats avec des coefficients de sédimentation proches de ceux d'organites cellulaires [17].

Une autre approche qui fut appliquée à l'analyse de la localisation chloroplastique de protéines HS, consiste à synthétiser des précurseurs par traduction *in vitro* de mRNA polyadénylé et à analyser l'importation de tels précurseurs dans des chloroplastes purifiés [41]. Le clivage protéasique de l'extension amino-terminale nécessaire au transport dans le plaste, mis en évidence par l'analyse de mobilités électrophorétiques des précurseurs et des produits, est un critère fiable de localisation intra-chloroplastiques. Un tel système d'importation *in vitro* est également applicable aux mitochondries. Enfin, les techniques d'immunodétection et en particulier l'immunofluorescence indirecte, ont été utilisées pour la localisation cytologique *in situ* des protéines HS [40]. HSP70 a une localisation nucléaire et plus particulièrement nucléolaire, chez la drosophile [40] et le soja [16].

Parmi les protéines de bas poids moléculaire, certaines sont transportées dans le chloroplaste; leur localisation à l'intérieur de l'organite n'est pas claire, certains les associant à la fraction soluble, d'autres aux thylakoïdes [41, 42]. Les précurseurs de ces protéines contiennent des extensions amino-terminales présentant certaines propriétés typiques de celles des séquences-transit décrites (richesse en résidus Serine, absence de résidus acides) [42].

A côté des protéines HS de bas et haut poids moléculaire, un groupe de protéines intermédiaires (56-62 kDa) a plus récemment attiré l'attention. Ubiquistes, codées par le génome nucléaire, elles sont localisées dans les plastes et les mitochondries et joueraient un rôle essentiel à une température de croissance normale.

Si certaines protéines sont irréversiblement associées aux organites comme les protéines HS de bas poids moléculaire transportées dans les chloroplastes et les mitochondries, il est particulièrement intéressant d'observer qu'un retour rapide à une température normale peut entraîner, comme dans le cas d'HSP70, une dissociation du compartiment subcellulaire. Un choc thermique ultérieur provoque à nouveau le transport d'HSP70 dans le noyau [40]. Autre argument en faveur de la dépendance de la localisation à l'égard de la température : un traitement à l'arsenite induit HSP70 chez le soja, mais la protéine n'est pas transportée dans le noyau. Un choc thermique appliqué dans un second temps provoque la pénétration dans le noyau [16]. La même observation a été réalisée chez la drosophile. Toutefois, la stricte dépendance du transport nucléaire d'HSP70 à l'égard de la température est niée par l'observation de Velazquez et Lindquist [40] relative à l'induction et à la localisation nucléaire correcte d'HSP70 lors du rétablissement d'une situation normale après un stress anoxique chez la drosophile.

La formation de grands agrégats périnucléaires par des protéines HS de bas poids moléculaires semble dépendre également de la température, ces protéines étant présentes sous forme soluble dans le cytoplasme en conditions thermiques normales.

Conclusion et perspectives

La réponse moléculaire au choc thermique est un phénomène tout à fait remarquable tant par son dynamisme que par son caractère ubiquiste.

Cette réponse n'est pas spécifique de l'hyperthermie, d'autres stress chimiques (arsenite, cadmium) et physiques (anoxie, stress hydrique, etc.) induisent parfois les mêmes protéines, poussant même certains auteurs à proposer les séquences hsp clonées comme sondes moléculaires permettant de diagnostiquer un état général de stress physiologique [3]. D'autres assimilent le stress thermique à un stress oxydatif, argumentant que bon nombre d'agents inducteurs ont pour point commun de perturber les conditions normales d'oxydo-réduction au sein de la cellule. A côté de ces relations entre stress abiotiques, la découverte de séquences homologues au consensus HSE dans les régions promotrices de gènes PR-1 [23], induits par de nombreux stimuli environnementaux et dont l'expression (production des protéines PR ou *Pathogenesis Related*) est plus particulièrement associée aux réactions d'hypersensibilité et à la résistance à des parasites viraux bactériens et fongiques, et permet d'établir un parallèle entre la réponse *heat shock* et celle aux stress biotiques. Le parallèle doit probablement être limité aux seuls mécanismes d'activation transcriptionnelle, les structures primaires des protéines HS et PR ne présentant pas d'homologie.

La signification physiologique de ces protéines reste mal perçue. Des arguments plaident en faveur de leur implication dans la thermotolérance, mais les cas d'acquisition de thermotolérance sans que soient détectée la moindre protéine de choc thermique sont pour le moins intrigants. Seule une connaissance approfondie de leur signification moléculaire, peut-être très diverse comme le sont les protéines elles-mêmes, permettra d'évaluer leur importance dans les différentes conditions physiologiques.

A cet égard, des observations récentes ouvrent de nouvelles voies d'investigation. Des protéines HS codées par les gènes de la famille d'HSP70 et HSP60 s'avèrent indispensables à certains transports transmembranaires ainsi qu'à l'édification de complexes protéiques multimériques comme la ribulose biphosphate carboxylase/oxygénase chez les plantes. L'idée centrale qui émerge de ces observations est que les protéines HS interviendraient activement dans l'adoption par d'autres polypeptides des configurations spatiales indispensables à leur interaction efficace avec les systèmes de transport ou avec d'autres polypeptides avec lesquels ils s'associent en complexes fonctionnels. Chez les procaryotes, on connaissait depuis longtemps le rôle indispensable des protéines thermoinductibles dans l'assemblage des virions de Lambda. Des homologies existent entre ces protéines et des protéines HS en eucaryotes. Lors d'un choc thermique, les protéines HS joueraient un rôle de stabilisation des structures protéiques.

Une connaissance approfondie des cibles moléculaires et cellulaires des protéines HS, et des mécanismes auxquels elles participent doit précéder toute tentative d'utilisation de leurs gènes de structure en amélioration des plantes.

L'efficacité grandissante des techniques de transformation et la grande conservation des gènes HSP permettant un clonage aisé et fondant les espoirs de voir un gène isolé fonctionner en système hétérologue, devraient faciliter l'utilisation de ces gènes par génie génétique. Reste toutefois à identifier les gènes HSP hypothétiquement responsables d'une meilleure tolérance variétale à l'égard de la chaleur, à les isoler et à analyser les conditions de leur expression phénotypique. Là (presque) tout est à faire.

Les séquences de régulation ont un intérêt plus immédiat. Pour s'insérer dans les techniques d'amélioration des plantes cultivées, le génie génétique est confronté

à la nécessité de contrôler l'expression des gènes introduits au cours du développement et en réponse aux stimuli environnementaux; le clonage de séquences de régulation répondant à des stress physiologiques et parasitaires apparaît dès lors comme une étape importante dans cette perspective.

Enfin, la réponse au choc thermique n'est pas qu'un remarquable modèle théorique de la dynamique d'expression du génome; elle attire l'attention du biologiste et de l'améliorateur sur les bases moléculaires complexes de l'homéostasie, cette aptitude des organismes à maintenir l'intégrité et l'activité de leurs structures moléculaires et cellulaires dans un environnement en continuelles fluctuations.

La connaissance du déterminisme moléculaire et génétique de l'homéostasie apparaît donc comme essentielle au progrès d'une agriculture plus soucieuse de stabiliser les rendements que de les amener aux plus hauts niveaux potentiels.

Références

1. Baumann G, Raschke E, Bevan M, Schöffl F. (1987). Functional analysis of sequences required for transcriptional activation of a soybean heat shock gene in transgenic tobacco. *Embo J* ; 6 : 1161-66.
2. Bienz M, Pelham H. (1986). Heat shock regulatory elements function as an inducible enhancer in the xenopus hsp70 gene in oocyte. *Cell* ; 46 : 1037-42.
3. Czarnecka E, Edelman L, Schöffl F, Key JL. (1984). Comparative analysis of physical stress responses in soybean seedlings using cloned heat shock cDNAs. *Plant Mol Biol* ; 3 : 45-58.
4. Cooper P, Ho THD. (1987). Intracellular localization of heat shock proteins in maize. *Plant Physiol* ; 84 : 1197-1203.
5. Di Domenico BJ, Bugaisky GE, Lindquist S. (1982). The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and post-transcriptional levels. *Cell* ; 31 : 593-693.
6. Dudle R, Travers A. (1984). Upstream elements necessary for optimal function of the hsp70 promoter in transformed flies. *Cell* ; 30 : 517-528.
7. Du Jardin P, Lejour C, Jacquemin J-M. (1990). Heat shock RNAs in leaf and root explants of wheat. *Plant Physiol Biochem* ; 28 : 183-9.
8. Elgin SCR. (1988). The formation and function of DNase I hypersensitive sites in the process of gene activation. *Biol Chem* ; 263 : 19259-62.
9. Ferl RJ. (1985). Modulation of chromatin structure in the regulation of the maize Adhl gene. *Mol Gen Genet* ; 200 : 207-219.
10. Gasser SM, Laemmli UK. (1986). Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell* ; 46 : 521-530.
11. Glover L. (1982). Heat, shock induces rapid dephosphorylation of a ribosomal protein in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*.
12. Goldenberg CJ, Luo Y, Fenna M, Baler R, Weinmann R, Voellmay R. (1988). Purified human factor activates heat shock promoter in a HeLa cell-free transcription system. *J Biol Chem* ; 263 : 19734-39.

13. Gurley WB, Czarnecka E, Nagao RT, Key JL. (1986). Upstream sequences required for efficient expression of a soybean heat shock gene. *Mol Cell Biol* ; 6 : 559-565.
14. Key JL, Gurley WB, Nagao RT, Czarnecka E, Mansfield A. (1985). Multigene families of soybean heat shock proteins. In : eds Van Volten-Doting L., Groot GSP., Hall TC., *Molecular Form and Function of The Plant Genome*. Plenum Press New York and London, pp. 81-100.
15. Krüger C, Benecke B-J. (1981). *In vitro* translation of *Drosophila* heat shock and non-heat shock mRNAs in heterologous and homologous cell-free systems. *Cell* ; 23 : 595-603.
16. Lin CH, Roberts JK, Key JL. (1984). Acquisition of thermo-tolerance in soybean seedlings. *Plant Physiol* ; 74 : 152-160.
17. Nover L, Scharf KD, Neumann D. (1983). *Mol Cell Biol* ; 9 : 1646-52.
18. Parker CS, Topol J. (1984). A *Drosophila* RNA polymerase II transcription factor binds to the regulatory site of an hsp70 gene. *Cell* ; 37 : 2573-283.
19. Paul A-L, Vasil V, Vasil IK, Ferl RJ. (1987). Constitutive and anaerobically induced DNaseI hypersensitive sites in the 5' region of the maize Adhl gene. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 84 : 799-803.
20. Pelham H. (1982). A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* heat shock gene. *Cell* ; 30 : 517-528.
21. Pederson T. (1983). Nuclear RNA-protein interactions and messenger RNA processing. *J Cell Biol* ; 97 : 1321-6.
22. Petersen R, Lindquist S. (1988). The *Drosophila* hsp70 message is rapidly degraded at normal temperatures and stabilized by heat shock. *Gene* ; 72 : 161-8.
23. Pfitzner UM, Pfitzner AJP, Goodman HM. (1988). DNA sequence analysis of a PR-1a gene from tobacco : molecular relation ship of heat shock and pathogen responses in plants. *Mol Gen Genet* ; 24 : 290-5.
24. Raschke E, Baumann G, Schöffl F. (1988). Nucleotide sequence analysis of soybean small heat shock protein genes belonging to two different multigene families. *J Mol Biol* ; 199 : 549-557.
25. Ritossa FM. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* ; 18 : 571-3.
26. Ritossa FM. (1964). Behaviour of RNA and DNA synthesis at the puff level in salivary gland chromosomes of *Drosophila*.
27. Rochester DE, Winer JA, Shah D. (1986). The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock proteins hsp70. *Embo J* ; 5 : 451-8.
28. Scharf KD., Nover L. (1982). Heat shock induced alterations of ribosomal proteins phosphorylation in plant cell structures. *Cell* ; 30 : 427-437.
29. Schöffl F, Baumann G. (1985). Thermo-induced transcripts of a soybean heat shock gene after transfer into sunflower using a Ti plasmid vector. *Embo J* ; 4 : 1119-24.
30. Schöffl F, Baumann G, Raschke (1988). The expression of heat shock genes — A model for environmental stress response. In : eds Verma DPS, Goldberg RB. *Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes*. Springer-Verlag, Wien, New York.
31. Schöffl F, Rieping M, Baumann G, Bevan M, Angermüller S. (1989). The function of plant heat shock promoter elements in the regulated expression of chimaeric genes in transgenic tobacco. *Mol Gen Genet* ; 217 : 246-253.
32. Sorger PK, Lewis MJ, Pelham HRB. (1987). Heat shock factor is regulated differently in yeast and Hela cells. *Nature (London)*; 329 : 81-4.
33. Sorger PK, Pelham HRB. (1987). Purification and characterization of a heat shock element binding protein from yeast. *Embo J* ; 6 : 3035-41.

34. Sorger PK, Pelham HRB. (1988). Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependant phosphorylation. *Cell* ; 54 : 855-864.
35. Spena A, Hain R, Ziervogel U, Saedler H, Schell J. (1985). Construction of a heat-inducible gene for plants. Demonstration of heat-inducible activity of the *Drosophila* hsp70 promoter in plants. *Embo J* ; 4 : 2739-2743.
36. Storti RV, Scott M, Rich A, Pardue ML. (1980). Translation control of protein synthesis in response to heat shock in *D. melanogaster* cells. *Cell* ; 22 : 825-834.
37. Tanguay RM. (1988). Transcriptional activation of heat shock genes in eukaryotes. *Biochem Cell Biol* ; 66 : 584-593.
38. Timko MP. *et al.* (1985). Light regulation of plant gene expression by an upstream enhancer like element. *Nature (London)*; 318 : 579-582.
39. Tissieres A, Mitchel H, Tracy U. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosome puff. *J Mol Biol* ; 84 : 389-398.
40. Velazquez JM, Lindquist S. (1984). Hsp70 nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell* ; 36 : 655-62.
41. Vierling E, Mishking ML, Schmidt GW, Key JL. (1986). Specific heat shock proteins are transported into chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 83 : 361-65.
42. Vierling E, Nagao RT, De Rocher AE, Harris LM. (1988). A heat shock protein localized to chloroplasts is a member of a eukaryotic superfamily of heat shock proteins. *Embo J* ; 7 : 575-81.
43. Vincent M, Tanguay R. (1982). Different intracellular distributions of heat shock and arsenite-induced proteins in *Drosophila* cells. *J Mol Biol* ; 162 : 365-78.
44. Wiederrecht G, Shuey DJ, Kibbe WA, Parker CS. (1987). The *Saccharomyces* and *Drosophila* heat shock transcription factors are identical in size and DNA binding properties. *Cell* ; 48 : 507-15.
45. Winter J, Wright R, Duck N, Gasser C, Fraley R, Shah D. (1988). The inhibition of petunia hsp70 mRNA processing during CdCl₂ stress. *Mol Gen Genet* ; 211 : 315-19.
46. Wu HM, Dattagupta NB, Hogan M, Crothers BM. (1980). Unfolding of nucleosomes by ethidium binding. *Biochem* ; 19 : 626-34.
47. Wu C, Wilson S, Walker David I, Paisley T, Zimanino V, Veda H. (1987). Purification and properties of *Drosophila* heat shock activator protein. *Science* ; 238 : 1247-53.

8

Les tests de sélection précoce pour la résistance des plantes aux stress. Cas des stress salin et hydrique

E. ZID*, C. GRIGNON**

* *Laboratoire de physiologie végétale, faculté des sciences de Tunis, campus universitaire, 1060 Tunis, Tunisie*

** *Biochimie et physiologie végétales, Ecole nationale supérieure agronomique, INRA, CNRS, URA 573, 34060 Montpellier Cedex 1, France*

Résumé

Les végétaux ont un potentiel génétique considérable pour la tolérance des stress environnementaux. En particulier, le rendement des plantes cultivées présente différents degrés de sensibilité aux stress salin et hydrique. La variabilité intraspécifique pour la tolérance aux stress permet d'envisager une amélioration variétale. Bien que les effets des stress dépendent du stade de développement de la plante, des techniques culturales et des conditions climatiques et édaphiques, plusieurs critères physiologiques et biochimiques ont été proposés pour un tri à grande échelle avant les essais de rendement au champ. Cet article présente les plus usuels de ces critères, concernant essentiellement les stress salin et hydrique. Une première catégorie correspond à des tests qui reposent sur le pari que certains traits précis de la biochimie et de la physiologie cellulaire sont directement corrélés à la tolérance aux stress : viabilité cellulaire, perméabilité membranaire, accumulation de certaines substances organiques, induction de protéines spécifiques, perturbation des photosystèmes. La possibilité de rendre tolérantes aux stress salin ou hydrique des cellules en culture suggère que ce comportement physiologique est déterminé par des paramètres cellulaires. Mais de nombreuses études montrent que la faculté de supporter la salinité

et le stress hydrique est associée au fonctionnement intégré de l'organisme. La seconde catégorie de tests s'adresse au comportement de l'organisme entier, en général à un stade juvénile : aptitude à la germination ou à la croissance végétative, taux de survie des plantules, transport et utilisation des ions majeurs du milieu. Toutefois, dans la majorité des cas, les résultats de ces tests n'ont été mis en relation qu'avec la tolérance aux stress de très jeunes plantes élevées dans des conditions très éloignées de celles de la culture au champ. La valeur prédictive des tests précoces pour le rendement réel des cultures reste encore à préciser, par des approches physiologiques et agronomiques conjointes.

Introduction

Dans les régions arides et semi-arides, la disponibilité des eaux, leur salinité et celle des sols sont parmi les principaux facteurs limitant la productivité végétale. Les sols salés occupent une superficie de 950 millions d'hectares et 76,7 millions d'hectares de périmètres irrigués sont affectés par le sel (Eckholm, 1975, cité par Epstein [12]). Dans les cultures sous abris, la fertilisation et l'irrigation très localisées conduisent à élever exagérément la concentration des sels dans les supports de culture. Même pour les agricultures les plus modernes, les stress salins et hydriques constituent une limitation sérieuse des rendements. Aux Etats-Unis, par exemple, le rendement moyen des huit principales plantes de grande culture était en 1975 seulement égal à 20 % du rendement potentiel, évalué par les rendements records enregistrés [7]. Sur ces 80 % de pertes de rendement, moins de 10 % sont attribuables aux maladies, ravageurs et mauvaises herbes. Le reste traduit l'impact des mauvaises conditions de climat et de sol, parmi lesquelles sécheresse et salinité.

Il existe de nombreuses indications chez les végétaux d'un potentiel génétique considérable pour la tolérance des stress environnementaux [64]. En particulier, les plantes cultivées présentent différents degrés de résistance à la salinité et au stress hydrique, bien établis sur la base de critères agronomiques (rendement). La connaissance de cette variabilité interspécifique repose essentiellement sur la pratique agricole, et dans une moindre mesure sur des essais comparatifs systématiques au champ [31].

Plus intéressante ici est la variabilité intraspécifique que les plantes cultivées manifestent pour la tolérance aux stress. Elle permet d'envisager la sélection de génotypes résistants. Cette création variétale nécessite des tests suffisamment simples et rapides pour permettre un tri à grande échelle avant les essais de rendement au champ. Or, la résistance aux stress dépend fortement du stade de développement de la plante, des techniques culturales, des conditions climatiques et édaphiques [50]. Elle ne peut donc être ni définie ni prévue de façon absolue, mais doit être regardée comme un paramètre relatif. Néanmoins, plusieurs critères physiologiques et biochimiques ont été dégagés, à l'échelle de la cellule, ou de la plante entière, et utilisés dans un but de discrimination entre espèces ou variétés pour la résistance aux stress. Cet article en présente les plus importants, concernant essentiellement le stress salin et dans une moindre mesure, le stress hydrique.

Dans la variété des critères étudiés, on peut distinguer deux catégories. Certains tests s'adressent au comportement de l'organisme entier, en général à un stade juvénile : aptitude à la germination ou à la croissance végétative des plantules, utilisation des ions majeurs du milieu, etc. D'autres tests reposent sur le pari que certains traits précis de la biochimie et de la physiologie cellulaire sont directement corrélés à la tolérance aux stress : perméabilité cellulaire, accumulation de substances organiques caractéristiques des stress, induction de protéines spécifiques, perturbation des photosystèmes, etc. La possibilité de faire acquérir la résistance au sel ou au stress hydrique par des cellules ou tissus en culture [2, 3, 4, 6, 10, 21, 23, 34] supporte l'hypothèse que ce comportement physiologique est sous la dépendance de paramètres cellulaires. Pourtant, nombre d'études montrent que la faculté de supporter la salinité du milieu est associée à un schéma précis d'intégration des transports à l'échelle de la plante entière. Ceci suggère que les critères basés sur la mesure de paramètres cellulaires peuvent peut-être permettre de détecter des facteurs limitants élémentaires, conférant à eux seuls une forte sensibilité aux stress, mais qu'on ne peut attendre qu'ils identifient les meilleurs génotypes assurant l'optimisation des performances des plantes stressées.

