



**HAL**  
open science

**Production de plantes androgenetiques de chou a choucroute (*Brassica oleracea* L. ssp. capitata) par culture d'antheres in vitro: comportement des lignes haploides doublees (HD) et leur interet comme parents d'hybrides F1**

Lionel Boulidard

► **To cite this version:**

Lionel Boulidard. Production de plantes androgenetiques de chou a choucroute (*Brassica oleracea* L. ssp. capitata) par culture d'antheres in vitro: comportement des lignes haploides doublees (HD) et leur interet comme parents d'hybrides F1. *Agronomie*, 1988, 8 (10), pp.851-862. hal-02727085

**HAL Id: hal-02727085**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02727085>**

Submitted on 2 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## AMÉLIORATION DES PLANTES

# Production de plantes androgénétiques de chou à choucroute (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata*) par culture d'anthers *in vitro* : comportement des lignées haploïdes doublées (HD) et leur intérêt comme parents d'hybrides F<sub>1</sub>

Claire DORÉ & Lionel BOULIDARD

avec la collaboration technique de Florence CHARLOT, Jean-Charles LESCURE & Jeanne BURGOS

I.N.R.A., Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, route de Saint-Cyr, F 78026 Versailles Cedex

## RÉSUMÉ

La culture *in vitro* des anthers de 4 clones, parents potentiels d'hybrides de chou à choucroute (3 en S<sub>4</sub>, 1 en S<sub>7</sub>) a permis d'obtenir des plantes androgénétiques de différents niveaux de ploïdie (n, 2n, 3n et mixoploïdes) chez 2 d'entre eux. Après mesure des cellules de garde des stomates, seules les plantes haploïdes ont été traitées à la colchicine pendant la vernalisation. Les plantes haploïdes doublées (HD) et les plantes diploïdes spontanées ont été observées pour la qualité de leur pollen et leur aptitude grainière. Les lignées HD ayant produit suffisamment de graines ont été semées au champ et comparées à des lignées pures « SG » (en S<sub>10</sub>) obtenues par autofécondations successives en sélection généalogique. De même, des hybrides F<sub>1</sub> issus du croisement entre une lignée HD et une lignée SG, ont été placés au champ et comparés à des hybrides F<sub>1</sub> provenant du croisement entre 2 lignées SG.

Les observations effectuées montrent l'homogénéité intralignée, la vigueur de toutes les lignées HD et la stabilité d'une génération à l'autre (HD<sub>1</sub>-HD<sub>2</sub>). Chez les lignées HD issues du clone en S<sub>4</sub> on remarque une importante variabilité interlignées tandis que les lignées HD issues du clone en S<sub>7</sub> sont équivalentes aux lignées SG.

Plusieurs méthodes visant à améliorer les différentes étapes de la production des lignées HD et simplifier leur incorporation dans un programme de sélection sont proposées.

L'haplodiploïdisation par androgenèse *in vitro* apparaît donc ici comme un outil intéressant pour le sélectionneur à condition de concevoir une stratégie raisonnée d'utilisation optimale.

**Mots clés additionnels :** Haploïdie, culture d'embryon, doublement chromosomique, androgenèse, haplodiploïdisation, comportement agronomique, stabilité, vigueur, homogénéité, variabilité.

## SUMMARY

*Production of androgenetic plants by in vitro anther culture of sauerkraut cabbage (Brassica oleracea L. ssp. capitata) and behaviour of doubled haploid lines (DH) and F<sub>1</sub> hybrids.*

Anthers of four clones (3 in S<sub>4</sub>, 1 in S<sub>7</sub>) of sauerkraut cabbage (*Brassica oleracea* ssp