Tests des caractères cellulaires

Résistance protoplasmique

La résistance protoplasmique permet de définir la capacité de la cellule à supporter les fortes concentrations internes de sel [47]. Ce test a été appliqué à différentes espèces ornementales par Monke et Wlebe [39]. Il consiste à faire séjourner des coupes fines de tiges dans des solutions à différentes concentrations de NaCl (jusqu'à 1,5 M) pendant 24 h, puis dans une solution hypertonique de saccharose 1,5 à 2 M pendant encore 24 h. Le taux de cellules plasmolysées est ensuite déterminé après examen en microscopie optique. La concentration de NaCl pour laquelle 50 % des cellules restent vivantes mesure leur degré de résistance au sel. Le dénombrement des cellules survivantes peut être facilité par l'utilisation du chlorure de triphényltétrazolum, qui permet de détecter les cellules conservant une activité respiratoire. Malgré ses difficultés d'interprétation, le test plasmolytique donne une bonne indication de la résistance des plantes entières au sel.

Perméabilité cellulaire

Stabilité des membranes

L'augmentation de la perméabilité cellulaire sous l'effet d'un stress salin ou hydrique peut être estimée par la fuite d'électrolytes hors de la cellule. Le principe du test est d'immerger des disques foliaires à basse température dans une solution dont le potentiel osmotique a été abaissé par du polyéthylèneglycol. La perte d'électrolytes est mesurée par l'augmentation de la conductivité électrique du milieu d'exsorption. Appliqué à la tomate, ce test révèle curieusement une meilleure stabilité membranaire chez l'espèce sensible, *Lycopersicon esculentum*,

que chez les espèces tolérantes au sel (*L. cheesmanii*, *L. peruvianum* et *Solanum pennellii*). La possibilité de l'exploitation de cette corrélation négative entre la stabilité des membranes et la résistance au sel est alors envisagée comme critère d'identification de génotypes de tomate résistants au sel [66].

Lipides membranaires

La perméabilité membranaire peut être testée par les modifications quantitatives des classes lipidiques racinaires sous l'effet du stress salin. Ainsi, trois espèces de *P. Plantago* présentant différents degrés de résistance au sel, sont cultivées pendant trois semaines sur des solutions contenant jusqu'à 300 mM NaCl, puis analysées. Chez *P. media* (sensible au sel), les teneurs des racines en phospho-, galacto- et sulfolipides diminuent fortement en présence de NaCl, suggérant une désorganisation de la barrière de perméabilité des cellules racinaires sous l'effet du sel. Chez les espèces tolérantes au sel (*P. maritima* et *P. coronopus*), les lipides membranaires restent comparables à ceux des plantes témoins cultivées en absence de NaCl et ne diminuent qu'aux doses supérieures à 75 mM NaCl [15].

Marqueurs moléculaires

Synthèse de protéines

Le sel induit des modifications qualitatives et quantitatives dans la synthèse des protéines, détectables par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. L'application de cette technique à deux variétés d'orge permet de mettre en évidence une différence de comportement entre la variété sensible au sel (*Prato*) et la variété résistante (*California Mariout*). Cette différence se manifeste seulement au niveau des feuilles. Dans ces organes, le sel induit la synthèse de cinq nouvelles protéines de Mr 20 à 40 Kd et de pI 6,3 à 7,2. Trois d'entre elles sont spécifiques de la variété sensible et les deux autres communes aux deux variétés. Au niveau des racines, six nouvelles protéines sont synthétisées par les deux variétés [45].

L'effet du stress salin sur les teneurs en polypeptides et en ARNm des racines a été étudié sur deux variétés d'orge (*Prato*, sensible et *CM72*, résistante). L'électrophorèse des polypeptides marqués *in vivo* ou des produits de traduction d'ARNm *in vitro* montre que la culture des plantules sur 200 mM NaCl pendant six jours provoque chez les deux variétés des changements spécifiques quantitatifs, mais n'induit ni la synthèse ni la disparition d'aucun polypeptide particulier à l'une des deux variétés [29].

Fragments de restriction (efficience de l'eau)

L'efficience de l'eau est une composante importante de la résistance à la salinité et à la sécheresse. Elle est définie par la quantité de biomasse produite (ou de moles de C incorporées dans la matière sèche) par gramme d'eau absorbée. Il existe une variabilité considérable entre espèces et variétés pour ce paramètre, mais l'amélioration pour l'efficience de l'eau n'a pu être réalisée en raison de la difficulté de son évaluation en conditions de plein champ. Chez la tomate, ce paramètre peut être prédit correctement par la détermination de la composition de la matière organique en isotopes stables ^{13}C et ^{12}C , ainsi que par trois fragments de restriction

(RFLPs) qui sont des marqueurs génétiques pour des séquences discrètes d'ADN à l'intérieur du génome. La combinaison des deux types de technique peut aider dans l'identification de gènes associés à l'efficacité de l'eau et dans l'étude de ses mécanismes [36].

Accumulation de proline

L'accumulation de proline est l'une des manifestations les plus remarquables du stress salin et hydrique. Aussi a-t-on cherché à mettre en évidence une corrélation positive ou négative entre l'accumulation de proline dans les feuilles et la résistance à la salinité ou à la sécheresse. Le rôle de la proline dans la résistance au stress salin n'est pas encore élucidé. Il peut s'agir d'un osmoticum dont l'accumulation cytoplasmique permet de neutraliser les effets ioniques et osmotiques de l'accumulation du sel dans la vacuole [62]. Selon un autre point de vue, l'accumulation de proline n'est pas une réaction d'adaptation au stress, mais plutôt le signe d'une perturbation métabolique [10, 22].

L'existence d'une variabilité génétique intraspécifique pour le potentiel d'accumulation de proline a été mise en évidence chez l'orge. Elle suggère la possibilité d'une sélection pour ce caractère, en particulier chez les céréales. Singh *et al.* montrent, sur cinq variétés d'orge, qu'il y a une relation entre la survie des feuilles et leur teneur en proline, lorsque les plantes sont exposées à une solution de polyéthylèneglycol à $-2,0$ MPa. Cependant, à l'intérieur de la tribu des Triticées, cette corrélation est loin d'être générale [76] et il serait hasardeux d'envisager une sélection sur la base de l'accumulation de proline.

L'accumulation foliaire de proline est également observée chez des plantules de tomate cultivées sous stress salin (100 et 200 mM NaCl) ou hydrique (-5 et -10 bar polyéthylèneglycol 6000). L'accumulation de proline en présence de NaCl est plus faible chez les espèces sauvages tolérantes (*L. peruvianum* et *S. pennellii*) que chez l'espèce cultivée sensible (*L. esculentum*). Ceci laisse penser que la proline ne joue pas un rôle essentiel dans la résistance au sel [67].

A l'image des plantes entières, des cals cellulaires issus de feuilles de tomate accumulent de la proline en présence de sel : les cals de l'espèce sensible, *L. esculentum*, accumulent plus de proline que ceux de l'espèce tolérante, *L. peruvianum* [26]. Le même type de réponse est obtenu avec des lignées cellulaires de *Nicotiana sylvestris* cultivées *in vitro* sur un milieu à 1,5 % NaCl : la proline s'accumule plus rapidement dans la lignée sensible que dans la lignée résistante au sel [10]. Chez *Nicotiana tabacum*, cependant, l'accumulation de proline est positivement corrélée à la survie des lignées cellulaires sur 100 mM NaCl [3, 74].

Accumulation de sucres

Les teneurs en saccharose et en amidon des racines et des feuilles semblent indicatrices du degré de résistance des espèces à la salinité. Une étude comparative a été menée sur le haricot (très sensible), le riz (sensible), le soja (moyennement résistant) et le cotonnier (tolérant). Les analyses de sucres ont été faites sur des plantes de 21 à 35 jours, cultivées pendant sept jours sur des solutions contenant 40 à 60 mM NaCl [46]. Les résultats révèlent que la teneur en saccharose des feuilles augmente considérablement chez le haricot et plus faiblement chez le riz. Par contre, elle diminue légèrement chez le soja et plus fortement chez le cotonnier.

La teneur des racines en saccharose augmente en relation inverse avec la résistance au sel : l'espèce la plus sensible est celle qui présente la plus forte accumulation racinaire de saccharose. La teneur en amidon des feuilles est augmentée chez le haricot, alors qu'elle diminue chez le cotonnier.

Il est possible que ces modifications dans les teneurs en sucres, induites par le sel, constituent un test commode de prédiction de la résistance au sel des espèces. Au niveau variétal, la validité du test reste encore à vérifier.

Culture *in vitro*

La culture *in vitro* offre la possibilité de caractériser, à un niveau cellulaire, des marqueurs physiologiques associés à la résistance au sel. Cette technique présente l'avantage d'un meilleur contrôle des conditions de nutrition, tout en autorisant la manipulation d'un grand nombre de cellules, ce qui augmente la probabilité d'obtention de variants avec les caractéristiques souhaitées de résistance au sel.

En culture de tissus, des cals cellulaires de feuilles, tiges et racines des deux espèces sauvages de tomate tolérantes au sel (*L. peruvianum* et *L. pennellii*) et de l'espèce cultivée sensible (*L. esculentum*) présentent les mêmes caractéristiques de résistance à NaCl que les plantes mères : les cals provenant des espèces tolérantes se développent mieux sur NaCl et accumulent plus de Na^+ et Cl^- que les cals issus de l'espèce sensible [66]. D'autre part, plusieurs exemples d'acquisition de la tolérance à la salinité ou au stress hydrique par des lignées cellulaires provenant de plantes sensibles ont été publiés (Voir Introduction).

La différence de sensibilité au sel de neuf variétés de vigne se retrouve aussi au niveau de fragments apicaux de tige cultivés *in vitro* sur des milieux contenant jusqu'à 100 mM NaCl [1]. De même, des cals d'ovaires immatures prélevés sur deux espèces d'orge (*Hordeum vulgare* et *H. jubiatum*) expriment *in vitro* des degrés de résistance au sel en rapport avec la résistance relative au sel des plantes entières [42].

La résistance au sel des plantes entières et des cals cellulaires a été également comparée chez une glycophyte sensible (haricot), une glycophyte tolérante (betterave à sucre) et deux halophytes (*Atriplex undulata* et *Suaeda australis*). Les cals de betterave et de haricot manifestent le même degré de résistance au sel que les plantes dont ils proviennent. Mais, paradoxalement, les cals des deux halophytes se développent très peu en présence de sel, ce qui suggère que la résistance au sel dépend de la complexité anatomique et physiologique de l'organisme entier [61]. A l'inverse, des cellules de riz (*Oryza sativa*) cultivées *in vitro* survivent à des concentrations de 600 mM NaCl, alors que la plante entière supporte difficilement 50 mM NaCl [79].

Ces différents exemples montrent bien que le degré de résistance au sel, exprimé *in vitro*, ne reflète pas toujours correctement le degré de résistance au sel de la plante entière. Par ailleurs, il reste à vérifier que le caractère de résistance exprimé *in vitro* se retrouve chez la plante entière régénérée. Actuellement, ceci limite l'utilisation de la culture *in vitro* en tant que méthode de sélection pour la résistance au sel.

Tests des caractères liés à l'intégration des fonctions physiologiques

Germination et émergence

La germination et l'émergence des plantules en conditions de stress salin sont révélatrices d'un potentiel génétique de tolérance à la salinité, au moins à ce stade de développement de la plante. Chez les céréales, l'émergence est repérée lorsque la première feuille perce le coléoptile et que les racines séminales atteignent 1,5 cm de long. Des différences marquées dans la capacité à émerger en milieu salé apparaissent à l'examen de quatre variétés de triticale. Mais l'étude du comportement de ces variétés au champ ne révèle aucune relation claire entre la performance au stade jeune et la résistance au sel au stade adulte [41]. Des résultats similaires sont obtenus sur le blé et l'orge. Dans le cas de l'orge, la comparaison du test d'émergence des plantules en présence de 400 mM NaCl avec le rendement au champ des plantes donne un coefficient de corrélation de 0,12 [40], ce qui met en cause la validité de ce test chez les espèces dont la sensibilité au sel varie avec le stade de développement.

Croissance, développement et survie

La tolérance au sel s'exprime habituellement en termes de croissance, de rendement ou de survie. Pour la plupart des plantes étudiées, elle peut être définie par une équation linéaire simple du type $Y_R = 100 - B(K_e - A)$, où Y_r représente la croissance ou le rendement, K_e la conductivité électrique du sol, A le seuil de conductivité électrique à partir duquel on observe une baisse de croissance, et B le pourcentage de réduction de croissance par unité d'augmentation de conductivité électrique au-delà du seuil A [31, 32].

Chez la laitue (*Lactuca sativa*), cultivée sous serre sur un milieu sableux et arrosée avec des solutions nutritives contenant 30 mM NaCl + 15 mM CaCl₂, la production de matière fraîche présente une forte variabilité entre les 85 génotypes testés [52]. Le même type de réponse est obtenu après un et deux mois de culture sur sel, ce qui confère à ce test une certaine fiabilité pour l'évaluation de la résistance au sel aux stades de développement ultérieurs.

Chez le riz, 14 caractères morphologiques ont été mesurés sur six variétés, cultivées sous serre sur du sable fin à trois niveaux de salinité. Là aussi, les variétés montrent des différences significatives pour les caractères étudiés. Les interactions variété/salinité indiquent la possibilité d'une sélection de variétés résistantes au sel sur la base de trois caractères : poids du chaume, poids de la paille et nombre de panicules. Le caractère précoce susceptible d'être utilisé dans la prévision du rendement serait le nombre de talles au stade plantule, en raison de la corrélation hautement significative qu'il présente avec la longueur et le poids du panicule [29].

Dans les tests de survie, le taux de mortalité est mesuré en fonction de la concentration de sel dans le milieu. Il permet de définir le paramètre D_{50} , qui est le temps nécessaire pour observer 50 % de mortalité. Chez le riz, le D_{50} varie suffisamment d'une variété à l'autre pour fournir un critère valable de résistance au sel. De plus, ce paramètre semble bien corrélé au rendement en grain [17].

Déterminé sur quatre variétés de riz, il est de 11 jours chez la variété la plus sensible et de 60 jours chez la plus résistante [77].

Epstein *et al.* ont testé 5 000 accessions de blé sur la base de la survie des plantules sur l'eau de mer diluée de moitié [13]. Ils constatent l'existence d'une variabilité intraspécifique importante. Les variétés les plus sensibles meurent sept semaines après la germination, alors que les variétés les plus résistantes survivent plus longtemps, se développent plus vigoureusement, et certaines d'entre elles arrivent à produire des semences viables. Le test de survie sur eau de mer diluée montre aussi, chez la tomate, l'indice d'une meilleure performance de l'espèce sauvage *L. cheesmanii* en comparaison de l'espace cultivée *L. esculentum* [40].

Malgré sa fiabilité, l'approche basée sur la survie ou la production de biomasse pose le problème du choix du critère de sélection pour la résistance au sel. L'interaction entre le génotype et l'environnement implique que le génotype le plus performant à une concentration donnée de sel n'est pas nécessairement le meilleur génotype à une autre concentration, d'où la nécessité d'adopter des critères appropriés à chaque cas. Aux concentrations salines modérées, le critère de sélection pourrait être la croissance (cas de la laitue); aux fortes doses, le critère de survie est plus approprié (cas de la tomate). On peut également se demander si la sélection doit se faire sur la base d'une haute performance sur sel, ou sur la base de la stabilité de cette performance aux différentes concentrations de sel [51, 52].

Transports ioniques

Sensibilité à Na⁺

Chez les glycophytes, certains (le haricot et le riz en sont des exemples classiques) restreignent le transport de Na⁺ dans les parties aériennes et maintiennent ainsi des niveaux de sel relativement bas dans les tissus photosynthétiques. D'autres, comme le cotonnier ou l'orge, transportent et accumulent de grandes quantités de Na⁺ dans leurs feuilles. Ces deux comportements opposés traduisent un paradoxe apparent : en effet, le premier, qui correspond à une protection des organes aériens contre l'envahissement par NaCl, s'observe chez les glycophytes les plus sensibles au sel. Le second, qui autorise l'accumulation de NaCl dans les feuilles, est caractéristique des espèces les plus résistantes. Ainsi, ce sont les espèces qui paraissent *a priori* les mieux armées pour protéger leur appareil photosynthétique qui supportent le moins bien l'agression saline. Le paradoxe se complique encore lorsqu'on compare les variétés dans une même espèce : là, on retrouve l'association que l'on attendait, entre le degré de tolérance et l'aptitude à empêcher Na⁺ d'envahir les feuilles. Des exemples de ces situations sont donnés ci-après.

En fait, la clé de cette complexité est qu'il existe deux grands schémas de comportement concernant la distribution de Na⁺ dans les plantes, permettant de classer les espèces. A ce niveau (interspécifique), la situation est simple. Les espèces incapables de transporter facilement Na⁺ dans leurs feuilles sont nettement plus sensibles que les autres, car leur inaptitude à exporter Na⁺ est probablement moins un caractère protecteur que le reflet d'une déficience des systèmes de compartimentation cellulaire [58]. En effet, ces espèces semblent peu efficaces pour abaisser le niveau cytoplasmique de Na⁺, ce qui est peut-être l'une des causes profondes de

leur sensibilité au niveau cellulaire. Mais l'incapacité à débarrasser le cytoplasme de Na^+ a pour conséquence que cet ion est facilement transporté dans le phloème chez ces plantes [30, 58]. Il est donc continuellement ramené vers le bas de la plante, ce qui se traduit par le comportement classique d'exclusion. Ce système n'est évidemment efficace que si le niveau de salinité du sol reste faible. Mais tant que cette condition est respectée, la tolérance au sel est d'autant meilleure que moins de Na^+ est exporté vers les parties aériennes. C'est la raison pour laquelle, à l'intérieur d'une espèce construite sur ce modèle, les comparaisons variétales montrent que les meilleures tolérances correspondent aux génotypes qui confèrent au système racinaire une bonne efficacité pour limiter l'accès de Na^+ aux feuilles.

La seconde catégorie d'espèces (dites *includers*) associe la résistance à la salinité et l'aptitude à transporter de grandes quantités de NaCl dans les feuilles. Il semble que ces comportements résultent d'une bonne compartimentation cellulaire de Na^+ , ce qui explique la tolérance à l'accumulation foliaire, et aussi la faible conduction de cet ion dans le phloème. Mais ce schéma de tolérance suppose évidemment un contrôle des quantités accumulées dans les feuilles, qui ne doivent pas perturber l'équilibre osmotique. Ceci explique que dans une espèce *includer* les variétés les plus tolérantes soient celles qui sont les plus aptes à contrôler le transport de NaCl dans les parenchymes assimilateurs.

En résumé, bien que l'accumulation de Na^+ dans les feuilles soit la marque caractéristique des espèces les plus tolérantes, au niveau variétal, le degré de résistance au sel est défini par le contrôle exercé sur cette accumulation : pour une espèce donnée, les variétés les plus tolérantes sont celles qui limitent le plus efficacement le transport de Na^+ dans les feuilles.

Les tomates offrent un premier exemple de la règle selon laquelle les espèces les plus tolérantes sont celles qui accumulent Na^+ dans leurs feuilles. Les espèces du genre *Lycopersicon* présentent différents degrés de résistance au sel [64, 65]. L'espèce sauvage, tolérante au sel, *L. cheesmanii*, est accumulatrice de Na^+ dans ses parties aériennes, alors que l'espèce cultivée sensible, *L. esculentum*, exclut Na^+ de ses limbes [49].

En culture sur sable, des espèces de *Lycopersicon* et de *Solanum*, ainsi que des hybrides F_1 de *L. esculentum* $\times$ *S. lycopersicoïdes*, arrosés avec des solutions additionnées de 0 à 294 mM NaCl, manifestent des différences dans la croissance et l'accumulation ionique. *L. peruvianum*, espèce tolérante au sel, présente les teneurs les plus élevées en Na^+ (1,5 % de la matière sèche foliaire), alors que *S. Lycopersicoïdes* et son hybride F_1 , sensibles, ont de faibles teneurs en Na^+ (0,29 et 0,38 %). *L. esculentum*, moins sensible, présente des teneurs intermédiaires [44].

Tal et Shannon [69] ont également conduit une étude sur trois espèces sauvages de tomate (*L. cheesmanii*, *L. peruvianum* et *Solanum pennellii*), trois variétés cultivées de *L. esculentum* et différents hybrides F_1 , cultivés sur des milieux à 100 et 150 mM NaCl. *S. pennellii* montre la plus forte accumulation de Na^+ dans ses feuilles, et *L. esculentum* les teneurs les plus faibles. Chez les hybrides, les teneurs sont intermédiaires, avec soit une dominance partielle des parents cultivés, soit une expression intermédiaire entre parents sauvages et parents cultivés, selon le cas.

Dans le cas du plantain (plantules cultivées pendant 3 semaines sur 0 à 300 mM NaCl), les vitesses d'absorption de Na^+ par la racine sont les mêmes pour l'espèce tolérante (*Plantago maritima*) et pour l'espèce sensible (*P. media*) [14]. Mais le transport de Na^+ dans les parties aériennes est immédiat chez la première, alors

qu'il présente un temps de latence chez la seconde. La différence essentielle entre les deux espèces réside au niveau du système de sécrétion des ions dans le xylème de la racine qui favorise l'exportation de Na^+ chez l'espèce résistante au sel.

La comparaison de deux espèces de lupin sur des milieux à 10 et 100 mM NaCl montre que les plantules de *Lupinus luteus* sont plus résistantes à NaCl et exportent plus de Na^+ dans leurs feuilles que celles de *L. angustifolius* [70]. Ce comportement halophytique est observé paradoxalement chez le *Citrus*, plante très sensible au sel. Des plants de 8 mois ont été cultivés pendant 10 à 30 jours sur 50 et 100 mM NaCl. L'espèce la plus résistante (*Citrus reticulata*, Mandarinier Cléopatre) accumule plus de Na^+ dans ses feuilles que l'espèce sensible *Poncirus trifoliata* [72].

Néanmoins, il existe des exceptions à la règle d'une association entre l'importance du transport de Na^+ dans les feuilles et le degré de tolérance dans les comparaisons d'espèces. Par exemple, le trèfle d'Alexandrie (*T. alexandrinum*) présente une meilleure résistance à NaCl que *T. pratense* dont la croissance est fortement réduite à 50-100 mM NaCl. Les teneurs en Na^+ sont plus faibles chez l'espèce résistante que chez l'espèce sensible, en raison probablement du contrôle exercé par la tige sur le transport de Na^+ dans les feuilles [75].

Au niveau variétal, la corrélation entre la tolérance et l'aptitude à limiter le transport de Na^+ dans les feuilles est bien illustrée chez le riz. Ce dernier est considéré comme la plus sensible des céréales à la salinité. En effet, des concentrations de NaCl aussi faibles que 50 mM provoquent chez le riz une certaine mortalité et réduisent de moitié le rendement en grain [32]. Néanmoins, le degré de résistance au sel diffère selon les variétés. Une corrélation négative existe entre la survie de plantules de 34 jours, cultivées sur des milieux à 50 et 150 mM NaCl et leur teneur foliaire en Na^+ , suggérant que la toxicité du sel est due à l'accumulation excessive de Na^+ dans les feuilles [77]. Cette corrélation, sans être parfaite, apparaît aussi à l'examen de dix-neuf variétés de riz, testées au stade plantules, après 6 jours de traitement sur 50 mM NaCl [78].

L'analyse de différents niveaux foliaires, chez quatre variétés de riz, montre que les variétés les plus résistantes au sel sont celles qui compartimentent Na^+ dans les vieilles feuilles, protégeant ainsi les jeunes feuilles contre les effets nocifs de ce cation. Les variétés sensibles, en revanche, laissent rapidement envahir par Na^+ leurs jeunes feuilles en croissance. Ces différences variétales dans la répartition de Na^+ sur les différents niveaux foliaires posent le problème de la fiabilité des tests de résistance basés sur la teneur globale des feuilles en Na^+ , qui ne reflète pas correctement le comportement de la plante à l'égard du sel [77].

Chez le blé comme chez le triticale [5, 75], la relation résistance au sel/exclusion de Na^+ est confirmée : les variétés les plus résistantes sont celles qui transportent le moins de Na^+ dans leurs feuilles. Il en est de même pour le sorgho, chez lequel des variétés résistantes au sel ont été sélectionnées sur la base d'une faible teneur foliaire en Na^+ et d'une forte sélectivité en faveur de K^+ [43].

Des lignées hybrides de tomate issues du croisement entre *L. esculentum* et *S. pennellii* ont été testées pour leur résistance au sel en milieu hydroponique (sable arrosé avec une solution de Hoagland diluée de moitié et enrichie ou non en NaCl). Six des 31 lignées étudiées tolèrent une concentration de 100 mM NaCl. Leur production de matière sèche représente au moins 80 % de celle des plantes cultivées sur milieu témoin sans NaCl. Toutes les lignées présentent une accumulation de Na^+ dans leurs feuilles, mais à des degrés divers. L'indice de régulation ionique

(IRI), défini par le rapport des teneurs foliaires en Na^+ en présence et en absence de NaCl , est corrélé négativement à la performance relative des différentes lignées : les plus résistantes sont celles qui limitent l'accumulation foliaire de Na^+ [50].

D'autres tomates hybrides ont été étudiées en case lysimétrique sous serre et à quatre niveaux de salinité (1,8 à 9,5 dS.m⁻¹). Tout en présentant différents degrés de sensibilité au sel, ces hybrides se sont révélés plus sensibles au sel que des variétés plus anciennes de tomate. La production de fruits est bien corrélée négativement aux teneurs foliaires en Na^+ et Cl^- [37].

En résumé, la corrélation positive ou négative entre la teneur des feuilles en Na^+ et la résistance de la plante au sel permet de considérer la teneur foliaire en Na^+ comme un bon critère de tolérance à la salinité, à la condition de distinguer les comparaisons interspécifiques (corrélation positive) et variétales (corrélation négative). Cependant, cette relation n'est pas stricte, en raison de l'interaction entre la vitesse de croissance des tissus et leur vitesse d'absorption de Na^+ . Par ailleurs, la compartimentation de ce cation, à l'échelle de la cellule, du tissu ou de la plante entière, empêche toute corrélation simple entre la teneur moyenne en Na^+ , la réduction de croissance et l'apparition de symptômes de toxicité par le sel [8, 79]. La relation entre la teneur moyenne en Na^+ dans les feuilles et la performance sur sel ne peut donc avoir qu'une valeur prévisionnelle pour les dommages que peut causer l'accumulation de Na^+ dans les parties aériennes des glycophytes sensibles à ce cation.

Recirculation de Na^+ par le phloème

Comme on l'a évoqué plus haut, la recirculation de Na^+ des feuilles vers les racines, *via* le phloème, ainsi que l'efflux de Na^+ des racines vers le milieu contribuent au maintien d'une faible teneur en Na^+ dans les feuilles des espèces sensibles au sel. Selon Lessani, Marshner et Slama, l'importance de cette recirculation est un critère fiable pour classer les espèces et variétés selon leur degré de sensibilité ou de résistance à NaCl [30, 58, 59]. Ainsi, l'application foliaire de ^{22}Na permet de détecter une forte recirculation de Na^+ chez des espèces particulièrement sensibles au sel comme le haricot. En revanche, chez les espèces tolérantes (*betterave* à sucre), la recirculation de Na^+ est pratiquement absente. Meilleure est la corrélation entre la sensibilité au sel et l'efflux de Na^+ dans le milieu. D'une manière générale, cet efflux augmente avec la sensibilité à NaCl [30]. Mais ni le maïs, ni le riz, espèces sensibles au sel, ne présentent ce phénomène [30, 77]. Slama a proposé un test simple de la conduction descendante de Na^+ basé sur l'interruption du transport phloémien par une application de CN^- à la base de la tige [58].

Sensibilité à Cl^-

Chez un certain nombre d'espèces cultivées (soja, orge, citrus), la résistance au sel est associée à l'exclusion de Cl^- des parties aériennes. Dans le cas des *Citrus*, qui regroupent des espèces très sensibles au sel, il est admis que les porte-greffes les plus résistants (mandarinier Cléopâtre et lime Rangpur) sont ceux qui limitent le plus efficacement l'accumulation de Cl^- dans leurs feuilles. Les plus sensibles, par contre (*Poncirus trifoliata*), absorbent et accumulent d'importantes quantités de Cl^- dans ces organes. C'est ce qui se dégage à l'examen de 12 porte-greffes âgés de

8 mois et cultivés pendant 6 semaines sur des milieux sableux arrosés avec une solution à 50 mM NaCl [20]. Cependant, l'expression de la résistance relative sur la base du rapport des vitesses de croissance en présence et en absence de sel ne présente pas toujours une bonne correspondance avec le degré d'exclusion de Cl^- .

Le même type d'approche, conduit sur d'autres porte-greffes de *Citrus*, confirme l'existence de différences marquées entre génotypes dans la capacité d'exclusion de Cl^- des feuilles, ainsi que d'une relation satisfaisante entre la réduction de croissance sur 100 mM NaCl et la teneur foliaire en Cl^- . La lime Rangpur, résistante au sel, maintient une faible concentration foliaire de Cl^- (68 mM), contrairement au citronnier Etrog, sensible, chez lequel la concentration de Cl^- atteint 416 mM dans les feuilles [73]. Dans une étude comparative de deux porte-greffes, cultivés à l'âge de 2 à 3 mois sur des solutions nutritives enrichies en NaCl, Chérif *et al.* [9] montrent que les teneurs foliaires en Cl^- sont plus élevées chez le citrange Troyer (*Poncirus trifoliata* $\times$ *Citrus sinensis*) que chez le bigaradier (*Citrus aurantium*). Or, le premier est réputé plus sensible au sel que le second.

Sur plants de *Citrus* greffés, la résistance au sel dépend étroitement des caractéristiques ioniques du porte-greffe, et en particulier de son aptitude à limiter l'exportation de Cl^- dans les feuilles. Ainsi, de jeunes pamplemoussiers *Resblush*, arrosés avec une eau salée, présentent des teneurs foliaires en Cl^- variables avec le porte-greffe (0,32 à 2,63 % du poids de matière sèche). La meilleure résistance et les plus faibles teneurs en Cl^- sont obtenues sur le mandarinier Cléopâtre et sur 20 hybrides qui se révèlent aussi résistants au sel que ce dernier [47]. Même chez les espèces résistantes au sel, comme l'orge, la résistance apparaît fortement liée à la capacité d'exclusion de Cl^- des parties aériennes [63].

Les légumineuses sont considérées comme des espèces sensibles au sel, puisque leur croissance est généralement diminuée à des concentrations de 50 mM NaCl. De plus, elles présentent une grande variabilité pour la résistance au sel et plusieurs d'entre elles répondent à la salinité par l'exclusion de Cl^- des parties aériennes. Selon Läuchli, ce critère peut être pris en considération pour la sélection d'espèces ou variétés résistantes au sel [27]. Effectivement, chez le soja, la variété résistante (Lee) maintient ses teneurs foliaires en Cl^- à un niveau assez faible, en comparaison de la variété sensible Jackson [28]. Chez le trèfle, l'espèce résistante *Trifolium alexandrinum* retient plus de Cl^- dans ses racines que l'espèce sensible *T. pratense* [75]. La réponse du lupin est différente : *Lupinus luteus*, plus résistant que *L. angustifolius*, est pourtant moins efficace dans l'exclusion de Cl^- [71].

Déficit anionique

En milieu salé, Cl^- inhibe l'absorption et le transport à longue distance des anions indispensables à la croissance (NO_3^- en particulier). Il en résulte un déficit d'alimentation de ces organes en anions qui peut être estimé par la différence entre la teneur globale en cations majeurs ($\text{Ca}^{2+} + \text{K}^+ + \text{Mg}^{2+} + \text{Na}^+$) et la teneur en Cl^- . Or, la sensibilité au sel des espèces et variétés semble être en relation avec ce paramètre [58]. Ceci est illustré par l'exemple du blé, chez lequel les variétés les plus sensibles au sel présentent les valeurs les plus élevées de déficit anionique foliaire [59].

Sélectivité ionique : efficacité d'utilisation du potassium en présence d'excès de NaCl

A l'interface racine/sol, l'excès de sel peut limiter l'approvisionnement de la plante en macroéléments essentiels tels que K^+ . Mais, la capacité d'absorption ionique, déterminée génétiquement, diffère considérablement avec les espèces et les variétés. Une deuxième composante nutritionnelle est l'efficacité avec laquelle l'élément nutritif absorbé est utilisé pour les besoins de la croissance. Là aussi, une grande variabilité se manifeste au sein des espèces et des variétés permettant d'envisager une sélection pour l'efficacité nutritionnelle [18]. L'efficacité d'utilisation de K^+ est définie par Makmur *et al.* comme la quantité de biomasse produite par unité de K^+ absorbé [35].

La comparaison de différentes espèces de tomate, cultivées en conditions limitantes de K^+ (0,5 mM), montre que les espèces tolérantes au sel, *L. peruvianum* et *L. pennellii*, ont une plus grande efficacité d'utilisation de K^+ que l'espèce sensible *L. esculentum*, sans que cette caractéristique soit associée à une plus grande efficacité de prélèvement de K^+ sur le milieu [70].

L'orge présente aussi des différences variétales importantes dans l'efficacité d'utilisation de K^+ . Comme chez la tomate, ce paramètre n'est pas lié à l'influx de K^+ dans la racine. Chez 11 variétés d'orge, testées au stade 6 jours sur des solutions à 3 mM K^+ , la représentation de la production de biomasse en fonction de la teneur des organes en K^+ montre, après une semaine de culture, une corrélation hautement significative entre les deux paramètres [25].

L'influx de K^+ , ainsi que ses paramètres cinétiques K_M et V_{max} , sont mesurés sur 10 variétés d'orge en conditions de croissance limitée par K^+ (5 μM), dans un but de prédiction de la performance à plus long terme. L'analyse des paramètres liés à l'absorption de K^+ révèle des différences significatives entre variétés. L'influx de K^+ n'est pas corrélé à la croissance. Par contre, les corrélations K_M /poids de matière fraîche et V_{max} /poids de matière fraîche sont significatives et indicatrices des performances relatives de 7 variétés [18].

Toujours aux faibles doses de K^+ (5 à 100 μM), des différences nettes dans la croissance s'observent très précocement entre variétés de blé. Une corrélation positive existe entre la croissance, la vitesse d'absorption de K^+ et son efficacité d'utilisation [53]. Des résultats similaires sont obtenus chez l'avoine [55].

Dans la racine d'orge, la corrélation entre l'influx de K^+ et l'efflux de H^+ peut être à la base d'un test de sélection de variétés d'orge à forte capacité d'absorption de K^+ . Des plantules de 5 jours sont mises à absorber pendant 24 h dans des solutions à 60 μM K^+ . L'influx de K^+ est mesuré par le traceur $^{86}Rb^+$, et l'efflux de H^+ à l'aide d'un pH mètre ou d'un indicateur coloré (rouge de méthyle). Cette technique permet de mettre en évidence, après 15 min d'absorption, des différences marquées entre 24 variétés testées. Il reste cependant à vérifier que les différences variétales au stade plantule se retrouvent aux stades de développement ultérieurs [19].

Aptitude de la plante à protéger le système photosynthétique : fluorescence de la chlorophylle

Les mesures de fluorescence de la chlorophylle constituent une méthode sensible et très rapide de comparaison entre géotypes pour la résistance à la salinité [60]. Les feuilles sont échantillonnées après 23 jours de traitement sur 100 mM NaCl,

et les mesures de fluorescence effectuées sur des rondelles de 2 cm de diamètre. La montée de la fluorescence, induite par irradiation avec la lumière rouge, correspond à la réduction des accepteurs du PSII, son extinction à la réoxydation de ces accepteurs. L'évolution de la fluorescence au cours du temps permet de faire la distinction entre une espèce tolérante au sel (betterave à sucre), une espèce moyennement résistante (tournesol) et une espèce sensible (haricot).

Conclusion

La résistance au sel apparaît comme un caractère polygénique contrôlé à différents niveaux d'organisation, de la cellule à la plante entière. La grande variabilité manifestée par les espèces et les variétés pour ce caractère permet d'envisager la sélection de génotypes particulièrement bien adaptés au stress salin. Par ailleurs, la diversité des effets du sel offre une gamme étendue de critères physiologiques et biochimiques qui peuvent être à la base de tests rapides, utilisables pour un tri à grande échelle. Aux tests classiques de germination et de croissance (émergence, production de biomasse, survie) et de nutrition minérale (accumulation foliaire de Na^+ et de Cl^- , efficacité d'utilisation de K^+), s'ajoutent des tests biochimiques plus récents (accumulation foliaire de proline, de saccharose et d'amidon, fluorescence de la chlorophylle, synthèse de polypeptides et protéines). La culture *in vitro* offre une méthode alternative de sélection de lignées cellulaires résistantes au sel. Enfin, les techniques de la biologie moléculaire (fragments de restriction) ouvrent de nouvelles voies pour l'amélioration de l'efficacité de l'eau par les plantes. Néanmoins, la majorité de ces tests manque de fiabilité et des marqueurs phénotypiques précoces, mais indicateurs d'une performance à des stades ontogéniques avancés, restent encore à identifier.

Pour des raisons évidentes, les sélectionneurs demandent des tests simples, applicables à de jeunes plantes. Cet article montre qu'il existe de nombreux tests répondant à ces critères. Toutefois, dans la majeure partie des cas, l'utilité pratique des tests n'est pas établie, essentiellement parce que leurs résultats ne sont mis en relation qu'avec le comportement de très jeunes plantes au stade végétatif, élevées dans des conditions très éloignées de celles de la culture au champ. Il est clair que la valeur prédictive de ces tests pour le rendement réel des cultures ne peut être encore évaluée. Cette évaluation nécessitera la conduite simultanée des tests en laboratoire et des expérimentations agronomiques.

Références

1. Barlass M, Skene KGM. (1981). Relative tolerances of grapevine cultivars and hybrids *in vitro*. *Z Pflanzenphysiol Bd* ; 102 S : 147-156.
2. Ben-Hayyim G, Kochba J. (1983). Aspects of salt tolerance in a NaCl-selected stable cell line of *Citrus sinensis*. *Plant Physiol* ; 72 : 685-690.
3. Binzel ML, Hasegawa MP, Rhodes D, Handa S, Handa AK, Bressan RA. (1987). Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. *Plant Physiol* ; 84 : 1408-1411.

4. Binzel ML, Hess FD, Bressan RA, Hasegawa MP. (1988). Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol* ; 86 : 607-614.
5. Bizid E, Zid E, Grignon C. (1988). Tolérance à NaCl et sélectivité K^+/Na^+ chez les triticales. *Agronomie* ; 8 : 23-27.
6. 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.
7. Boyer JS. (1982). Plant productivity and environment. *Science* ; 218 : 443-448.
8. Cheeseman JM. (1988). Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol* ; 87 : 547-550.
9. Cherif D, Zid E, Ghorbal H, Ayadi A. (1982). Réponse de très jeunes plants de *Citrus* à NaCl : étude comparative de deux porte-greffes Citrange Troyer et Bigaradier. *Oecol Plant* ; 3 : 79-85.
10. Dix PJ, Pearce PS. (1981). Proline accumulation in NaCl-resistant and sensitive cell lines of *Nicotiana sylvestris*. *Z Pflanzenphysiol Bd* ; 102 S : 243-248.
11. Eckholm EP. (1975). Salting the earth. *Environ.* ; 17, 9.
12. Epstein E. (1980). Responses of plant to saline environments. In : *Genetic Engineering of Osmoregulation : Impact on Plant Productivity for Food, Chemicals and Energy*. Rains DW, Valentine RC, Hollaender A. eds. Plenum, New York and London, pp. 7-21.
13. Epstein E, Norlyn JD, Rush DW, Kingsbury RW, Kelley DB, Cunningham GA, Wrona AF. (1980). Saline culture of crops : a genetic approach. *Science* ; 210 : 399-404.
14. Erdel L, Kulper PJ. (1979). The effect of salinity on growth, cation content, Na^+ uptake and translocation in salt-sensitive and salt-tolerant *Plantago* species. *Physiol Plant* ; 47 : 95-99.
15. Erdel L, Stuiver BEP, Kuiper PJC. (1980). The effect of salinity on lipia composition and on activity of Ca^{2+-} and Mg^{2+-} stimulated ATPases in salt-sensitive and salt-tolerant *Plantago* species. *Physiol Plant* ; 49 : 315-319.
16. Fisher RA, Turner NC. (1978). Plant productivity in the arid and semi-arid zones. *Ann Rev Plant Physiol* ; 29 : 277-317.
17. Flowers TJ, Yeo AR. (1981). Variability in the resistance of sodium chloride salinity within rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *New Phytol* ; 88 : 363-373.
18. Glass ADM, Perley JE. (1980). Varietal differences in potassium uptake by barley. *Plant Physiol* ; 65 : 160-164.
19. Glass ADM, Siddiqi MY, Giles KJ. (1981). Correlations between potassium uptake and hydrogen efflux in barley varieties. *Plant Physiol* ; 68 : 457-459.
20. Grieve AM, Walker RR. (1983). Uptake and distribution of chloride, sodium and potassium ions in salt-treated citrus plants. *Aust J Agric Res* ; 34 : 133-143.
21. Handa AK, Bressan RA, Handa S, Hasegawa PM. (1982). Characteristics of cultured tomato cells after prolonged exposure to medium containing polyethylen glycol. *Plant Physiol* ; 69 : 514-521.
22. Hanson AD, Nelson CE, Everson EH. (1977). Evaluation of free proline accumulation as an index of drought resistance using two contrasting barley cultivars. *Crop Sci* ; 17 : 720-726.
23. Heyser JW, Nabors MW. (1981). Osmotic adjustment of cultured tobacco cells (*Nicotiana tabacum* var. Samsun) grown on sodium chloride. *Plant Physiol* ; 67 : 720-727.
24. Hurkman WJ, Fornari CS, Tanaka CK. (1989). A comparison of the effect of salt on polypeptides and translatable mRNAs in roots of a salt-tolerant and a salt-sensitive cultivar of barley. *Plant Physiol* ; 90 : 1444-1456.

25. Jensen P, Petterson S. (1980). Varietal variation in uptake and utilisation of potassium (rubidium) in high-salt seedling of barley. *Physiol Plant* ; 48 : 411-415.
26. Katz A, Tal M. (1980). Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato : proline accumulation in callus tissues of *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* *Z Pflanzenphysiol Bd* ; 98 S., 429-435.
27. Läuchli A. (1984). Salt exclusion : an adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. In : Staples RC, Toenniessen GA eds. *Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement*. Wiley, New York, pp. 171-187.
28. Läuchli A, Wieneke J. (1979). Studies on growth and distribution of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in soybean varieties differing in salt tolerance. *Z Pflanzenernaehr Bd* ; 142, 3-13.
29. Lehman WF, Rutger JN, Robinson FE, Kaddah M. (1984). Value of rice characteristics in selection for resistance to salinity in arid environment. *Agron J* ; 76 : 366-370.
30. Lessani H, Marschner H. (1978). Relation between salt tolerance and long-distance transport of sodium and chloride in various crop species. *Aust. J Plant Physiol* ; 5 : 27-37.
31. Maas EV. (1986). Salt tolerance of plants. *Appl Agric Res* ; 1 : 12-26.
32. Maas EV, Hoffman GJ. (1976). Crop salt tolerance : evaluation of existing data. In : *Managing Saline Water for Irrigation*. Dregre HE ed. *Proc Int Conf*, Texas Technical Univ, 187-198.
33. Maas EV, Hoffman GJ. (1977). Crop salt tolerance. Current Assessment. *J Irrig Div, ASCE* ; 103 : 115-134.
34. Maillot C, Pennarun AM, Heller R. (1983). Ajustement hydrique des cellules libres d'*Acer pseudoplatanus* adaptées à des concentrations élevées de NaCl. *Physiol Vég* ; 21 : 501-507.
35. Makmur A, Gerloff GC, Gabelman WH. (1978). Physiology and inheritance of efficiency in K⁺ utilization in tomatoes grown under K⁺ stress. *J Am Hort Sci* ; 103 : 545-549.
36. Martin B, Nienhus J, King G, Schaefer A. (1989). Restriction fragment length polymorphisms associated with water use efficiency in tomato. *Science* ; 243 : 1725-1728.
37. Martinez M, Cerda A, Fernandez FG. (1987). Salt tolerance of four tomato hybrids. *Plant Soil* ; 97 : 233-242.
38. Massoud F I. (1974). Salinity and alkalinity as soil degradation hazards. *FAO/UNEP Expert Consultation on Soil Degradation*, FAO, Rome.
39. monk RW, Wlebe HH. (1961). Salt tolerance and protoplasmic salt hardness of various woody and herbaceous ornamental plants. *Plant Physiol* ; 36 : 478-482.
40. Norlyn JB. (1980). Breeding salt-tolerant crop plants. In : Rains DW, Valentine RC, Hollander A eds. *Genetic Engineering of Osmoregulation : Impact on Plant Productivity for Food, Chemicals, and Energy*. Plenum, New York and London, pp. 293-309.
41. Norlyn JB, Epstein E. (1984). Variability in salt tolerance of four triticale lines at germination and emergence. *Crop Sci* ; 24 : 1090-1092.
42. Orton TJ. (1980). Comparaison of salt tolerance between *Hordeum vulgare* and *H. jubatum* in whole plants and callus cultures. *Z Pflanzenphysiol Bd*, 98 S, 105-108.
43. Pathamanabhan G. RAO JS. (1976). Note on potassium as a possible index for screening sorghum varieties for salt tolerance. *Indian J Agric Sci* ; 46 : 392-394.
44. Phills BR, Peck NH, McDonald GE. Robinson RW. (1979). Differential response of *Lycopersicon* and *Solanum* species to salinity. *J Amer Soc Hort Sci* ; 104 : 349-352.
45. Ramagopal S. (1987). Salinity stress induced tissue. Specific proteins in barley seedlings. *Plant Physiol* ; 84 : 324-331.

46. Rathert G. (1984). Sucrose and starch content of plant parts as a possible indicators for salt tolerance. *Aust J Plant Physiol* ; 11 : 491-495.
47. Ream CI, Furr JR. (1976). Salt tolerance of some citrus species, relatives and hybrids tested as rootstocks. *J Amer Soc Hort Sci* ; 101 : 265-267.
48. Repp GI, McAllister DR, Wiebe HH. (1959). Salt resistance as a test for the salt tolerance of agricultural plants. *Agron J* ; 51 : 311-314.
49. Rush DW, Epstein E. (1981). Comparative studies on sodium, potassium and chloride of a wild halophytic and a domestic salt-sensitive tomato species. *Plant Physiol* ; 68 : 1308-1313.
50. Sacher MC, Staples RC, Robinson RW. (1982). Saline tolerance in hybrids of *Lycopersicon esculentum* × *Solanum pennellii* and selected breeding lines. In : A San Pietro ed. *Biosaline Research. A look to the future*. Plenum Press, New York, 325-336.
51. Shannon MC. (1982). Genetics of salt tolerance : New Challenges. In : A San Pietro ed. *Biosaline Research. A look to the future*. Plenum Press, New York, 271-282.
52. Shannon MC. (1985). Principles and strategies in breeding for higher salt tolerance. *Plant Soil* ; 89 : 227-241.
53. Shannon MC, McCREIGHT JD, DRAPER JH. (1983). Screening tests for salt tolerance in lettuce. *J Amer Soc Hort Sci* ; 108 : 225-230.
54. Siddiqi MY, Glass ADM. (1983). Studies on the growth and mineral nutrition of barley varieties. I. Effect of potassium supply on the uptake of potassium and growth. *Can J Bot* ; 61 : 671-678.
55. Siddiqi MY, Glass ADM, Hsiao AI, Minjas ANK. (1987). Genetic differences among wild oat lines in potassium uptake and growth in relation to potassium supply. *Plant Soil* ; 99 : 93-105.
56. Singh TN, Aspinall D, Paleg LG. (1972). Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley : a potential metabolic measure of drought resistance. *Nature* ; 236 : 188-190.
57. Singh TN, Paleg LG, Aspinall D. (1973). Stress metabolism : variations in response to water stress deficit in the barley plants during water stress. *Biol Sci* ; 26 : 65-76.
58. Slama F. (1982). Effet du chlorure de sodium sur la croissance et la nutrition minérale : étude comparative de 6 espèces cultivées. Thèse Doct. Etat Univ. Tunis, 214.
59. Slama F. (1986). Effet du nitrate d'ammonium sur le degré de tolérance à une forte dose de NaCl de dix variétés de blé. Colloque sur les Végétaux en Milieu Aride. FST/ACCT. Tunisie (Jerba), pp. 460-473.
60. Smillie RM, Nott R. (1982). Salt tolerance in crop plants monitored by chlorophyll fluorescence *in vivo*. *Plant Physiol* ; 70 : 1049-1054.
61. Smith MK, McComb JA. (1981). Effect of NaCl on the growth of whole plants and their corresponding callus cultures. *Aust J Plant Physiol* ; 8 : 267-275.
62. Stewart CR, Lee JA. (1974). The role of proline accumulation in halophytes. *Planta* ; 120 : 279-289.
63. Storey R, Wyn Jones RG. (1978). Salt stress and comparative physiology in the Graminaea. I. Ion relations of two salt- and water-stressed barley cultivars, California Mariout and Arimar. *Aust J Plant Physiol* ; 5 : 801-816.
64. Tal M. (1984). Physiological genetics of 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, pp. 301-320.

65. Tal M. (1985). Genetics of salt tolerance in higher plants theoretical considerations. *Plant Soil* ; 89 : 199-226.
66. Tal M, Heinik H, Dehan K. (1978). Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato : Responses of callus tissue of *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum* and *Solanum pennellii* to high salinity. *Z Pflanzenphysiol Bd* ; 86 S. : 231-240.
67. Tal M, Katz A, Helkin H, Dehan K. (1979). Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato : Proline accumulation in *Lycopersicon esculentum* Mill., *L. peruvianum* Mill. and *Solanum pennellii* Cor. treated with NaCl and polyethylenglycole. *New Phytol* ; 82 : 349-355.
68. Tal M. Shannon MC. (1983a). Effects of dehydration and high temperature on the stability of leaf membranes of *Lycopersicon esculentum*, *L. cheesmanii*, *L. peruvianum* and *Solanum pennellii*. *Z Pflanzenphysiol Bd* ; 112 S : 411-416.
69. Tal M. Shannon MC. (1983b). Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato : Responses of *Lycopersicon esculentum*, *L. cheesmanii*, *L. peruvianum*, *Solanum pennellii* and F₁ hybrids to high salinity. *Aust J Plant Physiol* ; 10 : 109-117.
70. Taleisnik-Gertel E, Tal M. (1986). Potassium utilization and fluxes in wild salt-tolerant relatives of the cultivated tomato. *Physiol Plant* ; 67 : 415-420.
71. Van Steveninck RFM, Van Steveninck ME, Stelzer R, Läuchli A. (1982). Studies on the distribution of Na and Cl in two species of lupin (*Lupinus luteus* and *Lupinus angustifolius*) differing in salt tolerance. *Physiol Plant* ; 56 : 465-473.
72. Walker RR. (1986). Sodium exclusion and potassium-sodium selectivity in salt-treated Trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*) and Cleopatra mandarin (*Citrus reticulata*) plants. *Aust J Plant Physiol* ; 13 : 293-303.
73. Walker RR, Douglas TJ. (1983). Effect of salinity level on uptake and distribution of chloride, sodium and potassium ions in citrus plants. *Aust J Agric Res* ; 34 : 145-153.
74. Watad AA, Reinhold L, Lerner HR. (1983). Comparison between a stable NaCl-selected *Nicotiana* cell line and the wild type. K⁺, Na⁺, and proline pools as a function of salinity. *Plant Physiol* ; 70 : 621-629.
75. Winter E, Läuchli A. (1982). Salt tolerance of *Trifolium alexandrinum* L. I. Comparison of the salt response of *T. alexandrinum* and *T. pratense*. *Aust J Plant Physiol* ; 9 : 221-226.
76. Wyn Jones RG, Gorham J, McDonnell E. (1984). Organic and inorganic solute contents as selection criteria for salt tolerance in the Triticeae. In : Staples RC, Toenniessen GA eds. *Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement*. Wiley, New York, pp. 189-203.
77. Yeo AR, Flowers TJ. (1982). Accumulation and localisation of sodium ions within the shoots of rice (*Oryza sativa*) varieties differing in salinity resistance. *Physiol Plant* ; 56 : 346-348.
78. Yeo AR, Flowers TJ. (1984). Mechanisms of salinity resistance in rice and their role as physiological criteria in plant breeding. In : Staples RC, Toenniessen GA eds. *Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement*. Wiley, New York, pp. 151-170.
79. Yeo AR, Flowers TJ. (1986). Salinity resistance in rice (*Oryza sativa* L.) and pyramiding approach to breeding varieties for saline soils. *Aust J Plant Physiol* ; 13 : 163-173.

9

Problèmes soulevés par les tests précoces de la productivité

B. KOUAMÉ

Chargé de recherche, Station principale de la ME 13. BP 989 Abidjan 13, PK30, Côte-d'Ivoire

Résumé

L'amélioration variétale est une voie génétique longue, délicate et complexe, en particulier pour les plantes pérennes.

Les critères de sélection habituellement utilisés sont nombreux; cependant, dans les tests précoces, seuls les caractères physiologiques et les caractères causaux directement liés à la production ou à un caractère agronomique sont considérés comme critères véritables.

Les tests précoces utilisant ces caractères comme paramètres constituent donc un moyen de prédiction efficace de la productivité.

Cependant, la mise au point de ces tests doit obéir à certaines contraintes expérimentales (randomisation, répétabilité, conformité, validité statistique). Ainsi, les problèmes peuvent apparaître :

- au niveau des conditions expérimentales;
- au niveau de la conformité et de la validité des résultats;
- au niveau de l'automatisation des mesures expérimentales;
- au niveau des comparaisons des résultats obtenus en laboratoire et ceux en champs.

Ces contraintes peuvent être néanmoins levées en suivant, une procédure systématique. Ce qui paraît important en utilisant les tests précoces, c'est que ceux-ci rendent

la sélection plus efficace (résultat par rapport au coût) et qu'ils puissent influencer sur le choix d'un schéma d'amélioration.

Les résultats espérés sont difficiles à apprécier dans l'immédiat dans le cas des plantes pérennes, compte tenu du temps nécessaire pour obtenir des données représentatives de la valeur génétique des croisements.

Introduction

L'amélioration variétale est un mécanisme délicat et long qui tient compte de divers facteurs : génétiques, physiologiques, et pédoclimatiques.

Cette amélioration peut utiliser les techniques de la génétique, du génie génétique, de la biochimie, de la physiologie et de la biotechnologie.

L'objectif final de cette amélioration est d'obtenir un matériel performant haut producteur et tolérant aux stress environnementaux. Les voies utilisées pour y parvenir peuvent être plus ou moins longues et différentes selon que nous avons affaire, à des plantes autogames ou allogames, et annuelles ou pérennes.

Compte tenu de la longueur des cycles de sélection chez les espèces pérennes, un certain nombre de tests sont recherchés en vue d'accélérer le processus d'amélioration et de raccourcir ainsi la durée des cycles.

Des difficultés pratiques peuvent apparaître au cours de l'application et l'interprétation des résultats de ces tests sur le terrain.

La présente note a donc pour but de présenter et de discuter des problèmes soulevés par les tests précoces de productivité en général et en particulier chez le palmier à huile.

Notre exposé comportera cinq points :

- but du test précoce;
- critères de sélection;
- dispositifs expérimentaux;
- application : exemple du palmier à huile;
- problèmes liés au test;
- conclusion.

But du test précoce

Le test précoce est un moyen technique rapide utilisé par les sélectionneurs pour prédire et anticiper les conclusions d'une expérimentation. En matière d'amélioration des plantes, c'est la technique qui permet de prédire la valeur d'un génotype pour un caractère agronomique. Le test doit s'intégrer parfaitement dans un schéma d'amélioration et pouvoir augmenter l'efficacité de la sélection.

Divers moyens techniques peuvent être utilisés :

- mesure des caractères physiologiques (croissance, vigueur, caractères structuraux);
- dosage d'activités enzymatiques (vitesse de réaction, affinités, activités spécifiques);

Les tests précoces de la productivité

- analyses électrophorétiques (isoenzymes, polymorphisme),
- dosages chimiques d'oligoéléments;
- analyses chromatographiques;
- test d'inoculation en champ.

Ces différentes techniques permettent d'obtenir des données expérimentales susceptibles d'être analysées statistiquement.

Les résultats obtenus par le test précoce sont à comparer à ceux attendus de l'expérimentation à grande échelle.

Les critères de sélection précoce

En 1966, Polinière et d'Auzac ont étudié divers caractères structuraux, physiologiques, techniques et ont proposé de classer les caractères potentiels utilisés à la sélection de l'hévéa [10] :

- caractères causaux, en relation de cause à effet avec la production (c'est le cas de l'indice d'éclatement des lutoïdes et de l'activité de l'invertase);
- caractères corrélatifs liés au métabolisme de la production (c'est le cas des teneurs en magnésium et en saccharose et de la proportion d'extrait sec);
- caractères de vocation sans rapport connu avec le métabolisme.

Dans ce contexte, un caractère ne pourra être retenu comme critère de sélection précoce que si sa liaison avec des caractères agronomiques a une validité statistique prouvée; ce qui se produira avec une forte probabilité s'il s'agit d'un caractère ayant une signification biologique, c'est-à-dire un caractère causal [9].

Dans le cas spécifique du palmier à huile, les activités respiratoires des mitochondries, les activités photosynthétiques d'une part, les structures protéiques, la teneur en potassium (K^+), les poids de régimes ou d'huile, les caractères de tolérance ou de résistance aux maladies et aux stress d'autre part, constituent les causes ou les conséquences d'une activité métabolique intense.

Ainsi, les paramètres mitochondriaux, en particulier le rapport ADP/O, sont les conséquences des activités physiologiques et biochimiques qui se déroulent non seulement au niveau des mitochondries, mais également au niveau de la plante entière.

Les liaisons étroites entre activités mitochondriales et production de régimes démontrées chez le palmier à huile plaident en faveur de la classification des paramètres déterminés en caractères causaux et corrélatifs, car ils sont liés à la biologie même de la plante [4, 5]. La possibilité de discrimination par analyse statistique des données biologiques prouve bien leurs caractères causaux.

La validité des critères de sélection repose sur un dispositif expérimental qui devra rendre crédible le test précoce envisagé.

Dispositifs expérimentaux

Dans une expérience, l'expérimentateur a une idée *a priori* sur le phénomène à étudier et il doit choisir un modèle statistique. Cependant, quelles que soient les précautions prises, il subsiste toujours des facteurs non maîtrisés, qui constituent des causes d'erreurs. Il en résulte un écart entre la valeur mesurée, qui n'est qu'une estimation, et la valeur réelle des paramètres. Son importance s'évalue par l'« erreur résiduelle ». Afin de réduire les conséquences de cette erreur résiduelle sur l'estimation des paramètres, l'expérimentateur est tenu de prendre des dispositions qui sont de deux ordres :

Différentes étapes doivent être nécessairement suivies :

- choix du nombre de répétitions par objet;
- choix du nombre d'échantillons par répétition;
- choix du nombre d'individus par échantillon;
- randomisation systématique de l'échantillonnage, quels que soient les facteurs pris en compte, afin d'éviter les effets liés à la subjectivité de l'opérateur ou aux facteurs systématiques non maîtrisés.

Plusieurs précautions au cours de l'expérimentation doivent être également prises :

- recherches et utilisations des conditions standardisées (milieux, pH, pression osmotique);
- acquisitions correctes des données car une erreur commise sur une mesure ne doit pas influencer l'erreur faite sur une autre.

Ainsi, dans le cadre des mesures des activités respiratoires des mitochondries de palmier [4], un certain nombre de critères sont pris en compte pour réduire au maximum la variabilité :

- un choix et une utilisation d'organes végétaux ayant le même état physiologique (apex de racines de plants de pépinière élevés dans les mêmes conditions);
- une quantité toujours égale de matière fraîche (10 g) quel que soit le croisement;
- préparation d'une seule solution de substrat de réaction et d'un milieu de broyage unique valable pour une série d'essais au cours de l'année constituant la campagne de mesure;
- un même manipulateur pour le broyage qui est manuel;
- un même manipulateur pour les mesures faites à l'oxygraphe;
- un dosage des protéines le même jour pour les échantillons d'une même répétition;
- la détermination des paramètres sur les tracés oxygraphiques par le même manipulateur pour une série de mesure;
- la standardisation des données des tracés oxygraphiques afin que l'erreur standard n'excède pas 10 %, performance acceptable comme pour la plupart des études quantitatives sur les mitochondries isolées [2].

Cependant, la standardisation des tracés oxygraphiques n'est pas matériellement possible si la concentration en protéines mitochondriales est trop élevée dans le

milieu [9]. Dans ce cas, la vitesse de la consommation d'oxygène est tellement rapide qu'il est impossible d'enregistrer plusieurs cycles successifs avant anaérobiose totale du milieu.

Par ailleurs, les mitochondries végétales présentent un phénomène d'autostimulation du transfert d'électrons au cours des additions successives d'ADP [9].

Dans le cas des mesures effectuées sur les mitochondries isolées de racines de palmier à huile, les valeurs les plus homogènes et les plus reproductibles ont généralement été enregistrées au cours des cycles 2, 3 et 4 correspondant à 60 % d'oxygène consommé dans le milieu réactionnel (fig. 1) [4].

Le prélèvement de quantités identiques de protéines mitochondriales peut entraîner également des erreurs si les prises d'essais sont trop petites. Mais le

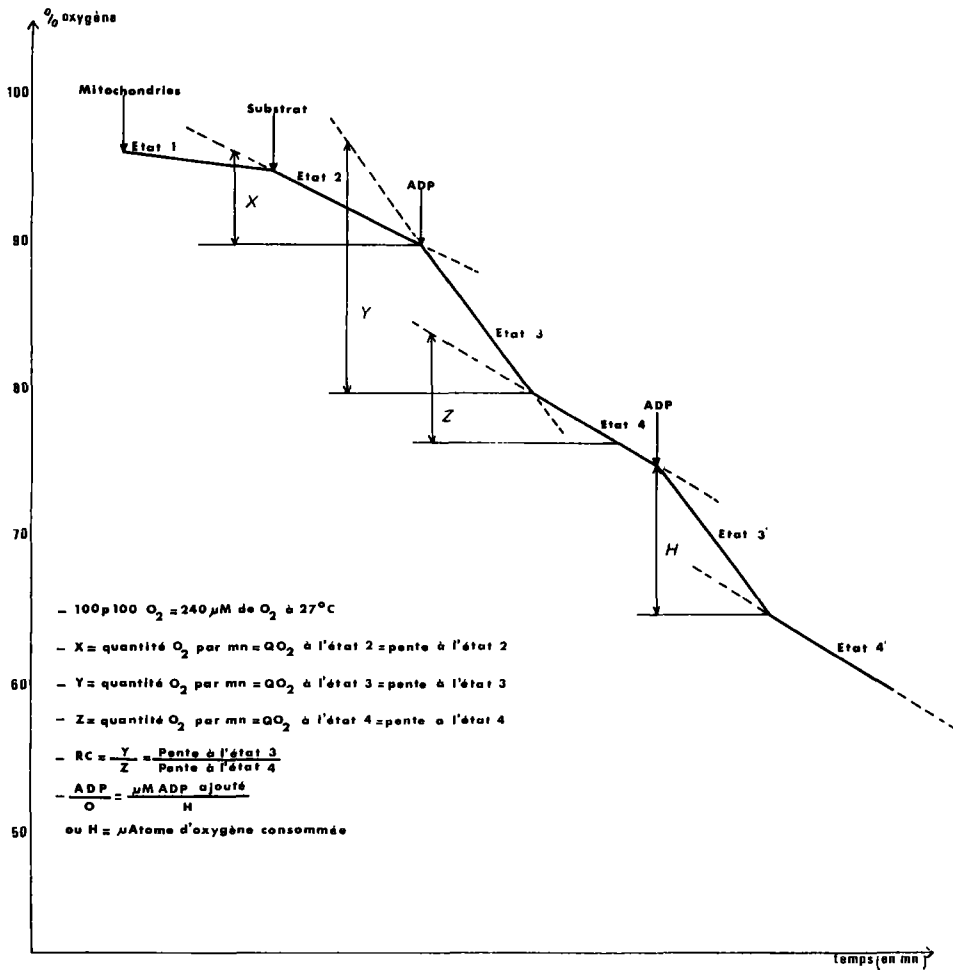


Figure 1. Trace polarographique pour la détermination des différents paramètres mitochondriaux.

Tableau I. Performances des croisements testés en champ.

Origine LM-GP43		Croisement		Production							
				3 ans		4 ans		3-4 ans		ADP/O (a)	
D115D × L2T	LM 10644	L2509D × L1601P	103,020	1	50,425	7	76,723	1	1,54	1	
D115D × L2T	10820	L2525D × L1598P	98,137	2	45,865	12	72,001	3	1,36	16	
D115D × L2T	10513	L3394D × L2255P	92,964	3	44,403	14	68,683	8	1,41	11	
D115D × L2T	10728	L2530D × L2471P	92,955	4	43,065	16	68,010	9	1,42	8	
D115D × L2T	10928	L2345D × L1586P	91,810	5	50,754	6	71,782	4	1,43	6	
D115D × (L5T × L2T)	10912	L3394D × L4335P	91,003	6	46,798	11	68,901	7	1,48	4	
D115D × (L5T × L2T)	10747	L2509D × L2255P	90,437	7	37,671	20	64,054	14	1,41	13	
D115D × (L5T × L2T)	10289	L2346D × L1590P	89,609	8	58,009	2	73,809		1,43	7	
D115D × (L5T × L2T)	10564	L3005D × L2236P	88,66	9	50,393	8	69,527	6	1,51	2	
D115D × L2T	10642	L2529D × L2038T	87,826	10	45,570	13	66,698	11	1,42	8	
D115D × L2T	10379	L3318D × L2465P	86,020	11	43,208	15	64,615	13	1,39	15	
D115D × (L5T × L10T)	11156	L5006T × L2530D	84,842	12	43,020	18	63,931	16	1,39	14	
D115D × (L2T × L10T)	10673	L2346D × P2752P	83,764	13	59,319	1	71,542	5	1,38	17	
Lignée témoin	10334	L2T × D10D	81,692	14	53,609	4	67,651	10	1,36	10	
D115D × L10T	10691	L2532D × L4999T	80,686	15	47,998	9	64,042	15	1,41	12	
D115D × L2T	10561	L3394D × L2754P	78,182	16	47,955	10	63,068	17	1,48	3	
D115D × (L5T × 10T)	10957	L2528D × L5005T	75,659	17	55,981	3	65,820	12	1,42	8	
D115D × (L2T × L10T)	10778	L2529D × P2965T	73,020	18	42,865	19	57,942	19	1,44	5	
D115D × L10T	10808	L2528D × L4397P	70,376	19	43,043	17	56,710	20	1,35	20	
D115D × L5T	10378	L3318D × L2952P	69,587	20	53,436	5	61,512	18	1,34	19	

(a) classement

problème a été résolu en homogénéisant la suspension à l'aide d'un pinceau doux et en prélevant 500 microlitres de cette suspension par prise d'essai.

Ainsi, pour que l'analyse statistique soit valable, il faut que les mesures soient répétées au moins six fois. En fait, pour la comparaison des hybrides, on a déterminé que douze répétitions constituaient un optimum.

La détermination de la moyenne (m) des répétitions et de l'écart type correspondant permet d'apprécier la variabilité et la répétabilité des mesures.

L'analyse de variance sur les mesures obtenues est un test d'égalité des moyennes à partir d'une probabilité donnée. Lorsque la statistique F (Snedecor) est significative, on conclut à une différence des moyennes; dans ce cas, on utilise le test de Duncan [1], au seuil 5 % pour comparer ces moyennes.

Application : exemple du palmier à huile

Exploitation statistique

Toutes les dispositions expérimentales et statistiques étant prises, nous avons pu mettre en évidence l'hétérosis mitochondriale. La possibilité d'application des résultats dans le tri précoce de plusieurs croisements a été tentée [4, 6].

L'établissement d'un test précoce fait intervenir deux étapes essentielles : la mise au point du test et sa validation.

La mise au point est caractérisée par le respect des dispositifs, un nombre relativement élevé d'essais, l'étude de la répétabilité des mesures ainsi que la mise en évidence de corrélations positives entre les mesures expérimentales effectuées dans plusieurs essais différents et les caractères agronomiques connus.

La validation du test consiste en la confrontation des résultats expérimentaux obtenus en laboratoire avec les résultats physiques et agronomiques obtenus en champ. Dans notre cas, les résultats expérimentaux doivent être en relation positive avec les caractères agronomiques mesurés sur les mêmes matériels quelques années plus tard.

Premiers résultats

Rappelons que le test exploite la relation entre la production des arbres adultes en poids de régimes (moyenne 6-9 ans) et les paramètres mitochondriaux observés sur des plants de pépinière [4].

Le test mitochondrial a été effectué en 1983 sur 38 croisements appartenant à l'essai LMGP43 dont le but est d'améliorer des croisements interorigines (Dura déli $\times$ T ou Pisifera de la ME). Les mesures ont été réalisées sur des plants de pépinière (6 à 8 mois).

L'analyse de variance des valeurs obtenues a donné un F significatif à 5 %.

Le test de Duncan a permis de faire des comparaisons et de constituer trois classes homogènes de ces croisements.

Vingt croisements dont le témoin L2T $\times$ D10D ont été choisis sur les critères ADP/O pour être plantés (52 % des croisements).

Trois ans, puis quatre ans après la plantation, les premières productions des croisements en champs ont été confrontées aux paramètres ADP/O déterminés 3 ou 4 ans auparavant.

Le tableau I récapitule ces croisements avec leur production à 3 ans, 4 ans, la moyenne 3-4 ans d'une part et la valeur ADP/O déterminée 3 et 4 ans auparavant, correspondante à chaque croisement.

(a) correspond au classement de chaque croisement à 3 ans, 4 ans et 3-4 ans et (b) le classement par la valeur ADP/O.

L'analyse de ce tableau conduit à plusieurs réflexions :

- à 3 ans, le coefficient de corrélation entre production et ADP/O est $r = 0,44$ significative à 5 % avec 18 ddl;
- à 4 ans, la corrélation est non significative;
- à 3-4 ans, la corrélation est positive mais non significative, $r = 0,40$.

L'existence de corrélation positive et significative peut constituer une preuve de la concordance des premiers résultats en champs avec les paramètres mitochondriaux calculés *a priori*.

Il faut noter que les croisements issus de D115D $\times$ L2T sont en moyenne en tête pour les valeurs ADP/O; ils le sont également en ce qui concerne les productions à 3 ans et la moyenne 3-4 ans, la production à 4 ans étant anormalement basse.

Ainsi, le croisement LM10644 classé premier par le test mitochondrial a été classé premier pour la production à 3 ans, 7^e à 4 ans; et premier en moyenne 3-4 ans.

Le croisement LM10378, classé 20^e au niveau du test mitochondrial, est classé 20^e pour sa production à 3 ans, 5^e à 4 ans et 18^e à 3-4 ans.

L'instabilité observée dans l'évolution des productions est due aux variations des conditions du milieu (climat, ravageurs, etc.). En conséquence, de profonds changements ont eu lieu dans le classement des croisements entre 3 et 4 ans, dus à une diminution brutale du nombre de régimes. Les paramètres ADP/O sont restés constants car déterminés 3 ou 4 ans auparavant.

Le tableau II récapitule les croisements regroupés par origine génétique parentale. Six groupes ont été constitués avec malheureusement un nombre inégal de croisements pour chaque groupe. Ce tableau montre que les croisements ayant L2T ou la combinaison (L5T $\times$ L2T) comme parent mâle ont les productions les plus élevées à 3 ans et 3-4 ans, ils ont également les meilleurs ADP/O.

Tableau II. Récapitulation des combinaisons testées en champ.

Origine	Nombre de croisements	Production			
		3 ans $\bar{x}$	4 ans $\bar{x}$	3-4 ans $\bar{x}$	ADP/O $\bar{x}$
D115D $\times$ L2T	8	91.364	46.405	68.947	1,43
D115D $\times$ (L5T $\times$ L2T)	4	89.927	48.217	69.072	1,46
D115D $\times$ (L5T $\times$ L10T)	2	80.250	49.500	64.875	1,40
D115D $\times$ (L5T $\times$ L10T)	2	78.392	51.092	64.742	1,41
D115D $\times$ L10T	2	75.531	45.520	60.376	1,38
D115D $\times$ L5T	1	69.587	53.435	61.512	1,34

Les tests précoces de la productivité

Bien que le nombre de degrés de liberté soit faible (4) ces coefficients sont significatifs (sauf à 4 ans), les coefficients de corrélation production-ADP/O obtenus sont les suivants :

- à 3 ans, $r = 0,930^{***}$
- à 4 ans, $r = 0,493$ NS
- à 3-4 ans, $r = 0,886^{***}$.

Les paramètres mitochondriaux sont donc globalement corrélés à la production de régimes. Cependant, il faut noter que les variations plus ou moins cycliques de la production rendent nécessaire son observation sur une longue période (3 à 9 ans) pour obtenir une estimation correcte de la valeur génétique des croisements.

Problèmes liés au test de tri précoce

La confrontation et la comparaison des paramètres obtenus en champ et ceux mesurés en laboratoire montrent quelque fois des divergences liées à des difficultés de plusieurs ordres, entravant les interprétations ultérieures :

Conditions expérimentales

La mise au point d'un test suppose que celui-ci remplisse certaines conditions expérimentales standards qui doivent être maintenues de façon permanente.

Tout changement d'un des facteurs modifie évidemment la précision du test.

Automatisation des tests précoces

Tout test réalisé avec des appareils fonctionnant de façon automatique réduit considérablement les sources de variabilité. Cependant, il est difficile de trouver actuellement des équipements permettant d'automatiser la mesure du paramètre ADP/O. Les résultats obtenus sont donc influencés par les conditions expérimentales.

Répétabilité

Si toutes les conditions expérimentales sont réunies, le test précoce doit être répétable dans le temps, l'action du manipulateur étant prépondérante ; toute défaillance humaine entraîne indubitablement des erreurs incontrôlées qui affectent considérablement les résultats des tests.

Conformité

Très peu de test précoces permettant de prédire la productivité ont jusque-là donné entière satisfaction, soit parce qu'il est difficile d'avoir les mêmes conditions

expérimentales, soit parce que l'automatisation de la collecte des mesures reste encore impossible.

De plus, une fois que le test précoce est effectué, il est difficile de concilier les résultats en laboratoire avec ceux obtenus sur le même matériel choisi plusieurs années avant et mis en place en champ.

L'exemple présenté ici montre que l'hétérogénéité des conditions du milieu devient un facteur limitant des corrélations recherchées; cette hétérogénéité étant essentiellement due aux conditions climatiques et aux stress environnementaux. C'est pourquoi, il est nécessaire de contrôler la validité du test à partir de moyennes de production calculées sur au moins quatre années.

Conclusion

A chaque plante correspond toujours un schéma d'amélioration qui lui est adapté, mais la longueur des cycles de sélection de certaines espèces fait que l'emploi d'un test précoce peut de toute évidence réduire considérablement les durées de sélection.

Ce test peut intervenir aussi bien en amont qu'en aval d'un schéma d'amélioration, ou même au niveau des tests comparatifs des hybrides.

La difficulté majeure dans le cas d'un test précoce est de trouver des relations satisfaisantes entre les résultats expérimentaux et les valeurs des caractères agronomiques en champ; néanmoins, un test précoce a *a priori* de nombreux avantages chez le palmier à huile :

- il est plus efficace lorsqu'il est effectué en amont des tests comparatifs d'hybrides;
- il permet de choisir à l'avance au stade très précoce, les hybrides susceptibles d'être testés en essai comparatif et présentant les meilleures aptitudes à la combinaison;
- il permet également de réduire de façon considérable la durée d'une génération par le choix des meilleurs hybrides.

Dans tous les cas, l'objectif est de parvenir à une augmentation considérable de la production à partir des choix précoces des hybrides les plus productifs.

La maîtrise de tous les problèmes soulevés par le test précoce permettra sans aucun doute de faire une économie des moyens mis en œuvre, ce qui est un aspect fondamental chez le palmier à huile à cause de la longueur des cycles de sélection.

Références

1. Duncan WG. (1955). Multiple range and multiple F test. *Biometric* ; 11 : 1-42.
2. Gallinet JP. (1984). Problèmes posés par l'estimation quantitative des propriétés physiologiques mitochondriales. *Plant physiol* ; 22 (5) : 615-24.
3. Kouamé B. (1976). Bases biochimiques de l'hétéroxis mitochondriale chez le palmier à huile, *Elaeis guineensis* (Jacq.). Thèse de doctorat 3^e cycle, Amélioration des plantes, université de Paris-sud (Orsay).

Les tests précoces de la productivité

4. Kouamé B, Noiret JM. (1981). Test précoce de la productivité chez le palmier à huile (*E. guineensis jacq.*) par la mesure des activités mitochondriales. *Oléagineux* ; 36 n° 11 : 533-42.
5. Kouamé B. (1987). Test précoce de la productivité chez le palmier à huile (*E. guineensis jacq.*) par la mesure de l'hétérosis mitochondriale. Doctorat d'Etat Es-Science P. 212, n° d'ordre 104, Fast.
6. Kouamé B. (1989). Test précoce de la productivité chez le palmier à huile. Amélioration et protection des plantes vivrières tropicales. Paris : AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, 55-67.
7. Lance C. (1971). Les mitochondries de l'inflorescence de chou-fleur. I. Propriétés oxydatives. *Physiologie végétale* ; 9 : 259-79.
8. Lance C. (1987). Les mitochondries de l'inflorescence de chou-fleur. Les propriétés oxydatives. *Physiologie végétale* ; 13 (1) : 83-94.
9. Odier F. (1983). Recherches des critères de sélection précoce chez l'hévéa *brasiliensis*. Doctorat 3^e cycle, Amélioration des plantes, Paris Sud.
10. Polinière JP, d'Auzac J. (1966). Introduction à une étude des critères de sélection génétique chez l'hévéa *brasiliensis*. *Rev Gén Caout Plast* ; 43 (1) : 85-92.
11. Raison JK, Lyons JM. 1970. The influence of mitochondrial concentration and storage on the respiratory control isolated plant mitochondria. *Plant Physiol* ; 45 : 382-5.
12. Raison JK, Laties GG, Crompton M. (1973). The role of state 4 electrons transport in the activation of state 3 respiration in potato mitochondria. *J Bioenerg* ; 4 : 409-23.

10

Méthode d'évaluation du comportement du palmier à huile vis-à-vis de la fusariose vasculaire due à *Fusarium oxysporum f.sp. elaeidis*. Résultats

J.L. RENARD*, H. de FRANQUEVILLE**,
J. MEUNIER*, J.M. NOIRET*

* IRHO/CIRAD, division phytopathologie et division sélection, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 01, France

** IRHO/CIRAD, Plantation Expérimentale R. Michaux, BP 8, Dabou, Côte-d'Ivoire

Résumé

L'inoculation de plantules de palmiers à huile avec le *Fusarium oxysporum f.sp. elaeidis* au stade de la prépépinière permet d'évaluer précocement le comportement du matériel végétal. Le test est appliqué à l'ensemble des croisements résultant du programme général d'amélioration du palmier à huile et aux croisements destinés aux plantations en zone fusariée. Il permet d'identifier les sources de résistance au niveau des géniteurs en particulier et d'évaluer le comportement général de la descendance d'un croisement donné, et ainsi d'orienter le choix du matériel végétal à produire et à planter.

Les clones inoculés dans les mêmes conditions se comportent comme les croisements sexués, avec une gamme étendue de réponse, mais on ne peut actuellement dégager de règle générale entre le comportement d'un clone et le croisement duquel il est issu.

Les tests effectués sont confortés par les résultats au champ. La diminution progressive de la maladie en plantation en zone fusariée confirme le bien-fondé de

la politique mise en œuvre depuis plus de vingt ans pour sélectionner un matériel végétal tolérant à la fusariose.

Introduction

La fusariose du palmier à huile due à *Fusarium oxysporum f.sp. elaeidis* est la maladie la plus importante du palmier à huile en Afrique. La lutte chimique contre un champignon vasculaire d'origine tellurique est impensable pour une plante pérenne en grande surface, et la recherche de matériel végétal tolérant constitue la seule voie qui permette de lutter efficacement contre la fusariose. Cette sélection est basée sur un test d'inoculation de jeunes plantules au stade de prépépinière et sur le comportement au champ des palmiers en zone fusariée. Ces tests sont également appliqués aux croisements destinés aux essais comparatifs de descendance et aux introductions de matériel végétal pour identifier les sources possibles de résistance. Plus récemment, le même dispositif a été appliqué sur les clones de palmiers à huile afin d'en évaluer leur comportement vis-à-vis de la fusariose.

Matériel et méthodes

Toute l'expérimentation est basée sur l'inoculation de plantules de prépépinière âgées de un mois et demi à deux mois. Le matériel sexué issu de graines, tout comme les plantules de clones, est soumis au même mode d'inoculation. L'inoculation a lieu au collet de la plantule, préalablement dégagé de la terre qui l'entoure, pour laisser apparaître la base des racines et les radicelles les plus superficielles.

L'inoculum est obtenu par broyage d'une culture âgée de cinq jours du *Fusarium oxysporum f.sp. elaeidis* ; chaque plantule reçoit 20 ml du broyat contenant en moyenne $3,5 \times 10^6$ propagules.

Un dispositif en bloc à huit répétitions est adopté pour conduire ces tests ; la parcelle élémentaire comporte vingt plantules. Chaque clone est ainsi testé sur 160 plantules.

Des observations mensuelles, basées sur les symptômes externes de fusariose (rabougrissement des jeunes feuilles, jaunissement, éventuellement mort du plant), sont réalisées chaque mois et une lecture définitive est effectuée entre cinq et six mois après l'inoculation.

Cette lecture est complétée soit par la dissection du pseudobulbe pour une confirmation des symptômes externes, soit par de nouvelles observations durant encore cinq à six mois après repiquage des plants en pépinière dans le cas des clones en particulier.

L'indice de fusariose obtenu à partir des symptômes à cinq mois est calculé par la formule suivante :

$$I = \frac{\% \text{ de plants fusariés du croisement} \times 100}{\% \text{ moyen de plants fusariés de l'ensemble des croisements testés dans le test}}$$

Dans le cas du matériel clonal, représentant une nouveauté par rapport au matériel sexué, il est prévu de tester chaque clone au moins dans trois séries différentes de trois tests.

Le matériel végétal sexué, testé pour son comportement vis-à-vis de la fusariose, provient des différents programmes de sélection :

— Programme général d'amélioration du palmier à huile [1] dont le schéma repose sur le principe de la sélection récurrente réciproque :

• croisements et autofécondation de Dura, de Tenera et de Pisifera d'origines diverses (La Mé, Yangambi, Sibiti, Nigeria, Yocoboué);

• croisements D × T, T × D, D × P faisant partie du programme de tests d'aptitude à la combinaison entre arbres de l'origine Deli et les autres origines.

— Programme d'introduction de nouveaux *E. guineensis* ;

— Programme d'étude et d'amélioration de l'*E. oleifera* ;

— Programme de production de semences consistant à rechercher des croisements tolérants reproduisant des hybrides bons producteurs à partir des tests d'aptitudes à la combinaison.

Résultats des tests précoces d'inoculation

Caractérisation globale des différentes catégories

Le test en préépinière effectué sur un grand nombre de croisements d'une même catégorie a permis de caractériser chacun de ces hybrides (Tableau I). Les croisements d'indice inférieurs à cent plantés au champ ont des comportements conformes au test; plus l'indice de la catégorie est faible, meilleur est le comportement au champ [2].

Caractérisation des géniteurs

Choix des arbres dans la population d'origine

La comparaison des résultats des différents tests montre que certains géniteurs transmettent à leur descendance un comportement sensiblement constant qui se

Tableau I. Classification des catégories sur la base de l'indice de préépinière et du comportement au champ.

Catégorie	En pépinière				Au champ		
	Nombre de croisements testés	% croisement Indice < 100	% croisement Indice > 100	Moyenne	Nombre d'arbres plantés	% Fusariose	Indice moyen
D115D × L2T	92	74	26	79	7869	1,0	64
D5D × L5T	33	55	45	95	5048	1,1	81
D118D × L2T	55	67	33	87	9922	1,9	75
D10D × L2T	428	60	40	91	31603	2,0	78
D118D × L451T	44	57	43	100	8987	2,1	81
D407D × L451T	65	15	85	132	1469	3,8	90

caractérise soit par une résistance notable, soit par une grande sensibilité. Cette propriété apparaît quand on considère l'indice moyen (Ig) d'un géniteur obtenu à partir de la moyenne des indices des croisements dans lesquels le géniteur intervient. On a pu mettre en évidence l'influence prépondérante du géniteur *Pisifera* dans le comportement des croisements. C'est ainsi qu'un arbre tel que le L498P (Ig = 77) donne, dans 54 croisements effectués avec 38 Dura différents, 44 croisements d'indice inférieur à 100, alors qu'un palmier comme le L322P (Ig = 127) croisé avec 25 Dura différents produit 34 croisements sur 38 ayant un indice supérieur à 100. La variabilité des Dura est faible mais on a pu déceler que les Dura D115D et L269D croisés avec L2T transmettent une très bonne résistance [3].

La même démarche permet de repérer à l'intérieur de nouvelles introductions les arbres renfermant des caractères de tolérance. Le Tableau II présente la variabilité existant entre les différents arbres testés dans les populations de *Elaeis oleifera* d'Amérique latine. Les origines La Brisa, Armuelles se caractérisent par un pourcentage élevé d'arbres avec un très faible indice [4].

Tableau II. Comportement vis-à-vis de la fusariose de *E. oleifera* de diverses origines et de ses croisements avec *E. guineensis*.

Origines	Nombre de <i>E. oleifera</i>	Indice moyen	% d'arbres donnant des indices		
			< 100	> 100	compris entre 0 et 20
<i>E. oleifera</i> (toutes origines confondues)	46	58	80	20	35
Hybrides <i>E. oleifera</i> × <i>E. guineensis</i>					
Brésil (Belem)	10	168	10	90	0
Colombie					
- San Alberto	9	90	78	22	0
- Monteria					
La Brisa	15	56	80	20	40
Villa Coral	4	107	50	50	0
La Florida	3	113	33	67	0
Bella Vista	10	117	30	70	10
Aguas Vivas	9	136	33	67	11
Panama					
- Armuelles	11	21	91	9	82
- Sona	4	74	50	50	25
- Guabala	13	87	69	31	54
Costa Rica					
- Golfito	12	92	58	42	42
- Limon	11	105	45	55	36
- Quepas	8	146	50	50	38

Comportement des géniteurs issus d'autofécondation

La reproduction des croisements les plus tolérants est obtenue à partir de combinaisons entre Dura et Pisifera résultant respectivement des autofécondations des Dura et Tenera parentaux.

● Cas des Pisifera

Le regroupement des croisements issus d'un Pisifera donné permet d'attribuer à ce Pisifera un indice moyen reflétant son aptitude générale à la combinaison par la tolérance à la fusariose. Cet indice correspond à la moyenne des indices des croisements issus du Pisifera considéré.

La figure 1 représente la distribution des indices des Pisifera issus des autofécondations de L2T.

Le Tableau III résume le comportement des Pisifera les plus sensibles et les plus tolérants : l'arbre L1581P obtient un indice de 70 basé sur 49 croisements, dont 45 se montrent plus tolérants que la moyenne ($I < 100$); à l'inverse, L2255P obtient un indice de 124 basé sur 62 croisements dont 44 sont sensibles à la fusariose. Ceci démontre le grand intérêt d'analyser l'aptitude des Pisifera dérivant de l'autofécondation de L2T pour diriger la production de semences tolérantes à la fusariose.

● Cas des Dura

La reproduction de l'hybride D115D $\times$ L2T constitue actuellement la source la plus importante de matériel tolérant à la fusariose.

On vient de voir l'importance du parent Pisifera mais il existe également une certaine variation entre les Dura issus de D115D. Ainsi, en 1^{re} génération, l'ensemble des Dura de l'autofécondation de D115D a un indice moyen de 94, les croisements étant d'autant plus tolérants que le partenaire Pisifera est tolérant. En

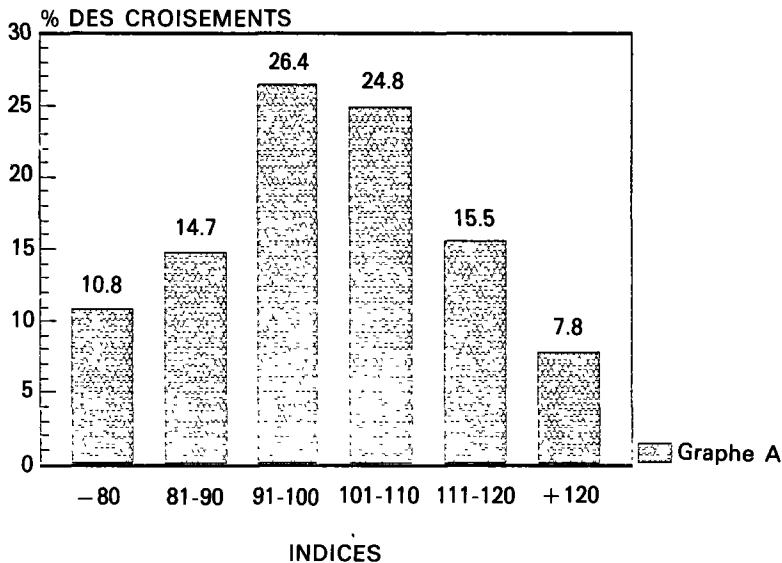


Figure 1. Dispersion des indices moyens des pisifera de L2T AF.

Tableau III. Pisifera résistants ou sensibles.

Géniteurs tolérants					Géniteurs sensibles				
Pisifera	Im	n.cr.	< 100	> 100	Pisifera	Im	n.cr.	< 100	> 100
D 2878 P	79	24	20	4	D 2885 P	123	2	1	1
D 2883 P	80	19	15	4	D 2886 P	122	10	4	6
D 2892 P	78	6	5	1	D 2887 P	118	7	2	5
D 2896 P	84	6	5	1	L 1563 P	116	1	0	1
L 1574 P	87	21	15	6	L 1571 P	122	9	3	6
L 1577 P	80	2	1	1	L 1575 P	114	10	4	6
L 1581 P	70	49	45	4	L 1576 P	111	13	5	8
L 1585 P	80	4	3	1	L 1580 P	110	18	5	13
L 1586 P	86	7	5	2	L 1587 P	118	19	7	12
L 1590 P	89	41	26	15	L 1604 P	150	1	0	1
L 1593 P	83	11	7	4	L 1608 P	110	12	5	7
L 1594 P	83	6	4	2	L 2226 P	111	22	9	13
L 1607 P	87	28	17	11	L 2233 P	113	50	15	35
L 2235 P	72	10	8	2	L 2234 P	125	14	2	12
L 2245 P	87	25	16	9	L 2239 P	115	16	6	10
L 2247 P	90	7	4	3	L 2243 P	113	24	10	14
L 2258 P	75	2	2	0	L 2246 P	121	13	3	10
L 2259 P	86	23	17	6	L 2255 P	124	62	18	44
L 2267 P	87	20	11	9	L 2256 P	112	32	11	21
L 2274 P	81	16	13	3	L 2264 P	112	19	5	14
L 2275 P	62	7	7	0	L 2268 P	112	12	3	9
L 2280 P	81	17	10	7	L 2270 P	111	20	6	14
P 2551 P	80	18	14	4	L 2271 P	113	4	2	2
P 2553 P	87	9	7	2	L 2277 P	120	67	24	43
P 2555 P	79	33	29	4	L 2279 P	113	23	11	12
P 2557 P	81	27	22	5	L 2461 P	117	15	5	10
					L 2464 P	113	12	7	5
					L 2474 P	114	10	4	6
					L 2475 P	144	3	0	3
					L 2476 P	116	27	8	19
					P 2559 P	110	14	6	8

2^e génération, les descendants des Dura précédents montrent des niveaux de tolérance sensiblement différents, l'influence des Pisifera étant inchangée (Tableau IV).

Des informations analogues ont été obtenues sur d'autres reproductions d'hybrides (D115D × L269D) × L2T, (D5D × D3D) × L2T, D5D × L2T.

Il apparaît alors qu'à partir d'un matériel globalement tolérant, (D115D × L2T) ou (D115D × L269D) × L2T, il existe encore des possibilités d'amélioration en éliminant les géniteurs manifestant des caractères de sensibilité.

Caractérisation du matériel clonal

Au total, 37 clones ont été testés au moins une fois au cours de ces trois dernières années. Le Tableau V regroupe dans l'ordre chronologique, par série, l'ensemble des résultats obtenus dans les six séries de tests. Il indique également les croisements dans lesquels les têtes de clones ont été choisies ainsi que l'indice de fusariose lorsqu'il est connu.

D'une série à l'autre, des points communs apparaissent au niveau des comportements extrêmes. La relation qui existe entre ces séries sont précisées par le calcul des coefficients de corrélations.

Ces corrélations montrent que les résultats de la série 136 sont en accord avec ceux des séries 134 et 130. De même pour la série 130, il existe une bonne corrélation entre les résultats de préépinière et de pépinière.

La moins bonne corrélation (0,50) entre la série 136 (préépinière) et la série 130 (pépinière) provient sans doute du fait du faible pourcentage de plants fusariés de la série 130.

Les tests effectués sur les clones apportent des informations sur le comportement d'un clone dans différents domaines :

— d'une manière générale, le comportement d'un clone se maintient d'un test à l'autre. Ceci se traduit par un résultat bien marqué par rapport au niveau d'indice

Tableau IV. Caractérisation de Dura reproduisant D115D × L2T en 1^{re} et en 2^e génération.

Stades	Parents	Im	n.cr.	< 100	> 100	Imp	Pt	Pst	Ps
1 ^{re} génération	D115D AF	94	385	229	156	99	81 (93)	95 (206)	106 (85)
2 ^e génération	L2344D AF	103	14	6	8	101	101 (4)	93 (7)	127 (3)
	L2331D AF	79	17	13	4	95	60 (8)	86 (6)	119 (3)
	L2346D AF	114	16	8	8	100	78 (4)	117 (8)	145 (4)
	L2513D AF	103	8	4	4	102	141 (1)	91 (5)	112 (2)
	L3394D AF	81	13	10	3	94	77 (6)	80 (5)	95 (2)
	L2509D AF	89	19	13	6	97	76 (8)	96 (7)	106 (4)
	L2347D AF	98	32	20	12	95	90 (13)	92 (14)	136 (5)
Moyenne		95	119	74	45	97	81 (44)	95 (52)	123 (23)

Imp = Indice moyen des Pisifera.

Pt = Pisifera tolérants.

Pst = Pisifera standard.

Ps = Pisifera sensibles.

() = Nombre de croisements.

Tableau V. Comportement des clones.

Clone	Croisement	Indices parentaux	Ic	Pré-pépière						
				Série 122	Série 123	Série 124	Série 130	Série 130	Série 134	Série 136
LMC 009	L10T x D8D	103 (9-6) x 126 (3-15)	184		17,1 113	39,5 107	5,0 42	14,2 60		31,9 73
LMC 020	L10T x D17D	103 (9-6) x 94 (14-10)	75	36,0 100			10,8 90	30,8 129	31,7 133	65,6 150
LMC 022	D115D x L2T	87 (12-9) x 86 (45-17)	58		4,3 28		2,5 21	3,3 14	10,0 42	28 (3-0)
LMC 026	D3D x L2T	101 (11-18) x 86 (45-17)	69				7,5 63	19,2 81	17,5 74	35,6 82
LMC 032	L5T x L269D	48 (7-1) x 92 (25-14)	86						4,2 18	10,0 23
LMC 037	L2T x D118D	86 (45-17) x 103 (14-25)	51				13,3 111	18,3 77	26,6 112	40,6 93
LMC 042	L10T x D17D	103 (9-6) x 94 (14-10)	75				20,0 167	28,3 119	33,3 140	46,2 106
LMC 043	L10T x D17D	103 (9-6) x 94 (14-10)	75		17,1 113	40,5 109	21,7 181	29,2 122	59,4 136	118 (0-4)
LMC 044	L10T x D17D	103 (9-6) x 94 (14-10)	75				10,8 90	20,8 87	14,2 60	38,1 87
LMC 047	L10T x D118D	103 (9-6) x 103 (14-15)	58						43,8 100	100
LMC 051	L2T x D8D	86 (45-17) x 126 (3-15)	—	30,7 85	20,7 136	35,1 95	19,2 160	35,0 147	36,7 154	44,4 102
LMC 052	D3D x L2T	101 (11-18) x 86 (45-17)	69				16,7 139	35,0 147	29,2 123	51,9 119
LMC 055	L16T x D3D	131 (0-2) x 101 (11-18)	115				14,2 118	28,3 119		119 (0-1)
LMC 056	L2T x D10D	86 (45-17) x 106 (27-35)	95				23,3 194	29,2 122		30,0 69
LMC 057	L2T x L269D	86 (45-17) x 92 (25-14)	71				6,7 56	5,8 24	11,7 49	37 (2-0)
LMC 061	D115D x L2T	87 (12-9) x 86 (45-17)	58						48,8 112	112
LMC 063	L2T x L269D	86 (45-17) x 92 (25-14)	71	15,0 42		24,5 66	9,2 77	21,7 91	21,7 91	38,1 87
LMC 065	L2T x L269D	86 (45-17) x 92 (25-14)	71		5,7 37,5		10,8 90	35,0 147	25,8 108	
LMC 072	D759D x L311P	135 (0-4) x 120 (11-23)	133				13,3 111	25,0 105		105 (0-1)
LMC 073	D7590 x L311P	135 (0-4) x 120 (11-23)			16,4 107,9	46,7 126	11,7 98	35,8 150		126 (0-3)
LMC 074	L452T x UR425/4	137 (3-1) x ?	—	38,0 106	32,9 216		25,8 215	54,2 227	45,0 189	85,0 195
LMC 077	D661D x L498P	70 (6-0) x 99 (148-149)	48					9,2 39	9,4 22	31 (2-0)

Comportement du palmier à huile et fusariose vasculaire

Tableau V. Comportement des clones (suite).

Clone	Croisement	Indices parentaux	Ic	Pré-pépinrière						Série 136
				Série 124	Série 123	Série 122	Série 130	Série 130	Série 134	
LMC 078	D10D x L498P	106 (27-35) x 99 (146-139)	77							
LMC 079	D759D x L311P	135 (0- 4) x 120 (11-23)	133							
LMC 080	L2T x D5D	86 (45-17) x 106 (7-11)	85	25,6	69	3,3	28	5,0	21	53 (3-0)
LMC 087	L10T x D28D	103 (9- 6) x 105 (8- 7)	—							
LMC 088	L10T x D28D	103 (9- 6) x 105 (8- 7)	—							
LMC 090	L10T x D8D	103 (9- 6) x 126 (3-15)	184							
LMC 099	L411D x L319P	153 (0- 6) x 186 (0- 4)	211							
LMC 103	L10T x D118D	153 (0- 6) x 103 (14-15)	58							
LMC 107	L411D x L309P	153 (0- 6) x 110 (3- 7)	104							
LMC 111	L10T x D28D	103 (9- 6) x 105 (8- 7)	—							
LMC 112	L421D x L452S	155 (1- 3) x ?	—							
LMC 129	L644D x L503P	113 (6-12) x 156 (0- 3)	127							
LMC 130	L411D x L309P	153 (0- 6) x 110 (3- 7)	104							
LMC 152	L2T x L269D	86 (45-17) x 92 (25-14)	71							
LMC 216	L2T x D5D	86 (45-17) x 106 (7-11)	85							

— % série	36,0 % (5,5 m)	15,2 % (4 m)	37,0 % (5 m)	12,0 % (5 m)	23,8 % (17 m)	23,8 % (5 m)	43,6 % (5 m)	(5 m) =
— Date d'inoculation	26/7/85	4/2/86	2/7/87	15/4/87	15/4/87	22/10/87	5/7/88	5 mois
— Souche de FOE	M 188/477	M 188/477	Mélange	Mélange	Mélange	M 179	M 179	
— Densité de l'inoculus	4,7 x 10 ⁶	3,0 x 10 ⁶	3,0 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁶	4,2 x 10 ⁶	1,6 x 10 ⁶	

100. Sur 23 clones testés au moins 2 fois, 7 clones (30 %) ont des indices fluctuant de part et d'autre de 100 (Tableau VI);

— des clones issus de palmiers différents d'un même croisement peuvent avoir des comportements différents (Tableau VII) :

— bien que l'obtention de clones tolérants à partir d'arbres de lignées tolérantes soit attendue, on ne peut dégager de règle générale sur le comportement du matériel végétal en fonction du croisement dont il est issu. Des lignées sensibles sont à l'origine du clone tolérant LMC 079 et, dans une moindre mesure, LMC 009, alors que des clones sensibles peuvent provenir d'arbres de croisements tolérants (LMC 020, LMC 042, LMC 043). Le clone met en relief le comportement d'un arbre. Cette spécificité est un facteur de diversification des sources de résistance mais elle

Tableau VI. Liste des clones manifestant un comportement variable d'une série à l'autre.

Clone	Indice moyen	I < 100	I > 100
LMC 009	87	2	2
LMC 037	94	2	1
LMC 051	119	2	4
LMC 056	96	1	1
LMC 065	97	1	2
LMC 087	105	1	2
LMC 088	143	1	3

Tableau VII. Variabilité du comportement du clone en fonction du croisement d'origine.

Clone	Croisement	I	Répartition par rapport à 100
LMC 009	L10T × D08D (184)*	87	2-2
LMC 090		161	0-3
LMC 020	L10T × D17D (75)	137	0-4
LMC 042		122	0-3
LMC 043		118	0-4
LMC 044		78	3-0
LMC 026	D3D × L2T (69)	79	3-0
LMC 052		130	0-3
LMC 072	D759D × L311P (133)	105	0-1
LMC 073		126	0-3
LMC 079		53	3-0
LMC 057	L2T × L269D (71)	37	2-0
LMC 063		75	5-0
LMC 065		97	1-2
LMC 152		89	1-0

* Entre parenthèses : indice du croisement

implique que tous les clones, quelle que soit leur origine et même s'ils sont issus d'arbre du même croisement, doivent être testés pour évaluer leur performance vis-à-vis de la fusariose.

Résultats au champ. Comportement des croisements vis-à-vis de la fusariose

La fusariose fait l'objet d'un suivi permanent sur la plantation expérimentale R. Michaux à Dabou en Côte-d'Ivoire, zone particulièrement infestée par la maladie.

Le comportement au champ des différents croisements plantés est obtenu par un dispositif de relevés successifs dont la fréquence dépend de l'âge des plantations. Ce suivi permet d'établir un historique précis de l'évolution de la fusariose sur les différentes parcelles et de dégager régulièrement deux informations essentielles :

- le pourcentage de fusariose exprimée (FE) à un moment donné : il comprend tous les palmiers qui expriment des symptômes de fusariose, y compris ceux qui sont morts de la maladie;

- le pourcentage de fusariose cumulée (FC) : il comprend tous les palmiers qui ont exprimé à un moment ou à un autre les symptômes de la maladie, quelle qu'ait été par la suite l'évolution de ceux-ci.

Le taux de rémission est obtenu par le calcul suivant :

$$\frac{FC-FE}{FC} \times 100$$

Ce taux exprime la capacité du matériel végétal à surmonter l'agression parasitaire.

L'incidence de la fusariose sur la plantation R. Michaux à la fin de l'année 1988 est indiquée par les figures 2 à 4, chacune des années de culture de 1964 à 1982 y étant représentée.

La figure 2 reprend le pourcentage de fusariose cumulée apparu sur chaque année de culture : les cultures 1964 à 1967, représentant près de 500 hectares, ont subi en moyenne plus de 25 % de fusariose. Jusqu'aux plantations 1976, le taux de fusariose cumulée est en moyenne largement supérieur à 15 % puis tend à décroître ensuite.

Au niveau de l'expression des symptômes, on constate une diminution régulière de la fusariose en fonction de la date de plantation (fig. 3). Les cultures 1964 à 1967 se maintiennent à 20 % en moyenne de palmiers extériorisant la maladie, certains de leurs croisements dépassent 70 % de fusariose. A partir de 1968-1970, suite aux premières recherches de sources de tolérance, la manifestation des symptômes devient moins importante malgré un pourcentage de fusariose cumulée encore élevé. La période 1968-1975 correspond à la mise en place et au développement des tests d'inoculation.

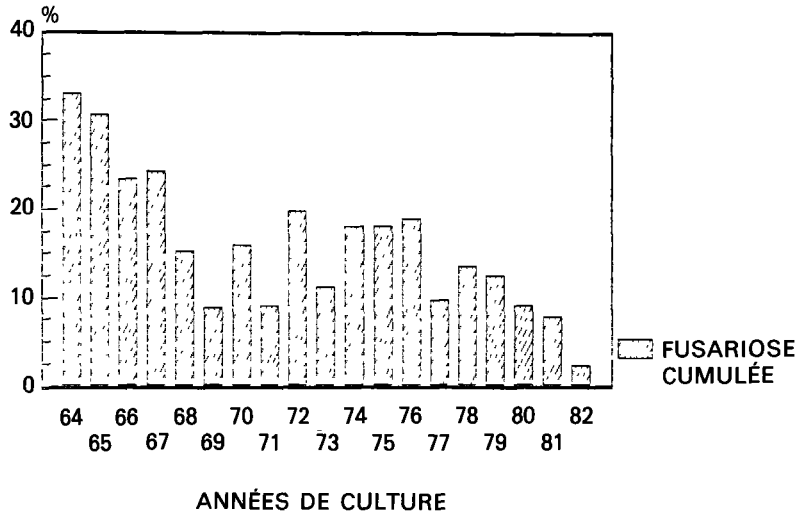


Figure 2. Plantation Robert Michaux : fusariose cumulée en fonction des années de culture (situation fin 1988).

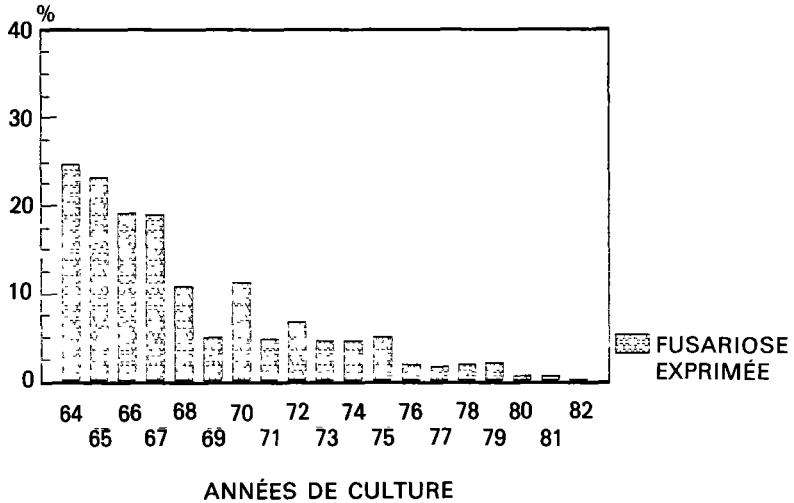


Figure 3. Plantation Robert Michaux : fusariose exprimée en fonction des années de culture (situation fin 1988).

A partir des plantations 1976, on assiste à une diminution régulière des taux de fusariose cumulée et de fusariose exprimée, à la suite de la caractérisation des différentes catégories d'hybrides pour leur tolérance à la maladie.

Les données des figures 2 et 3 permettent d'établir un taux de rémission en fonction de la date de plantation. Inférieur à 25 % dans la seconde moitié des années 60, ce taux de rémission augmente régulièrement jusqu'à 70 % pour atteindre et dépasser 80 % dans la seconde moitié des années 70. Il devient supérieur à 90 %, voire 95 %, après 1980 (fig. 4).

Ainsi, au début du processus de sélection pour la tolérance à la fusariose, la disparition des symptômes ne concernait qu'un arbre sur quatre atteints. Dans les conditions de Dabou, la forme chronique de la maladie est prédominante et les symptômes manifestés se maintiennent pendant de longues années avant que l'arbre ne finisse par disparaître. Désormais, les symptômes ne se maintiennent que sur 1 arbre sur 10 fusariés, les 9 autres reprenant progressivement un développement normal.

L'évolution de la fusariose cumulée sur ces plantations effectuées depuis 1982 est pour le moment satisfaisante comme le montre la figure 5 : à l'exception des cultures 1985 qui n'occupent que 38 hectares et qui sont plantées de croisements non testés et non repérés, l'évolution de la maladie y est désormais stabilisée à un pourcentage inférieur à 2,5 %.

Cette situation résulte du fait que le matériel végétal planté à Dabou appartenant à des catégories a subi le test d'inoculation, et que seuls les croisements d'indice inférieur à 70 ont été plantés; l'individualisation des croisements en plantation a permis d'assurer avec succès, jusqu'à présent, un programme des replantations dans une zone à haut risque de fusariose.

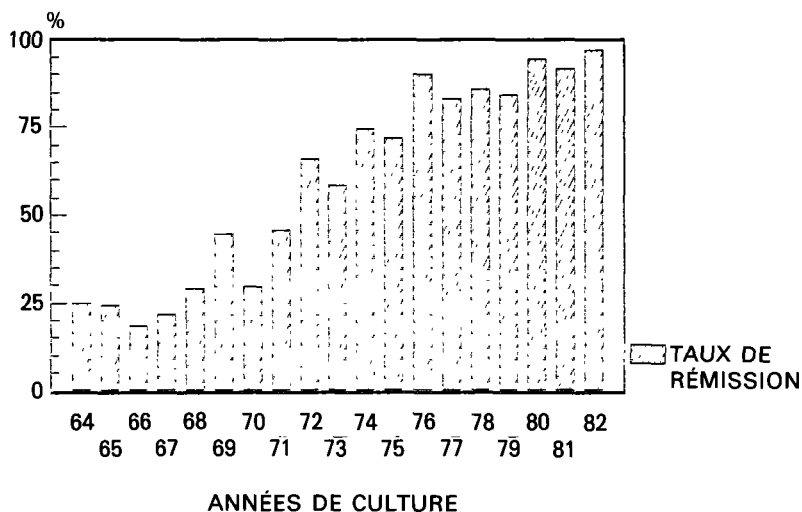


Figure 4. Plantation Robert Michaux : évolution du taux de rémission en fonction des années de culture (situation fin 1988).

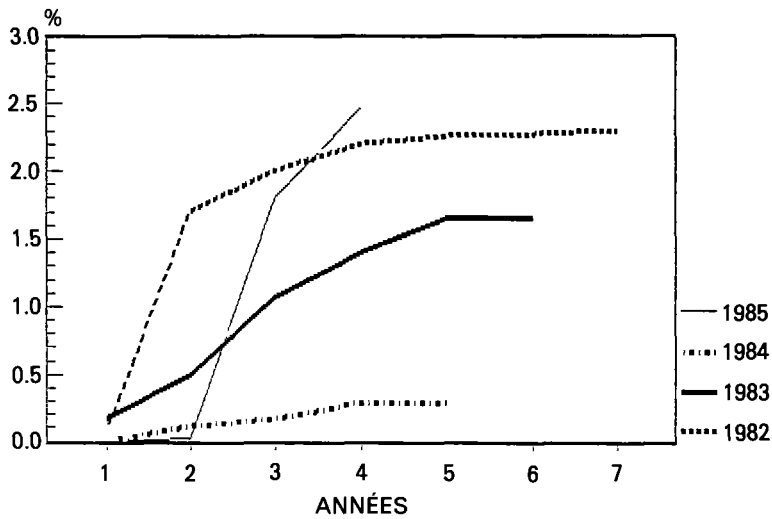


Figure 5. Plantation Robert Michaux : évolution cumulée de la fusariose sur les cultures 1982 à 1985.

Conclusion

La politique mise en œuvre dès la fin des années 60 consistant à planter du matériel végétal sélectionné à partir de résultats de tests d'inoculation précoce a permis de réduire significativement l'expression de la fusariose dans une plantation très atteinte. Comme l'indique l'existence d'une infection latente, cette sélection a limité la pénétration du parasite sans toutefois la bloquer. Il s'agit bien d'une tolérance puisque, dans l'état actuel de nos connaissances, les catégories de matériel végétal les plus performantes ne sont que peu atteintes dans leur production.

Il est encore trop tôt pour se prononcer sur le comportement à long terme des clones au champ; cependant, l'analogie de comportement des clones et des croisements inoculés en préépinière laisse entrevoir des résultats tout à fait satisfaisants dans la mesure où les mêmes critères de sélection présideront au choix des clones à planter.

Références

1. Meunier J, Gascon JP. (1972). Le schéma général d'amélioration du palmier à huile à l'IRHO. *Oléagineux* ; 27 (1) : 1-12.
2. Renard JL, Meunier J. (1983). Research for durable resistance to vascular wilt disease (*Fusarium oxysporum f.sp. elaeidis*) of oil palm (*Elaeis guineensis*) from durable resistance in crops. Lamberti F., Waller JM. and Van der Graaff NA., Eds. Plenum Publishing Corporation; 1983 : 287-290.
3. Renard JL, Gascon JP, Bachy A. (1972). Recherches sur la fusariose du palmier à huile. *Oléagineux* ; 27 (12) : 581-591.
4. Renard JL, Noiret JM, Meunier J. (1980). Sources et gammes de résistance à la fusariose chez les palmiers à huile *Elaeis guineensis* et *Elaeis melanococca*. *Oléagineux* ; 35 (8-9) : 387-393.

11

Analyse des capacités androgénétiques de génotypes marocains de *Triticum durum*

H. CHLYAH, N. SAIDI

Laboratoire de physiologie végétale, département de biologie, université Mohammed V, BP 1014, Rabat, Maroc

Résumé

Pour classer les génotypes marocains en fonction de leur capacité androgénétique, 19 variétés locales et un hybride (F_1) ont été cultivés au champ. C'est la variété 1 726 qui a fourni des anthères répondant le mieux à l'androgénèse : pourcentage d'embryons 22,41. La variété Haj Mouline est la moins bonne avec 0,58 % d'embryons. L'influence de facteurs physiologiques (date de prélèvement, prétraitement au froid, choc osmotique, milieux de culture) sur ces génotypes a été étudiée. Les épis prélevés du champ en automne et à la fin de l'hiver donnent un meilleur pourcentage en embryons par rapport à ceux prélevés entre le 15 décembre et le 15 février. Les chocs thermiques (8 jours à 5 °C) et osmotique (1 h de traitement au mannitol) améliorent la capacité androgénétique. Un traitement des plantes donneuses par un agent chimique fait doubler le rendement en embryons pour presque tous les génotypes. La régénération de plantes haploïdes a été obtenue, toutes ces plantes sont albinos sauf une, provenant de la variété Marzak.

Introduction

La majorité des travaux consacrés jusqu'à présent à l'androgénèse chez le blé concerne le *Triticum aestivum* ; parmi les premiers travaux à ce sujet, on peut citer

ceux effectués par des Chinois, [6, 22], des Français, [9, 24, 25, 26] et des Américains [29].

De nombreux obstacles, notamment la formation de plantes albinos [11] retardent l'application de cette technologie à l'amélioration de *Triticum durum*, plante typiquement méditerranéenne et particulièrement consommée dans les régions comme l'Afrique du Nord et le Moyen-Orient.

Dans ce travail, nous essaierons d'étudier les capacités androgénétiques des variétés marocaines de blé dur et nous analyserons l'influence de facteurs physiologiques sur le comportement des génotypes. De plus, par application d'un prétraitement chimique aux plantes donneuses, nous essaierons de voir si l'effet génotype peut être éliminé, tout au moins partiellement.

Matériel et techniques

Une partie du germplasma marocain de blé dur : *Triticum durum* nous a été fournie par la station Guiche (Rabat) de l'Institut national de recherche agronomique (INRA). Le Tableau I présente les 19 cultivaes et hybridation un F₁ (Haj Mouline × 1728) utilisé dans cette étude.

Tableau I. Classification des génotypes marocains de blé dur en fonction de leur capacité androgénétique.

Génotype	Nombre d'épis	% d'épis embryogènes	N° d'anthères	% anthères embryogènes	N° d'embryons	% embryons
1726	121	70,25	4769	7,07	1069	22,41
F ₁	18	83,33	882	6,69	188	21,31
Omorabia 17	70	72,85	2892	6,57	397	13,72
Marzak	177	61,02	6827	4,88	924	13,53
E ₁₅	69	68,11	3278	4,45	441	12,54
Kourifla	55	61,82	2078	4,38	245	11,79
E ₄₄	99	72,73	5309	4,22	604	11,38
2909	30	66,66	1561	3,97	152	9,73
1717	92	65,62	4252	3,62	380	8,93
Cocorit	94	58,51	4102	3,61	321	7,82
Ben Bachir	80	56,25	3725	3,38	257	6,90
1728	113	54,87	5041	2,93	305	6,05
Yap 79	61	—	3453	—	154	4,46
Jori	72	45,83	2936	2,62	127	4,33
1715	22	—	1251	—	34	2,71
Sabil	85	—	4648	—	92	1,97
Karim	86	—	4530	—	68	1,50
2777	21	57,14	1191	1,26	17	1,43
1727	41	—	1978	—	13	0,66
Haj Mouline	47	—	2585	—	15	0,58

Les graines sont mises à germer en boîte de pétri sur papier filtre humidifié. Les boîtes de pétri sont placées à 25 °C à l'obscurité pendant les deux premiers jours puis à la lumière en salle de culture pendant cinq jours. Les plantules sont ensuite mises à vernaliser en chambre froide (5 °C environ) pendant trois semaines, sous un éclairage quotidien de 8 h. Après vernalisation, les plantules sont repiquées au champ. Les semis commencent le 15 septembre et sont renouvelés toutes les deux semaines de façon à disposer du matériel végétal jusqu'à la fin avril.

Les plantes de chaque génotype sont divisées en deux lots, un lot servant de témoin, l'autre est traité par une solution de gamétocide à raison de 1 kg/ha ou 0,5 kg/ha. Ce traitement est effectué par pulvérisation entre les stades 8 et 9 selon l'échelle de Feekes.

Les épis sont prélevés au stade déjà adopté pour le blé tendre, $R = E + T/G$ [25]; le bon stade correspond à R compris entre 0,6 et 0,8; la majorité des grains de pollen se trouvent alors au stade uninucléé.

Les épis prélevés sont soumis à un choc thermique (5 °C) pendant 0, 2, 4, 6, 8 ou 15 jours. Les anthères des épis ayant reçu un choc thermique de 2 et 8 jours ainsi que celles des épis témoins, subissent un choc osmotique par flottaison pendant 1 ou 2 h sur une solution de mannitol à 0,8 M. Ces anthères sont rincées à l'eau distillée stérile avant leur mise en culture.

Après ce traitement, les épis dégagés de leur gaine sont stérilisés par l'hypochlorite de sodium à 4 % pendant 3 mn puis rincés à l'eau distillée stérile. Après enlèvement des glumes et glumelles, les anthères de chaque épi sont placées dans une boîte de pétri (10 cm de diamètre) à la surface du milieu de culture.

Quatre milieux de culture sont utilisés : le milieu BPTG de Gis-Moulon (France) [23], le milieu C_{17} [34], le milieu N_6 [7], et le milieu P_2 [8].

Les structures embryonnaires apparues sont prélevées et placées en boîte de pétri à 16 h d'éclairage quotidien et à 27 °C; tous ces milieux de base (R_9 , C_{17} et N_6) ont été légèrement modifiés.

Résultats et discussion

Quel que soit le génotype, le milieu de culture et les traitements utilisés, les anthères qui ont manifesté une capacité embryogénétique forment, après environ quatre semaines de culture, des structures embryonnaires somatiques similaires à celle qui ont déjà été décrites chez *Triticum aestivum* [23].

Un ou plusieurs embryons peuvent être observés sur la même anthère (fig. 1), parfois des formations callogènes avoisinent les structures embryonnaires (fig. 2). Sur les anthères n'exprimant pas de capacités embryogènes, on observe l'apparition d'un ou plusieurs cals blancs et compacts; ces cals ne forment pas de structures morphogénétiques visibles. Souvent, en l'absence de toute capacité androgénétique, l'anthère ne montre aucune structure, quelle que soit la durée de culture.

Influence de génotype

Sur le Tableau II sont classés tous les génotypes marocains étudiés en fonction de leur capacité androgénétique. Certains génotypes manifestent de grandes capacités

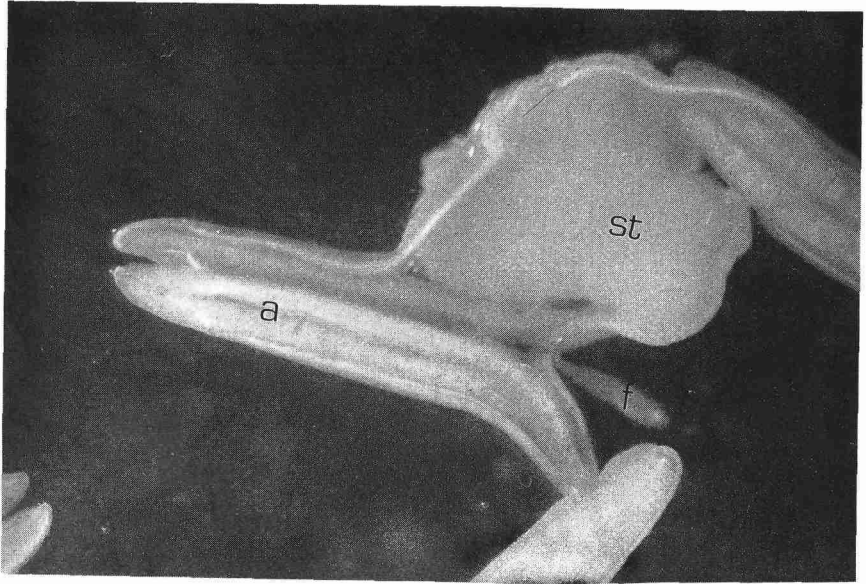


Figure 1. Structure embryonnaire (st) globulaire formée sur une anthere (a) après trois semaines de culture. f : filet. G : 150.

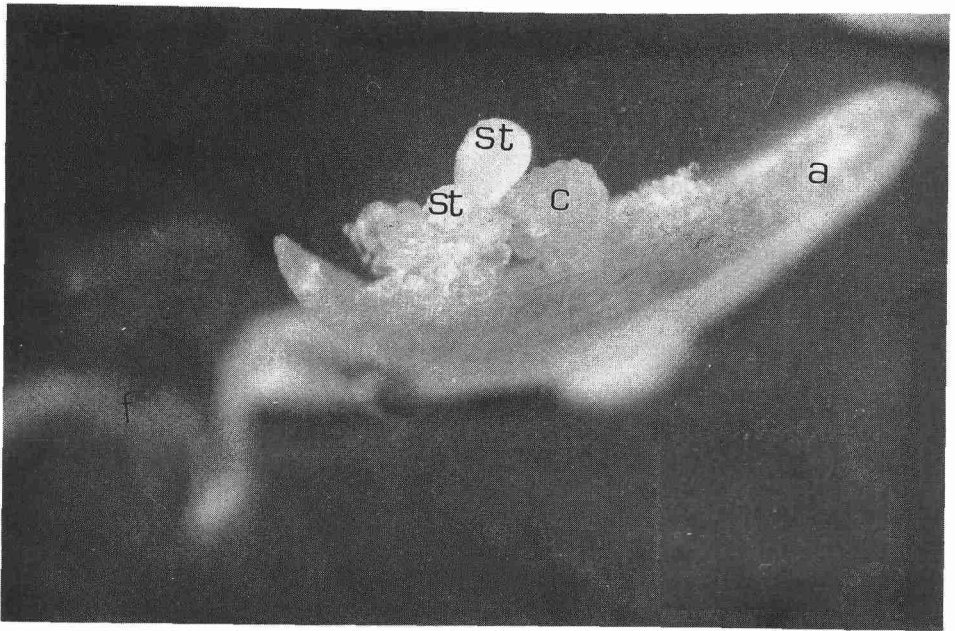


Figure 2. Plusieurs structures embryonnaires (st) et formation callogène (c) formées sur une anthere (a). f : filet. G : 150.

Tableau II. Résultat d'androgénèse selon la date de prélèvement (tous génotypes confondus).

Date de prélèvement	% embryons	Date de prélèvement	% embryons	Date de prélèvement	% embryons
26/11/88	23,68	2/1/89	6,65	23/2/89	12,96
28/11	17,95	6/1	13,33	24/2	5,35
20/11	28,62	9/1	13,52	28/2	24,32
1/12	17,50	15/1	10,29	4/3	4,39
3/12	26,99	16/1	12,16	5/3	3,91
5/12	15,09	18/1	9,52	7/3	8,03
7/12	16,94	20/1	12,07	14/3	9,56
8/12	9,26	22/1	9,91	20/3	3,99
9/12	18,40	23/1	7,69	25/3	4,10
10/12	16,21	29/1	13,74	28/3	6,62
12/12	17,54	1/2	16,95	2/4	5,55
14/12	18,57	3/2	7,20	6/4	5,83
15/12	8,57	5/2	10,02	9/4	5,52
16/12	9,46	6/2	7,94	10/4	2,20
17/12	20,54	8/2	13,49	13/4	6,68
18/12	11,25	13/2	18,66	18/4	6,34
19/12	7,47	15/2	21,65	20/4	5,80
22/12	19,90	16/2	22,23	23/4	6,32
28/12	15,77	17/2	16,78	27/4	6,63
30/12	7,12	18/2	16,82	29/4	2,50

comparativement à d'autres. L'analyse de la variance effectuée sur le pourcentage d'embryons obtenus pour chaque variété montre que l'effet génotype est très significatif, la variété 1726 étant la plus performante, et à un degré moindre l'hybride F_1 . Le pourcentage d'embryons de cet hybride est significativement supérieur à celui des parents présents sur ce tableau (Hajmouline $\times$ 1728) : pour un de ses parents, Hajmouline donne même le plus faible pourcentage d'embryons.

Il semble qu'un taux élevé d'embryons soit lié à un nombre élevé d'anthères embryogènes ou à un grand nombre d'embryons obtenus par anthère. Le taux d'embryons ne serait pas forcément lié à un nombre élevé d'épis embryogènes; avec peu d'épis très embryogènes, le rendement en embryons est élevé.

Les nombreux travaux effectués sur le blé tendre montrent que l'expression androgénétique est sous contrôle allélique. Les articles de Heberle-Bors [13], de Picard *et al.* [28] et de Lazar *et al.* [17] indiquent que le contrôle génétique semble être nucléaire et cytoplasmique. L'incorporation de matériel génétique externe, par substitution ou translocation, améliore la performance androgénétique [15].

Picard *et al.* [28] relèvent le paradoxe que la réponse androgénétique soit en même temps influencée par l'environnement et par les facteurs génétiques et supposent que ces derniers sont instables. La réponse des cultures de tissus somatiques du blé serait également affectée par le facteur génotype [16, 32].

Par ailleurs, il a été rapporté que certains grains de pollen peuvent être

prédéterminés (P-grains), doués de capacité androgénétique importante; la réponse androgénétique augmente avec leur fréquence (Herberle-Bors et Odenbach, 1985).

A l'effet génotypique, clairement montré par les génotypes que nous avons étudiés, s'additionne un effet « plante intravariétale ». Le pourcentage d'embryogenèse varie de façon significative d'une plante à l'autre, tous les génotypes possèdent au moins une plante non embryogène. Le rendement élevé en embryogenèse pour un génotype provient souvent de l'aptitude élevée de quelques plantes très embryogènes.

Influence de l'environnement

Les facteurs d'environnement dont nous avons analysé l'effet sur la réponse androgénétique des génotypes étudiés sont : la date de prélèvement du matériel végétal, un choc thermique, un choc osmotique et la variation du milieu de culture.

Influence de la date de prélèvement

Les génotypes étudiés ont été élevés en plein champ. En fonction de la date du semis qui est échelonnée, la période de prélèvement des épis se situe entre la fin novembre et la fin avril. Les résultats groupés au Tableau II montre que la réponse androgénétique est favorisée, pour tous les génotypes confondus, quand les épis sont prélevés entre, d'une part, la fin novembre et la mi-décembre et, d'autre part, entre le 15 et le 28 février. L'expression androgénétique est faible quand les prélèvements ont lieu en période froide (15 décembre-15 février) ou après le début mars. Les calculs statistiques montrent que la variation due à l'effet de la date de prélèvement est significative. De plus, il existe une interaction génotype-date de prélèvement : le rendement androgénétique de chaque génotype dépend de la date de prélèvement des épis.

Influence du prétraitement au froid

Avant le prélèvement des anthères, les épis reçoivent un traitement au froid (5 °C environ) pendant cinq durées différentes : 0, 2, 4-6, 8 et 15 jours. Seulement 12 génotypes ont été soumis à ce traitement. Le Tableau III montre que, quel que soit

Tableau III. Action du prétraitement thermique et du milieu de culture sur le taux d'embryogenèse (tous génotypes confondus).

Durée du prétraitement (jours)	C ₁₇		BPTG		P ₂		N ₆	
	N° d'anth	% Emb	N° d'anth	% Emb	N° d'anth	% Emb	N° d'anth	% d'Emb
0	5083	13,24	3051	8,95	2903	4,68	1502	5,2
2	6103	12,55	2871	8,67	3831	8,72	611	5,4
4-6	743	9,96	1476	9,08	624	6,41	298	3,4
8	3631	24,18	3380	15,5	2347	13,51	835	5,4
15	2148	9,54	3198	9,59	1925	5,61	206	3,9

le milieu de culture (C₁₇, BPTG, P₂ et N₆), et le prétraitement au froid stimule de façon significative l'androgenèse chez tous les génotypes. Ce prétraitement au froid, n'étant pas toujours nécessaire pour *Triticum aestivum* (Marsolais *et al.*, 1984), semble être indispensable pour améliorer la réponse androgénétique chez *Triticum durum*. Notons aussi que l'application de températures basses pendant une durée de 8 jours exerce un effet optimal sur le rendement androgénétique par rapport à 0 et 2 jours. Quinze jours de froid provoque une baisse de la réponse favorable.

Prétraitement osmotique

L'idée d'une application d'un choc osmotique aux anthères avant leur culture est plus récente. Nous avons fait flotter les anthères pendant 1 h ou 2 h sur une solution de mannitol à 0,8 M.

Tous les génotypes réagissent favorablement et de façon significative au traitement pendant un heure (Tableau IV). L'application du choc osmotique pendant deux heures constitue un facteur défavorable pour la formation de structures embryogènes. En combinant l'action du choc thermique et du choc osmotique, l'effet du froid est optimal pour une durée d'application de deux jours au lieu de huit jours quand le froid est appliqué seul. Tout se passe comme si une sorte de synergie existe entre ces deux types de chocs physiques. Certains auteurs, étudiant l'androgenèse de l'orge, ont incorporé au milieu de culture d'autres agents osmotiques comme le maltose [17] ou le PEG [33, 36] ont obtenu de bons résultats en appliquant au blé la technique du choc osmotique.

Tableau IV. Influence du traitement au mannitol (0,8 M).

Génotype	Traitement	Nombre d'épis	Nombre d'anthères	% d'anthères embryogènes	% embryons
1726	Témoins	121	4 769	7,07	22,41
	Traitées 1 h	24	932	7,51	26,18
	Traitées 2 h	17	687	7,11	21,11
2909	Témoins	30	1 561	3,97	9,72
	Traitées 1 h	10	431	4,17	17,17
	Traitées 2 h	11	440	3,64	10,45
Cocorit	Témoins	94	4 102	3,61	7,82
	Traitées 1 h	14	542	2,97	9,96
	Traitées 2 h	9	320	4,06	5
1728	Témoins	113	5 041	2,93	6,05
	Traitées 1 h	21	805	3,23	8,7
	Traitées 2 h	25	953	2,62	5,87
Jori	Témoins	72	2 936	2,62	4,32
	Traitées 1 h	29	1 043	4,03	9,78
	Traitées 2 h	14	496	3,02	6,45

Milieux de culture

Les quatre milieux de culture donnent des résultats différents avec les génotypes étudiés. Le pourcentage d'embryons le plus élevé est obtenu avec le milieu C₇ ; N₆ est le milieu le moins favorable à l'androgénèse, BPTG et P₂ exercent un effet intermédiaire.

On retrouve ces mêmes résultats pour tous les génotypes confondus sur le Tableau III. L'analyse de la variance montre une différence significative entre les quatre milieux utilisés. Mihamou [21] et El Haddoury [10] ont montré l'action performante du milieu RPTG sur l'androgénèse de *Triticum durum* ; un milieu voisin : *Potato II* favorise la réponse androgénétique chez les triticales [35]. Signalons également l'emploi du milieu P₁, contenant le Ficoll 400; P₁ s'est révélé favorable pour la culture d'anthères de *T. aestivum* [2]. Plus récemment encore, Chu et Hill [5] ont trouvé de bons résultats avec *T. aestivum*, en modifiant la composition auxinique et azotée du milieu N₆ et en le stérilisant par filtration.

Action d'un traitement chimique des plantes donneuses

Ce prétraitement des plantes donneuses avec le gamétocide a un effet bénéfique sur l'androgénèse : la réponse exprimée par chaque génotype a été environ multipliée par deux par rapport au témoin (Tableau V).

Tableau V. Action combinée du prétraitement au mannitol et du prétraitement au froid sur le rendement en embryons.

Génotype	Nombre de jours au froid Mannitol	0		2		8	
		Nombre d'anthères	% embryons	Nombre d'anthères	% embryons	Nombre d'anthères	% embryons
1726	0	719	23,22	924	28,89	436	22,24
	1 h	325	26,77	302	32,12	305	19,67
	2 h	271	20,29	294	25,17	122	13,11
2909	0	194	12,37	208	3,84	177	15,25
	1 h	131	13,74	99	30,3	201	12,93
	2 h	112	16,96	97	8,25	231	8,22
Cocorit	0	351	7,12	310	9,03	518	11,38
	1 h	183	9,84	132	10,6	227	9,69
	2 h	153	5,23	102	5,88	65	3,07
1728	0	604	5,29	585	6,32	191	18,84
	1 h	149	7,4	533	9,0	123	8,94
	2 h	143	3,49	561	6,77	249	5,22
Jori	0	189	3,17	141	2,84	193	16,58
	1 h	485	7,01	334	14,37	224	8,93
	2 h	337	5,93	62	4,84	97	9,28

Tableau VI. Influence du prétraitement des plantes au gamétocide sur le rendement en embryons.

Génotype		Nombre d'épis	Nombre d'anthères	Nombre embryogènes	% anthères embryogènes	Nombre d'embryons	Nombre d'embryons par 100 anthères
1726	N	121	4 769	7,07	1 069	22,41	
	T	40	1 962	8,77	550	28,03	
Marzak	N	177	6 827	4,88	924	13,53	
	T	37	1 732	5,50	470	27,13	
E ₁₅	N	69	3 278	4,45	411	12,53	
	T	33	1 774	7,27	354	19,95	
Kourifla	N	55	2 078	4,38	245	11,79	
	T	38	1 709	7,60	442	25,86	
E ₄₄	N	99	5 309	4,22	604	11,37	
	T	38	2 022	6,36	438	21,66	
Cocorit	N	94	4 102	3,60	321	7,82	
	T	38	1 274	5,26	185	14,52	
Ben Bachir	N	80	3 725	3,40	257	6,90	
	T	28	1 655	4,20	204	12,32	

N : Non traitées

T : Traitées

Combiné avec le choc thermique subi par les épis après leur prélèvement, ce traitement au gamétocide est efficace quand la durée du choc thermique est de huit jours. Quand nous avons combiné l'effet du choc thermique, du traitement au gamétocide et du milieu de culture, c'est en présence du milieu C₁₇ que le gamétocide semble exercer l'effet optimal. Schmid et Keller [30], Picard *et al.* [27] ont constaté une amélioration de la réponse androgénétique chez le blé tendre après un traitement des plantes donneuses. Le gamétocide est une substance chimique empêchant la différenciation des microspores, ce qui favorise la voie androgénétique une fois les anthers mises en culture. Si la performance de nos génotypes de blé dur a été multipliée par deux, celle du blé tendre a été multipliée par 3 avec le S-2-aminoéthyl-L-cystéine ou l'acide L-azetidine [30] ou par 5 à 20 fois avec le type de gamétocide utilisé par Picard *et al.* [27] à la dose de 1 kg/ha. Dans notre cas, 1 kg/ha constitue une dose défavorable.

Régénération des plantes haploïdes

Entre les stades 8 et 9 selon l'échelle de Feckes, un lot de plantes de chaque génotype est traité par pulvérisation d'une solution de gamétocide à raison de 0,5 kg/ha.

Pour la régénération, les milieux utilisés sont ceux ayant servi pour la culture d'anthere avec quelques modifications portant sur les auxines et les glucides. Le

Tableau VII. Résultats de régénération sur les différents milieux utilisés

Milieu de base	Milieux N°	N° d'embryons	% de régénération	N° de Plantes vertes
R ₉	1	88	37,5	0
	2	184	8,69	0
	3	252	12,69	0
	4	140	2,86	0
	5	266	18,04	0
	6	160	6,25	0
	7	227	9,69	0
	8	196	14,79	0
	9	75	5,33	0
	10	45	11,11	0
	11	90	7,78	0
C ₁₇	12	142	28,87	1
	13	35	20,00	0
	14	63	14,28	0
N ₆	15	438	12,10	0
	16	240	6,25	0
	17	139	8,63	0

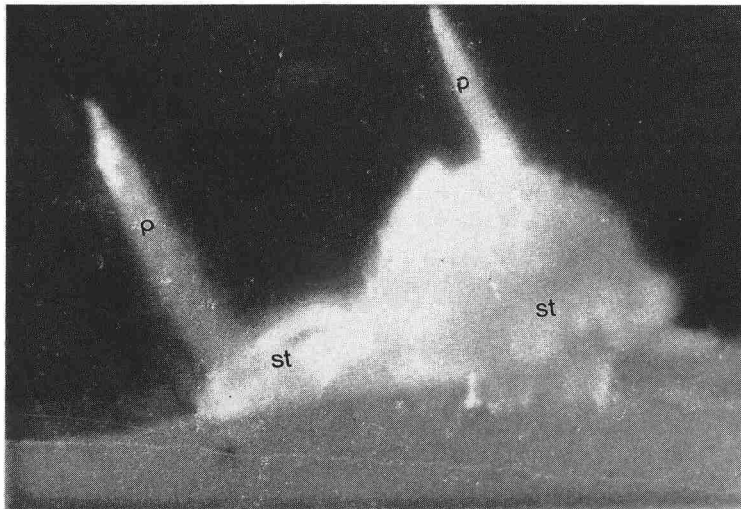


Figure 3. Régénération de plantules (p) haploïdes à partir de structures embryonnaires (st).
G : 60.

milieu R₉ a été également testé [23]. Le pourcentage de régénération le plus élevé a été observé sur les milieux C₁₇ et R₉ (Tableau VIII) (fig. 3). L'acide gibbérellique semble favoriser la régénération. La majorité des plantes régénérées sont albinos. Un albinisme presque total a également été observé par Hawiger et Heberle-Bors chez le blé dur [13].

Une plante verte haploïde a cependant été obtenue sur le milieu C₁₇ (fig. 4) à partir du génotype Marzak; cette plante a effectué normalement son tallage.

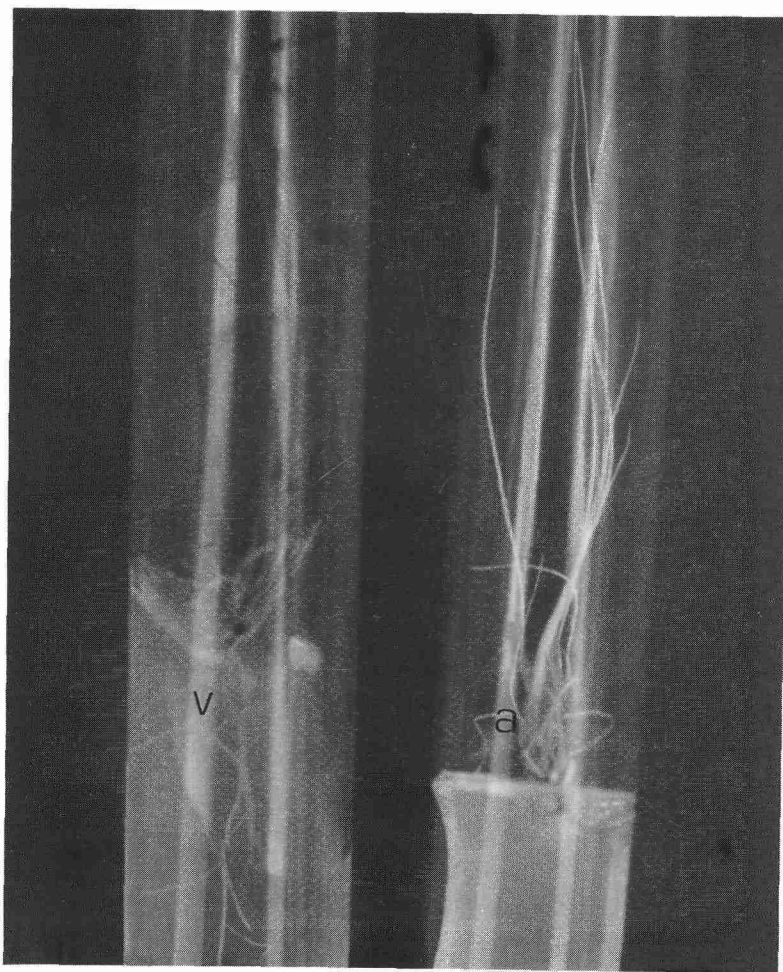


Figure 4. Plantes haploïdes chlorophyllienne (v) et albinos (a) formant des talles.

L'albinisme, qui semble être la règle en androgenèse chez *T. durum*, existe également chez *T. aestivum*, mais à un degré beaucoup plus réduit : souvent environ la moitié des plantes régénérées sont chlorophylliennes.

Références

1. Aissa K. (1977). Obtention de plantes haploïdes chez *Triticum durum* par voie androgénétique *in vitro*. Thèse de doctorat de 3^e cycle à l'Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, France.
2. Armstrong TA, Metz SG, Mascia PN. (1987). Two regeneration systems for the production of haploid plants from wheat anther culture. *Plant Science* ; 51 : 231-7.
3. Bullock WP, Baenziger PS. (1982). Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) F1's and their reciprocal crosses. *Theor Appl Genet* ; 62 : 155-9.
4. Chu CC. (1978). The N₆ medium and its applications to anther culture of cereal crops. In : *Proceedings of Symposium of Plant Tissue Culture*, Science Press, Beijing, China, pp. 40-50.
5. Chu CC. (1988). An improved anther culture method for obtaining higher frequency of pollen embryos in *Triticum aestivum* L. *Plant Science* ; 55 : 175-181.
6. Chu CC, Sun CS, Chien NF, Yin KC, Hsu C. (1973). Investigation on induction and morphogenesis of wheat (*Triticum vulgare*) pollen plants. *Acta Bot Sin* ; 15 : 1-11.
7. Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin CK, Chu CY, Bi FY. (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources. *Sci Sinica* ; 18 (5) : 659-668.
8. Chuang C, Ouyang T, Chia H, Chou S, Ching C. (1976). A set of potato media for wheat anther culture. In : *Proceedings of Symposium Plant Tissue Culture*. Peking, Pittman Publishing, pp. 51.
9. De Buyser J, Henry Y. (1979). Androgenèse sur des blés tendres en cours de sélection. 1. Obtention des plantes *in vitro*. *Z. Pflanzenzücht* ; 83 : 49-56.
10. El Haddoury J. (1987). Problèmes de la régénération au cours de l'androgenèse *in vitro* du blé dur (*Triticum durum*). D.E.A. de génétique et sélection animale et végétale. Université de Paris Sud, Centre d'Orsay, France.
11. Hadwiger MA, Heberle-Bors E. (1986). Pollen plant production in *Triticum turgidum* ssp. *durum*. In Ed Horn, Yensen, Odenbach, Schieder. *Genetic Manipulation in Plant Breeding*. pp. 303-305.
12. He DG, Ouyang JW. (1984). Callus and plantlet formation from cultivated wheat anthers at different developmental stages. *Plant Sci Lett* ; 33-71.
13. Heberle-Bors E. (1985). *In vitro* haploid formation from pollen : a critical review. *Theor Appl Genet* ; 71 : 361-374.
14. Heberle-Bors E, Odenbach W. (1985). *In vitro* pollen embryogenesis and cytoplasmic male sterility in *Triticum aestivum* L. *Z. Pflanzenzücht* ; 95 : 14-22.
15. Henry Y, De Buyser J. (1985). Effect of the 1B/1R translocation on anther culture ability in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports* ; 4 : 307-310.
16. Higgins P, Mathias RJ. (1987). The effect of the 4B chromosomes of hexaploid wheat on the growth and regeneration of callus cultures. *Theor. Appl. Genet* ; 74 : 439-444.

17. Hunter CP, Loose RW, Clerk SP, Yne RL. (1988). Maltose — the preferred carbon source for barley anther culture. Abstract, *International Congress on Genetic Manipulation in Plant Breeding*, Helsingor (Denmark), pp. 71.
18. Kudirka DT, Schaeffer GW, Baenziger PS. (1986). Wheat : genetic variability through anther culture. In : *Biotechnology in Agriculture and Forestry 2 Crops I*. Ed Bajaj YPS, Springer-Verlag, pp. 39-53.
19. Lazar MD, Baenziger PS, Schaeffer GW. (1984). Combining abilities and heritability of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther cultures. *Theor Appl Genet* ; 68 : 131-4.
20. Marsolais AA, Kasha KJ. (1983). The influence of cold pretreatments and plant genotypes on *in vitro* androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* ; 3 : 69-79.
21. Mihamou A. (1987). Androgenèse *in vitro* du blé dur (*Triticum durum*). D.E.A. de génétique et sélection animale et végétale, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, France.
22. Ouyang TW, Hu H, Chuang CC, Tseng CC. (1973). Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. *Sci Sin* ; 16 : 79-95.
23. Picard E. (1984). Contribution à l'étude de l'hérédité et de l'utilisation de l'haplodiploïdisation par androgenèse *in vitro* chez une céréale autogame : *Triticum aestivum* L. Thèse de doctorat d'état, Université Paris XI, Orsay, France, 269.
24. Picard E, De Buyser J. (1975). Nouveaux résultats concernant la culture d'anthers *in vitro* de blé tendre (*Triticum aestivum* L.). Effets d'un choc thermique et de la position de l'anthere dans l'épi. *C R. Acad Sci Sér D* ; 281 : 127-130.
25. Picard E, De Buyser J. (1977). High production of embryoids in anther culture of pollen derived homozygous spring wheats. *Ann Amélior Plant* ; 27 : 483-8.
26. Picard E, De Buyser J, Henry Y. (1978). Techniques de production d'haploïdes de blé par culture d'anthers *in vitro*. *Le Sélectionneur Français* ; 26 : 25-37.
27. Picard E, Hours C, Grégoire S, Phan TH, Meunier JP. (1987). Significant improvement of androgenetic haploid and doubled haploid induction from wheat plants treated with a chemical hybridization agent. *Theor Appl Genet* ; 74 : 287-297.
28. Picard E, Rode A, Doussinault G, Rousset M. *In vitro* production and utilization of doubled haploids in wheat (*Triticum aestivum*). In : *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Ed Bajaj, YPS, Springer-Verlag (sous presse).
29. Schaeffer GW, Baenziger PS, Worley J. (1979). Haploid plant development from anthers and *in vitro* embryo culture of wheat. *Crop Sci* ; 19 : 697-702.
30. Schmid J. (1988). Application of gametocide and different chemical agents to wheat anther donor plants and their effects on the induction of androgenesis. Abstract, *Int Cong on Genetic Manipulation in Plant Breeding*, Helsingor (Denmark), pp. 80.
31. Schmid J, Keller ER. (1986). Improved androgenetic response in wheat (*Triticum aestivum*) as a result of gametocide application of anther donor plants. Abstract, *4th Int Cong Plant Tissue and Cell Culture*, Univ. Minnesota, USA, pp. 146.
32. Sears RG, Deckard EL. (1982). Tissue culture variability in wheat : callus induction and plant regeneration. *Crop Sci* ; 22 : 546-550.
33. Thörn EC. (1988). Effect of melibiose and polyethylene glycol on anther culture response in Barley. Abstract, *Int Cong on Genetic Manipulation in Plant Breeding*, Helsingor, Denmark pp. 80.
34. Wang P, Chen YR. Preliminary study on prediction of height of pollen plant H2 generation in winter wheat grown in the field. *Acta Agron Sin* ; 9 : 283-4.

35. Wang X, Hu Han (1984). The effect of potato II medium for Triticale anther culture. *Plant Sci Lett* ; 36 : 237-9.
36. Zhang LJ, Anceau C, Lepoivre P, Seilleur P. An efficient method for the regeneration of wheat from anther culture. *Bull Rech. Agron* (sous presse).

Remerciements

Nous remercions Dr. E. Picard, GIS-Moulon, Gif-sur-Yvette, France, d'avoir été l'initiateur de ce travail et M. Jamal El Haddoury pour son assistance technique initiale.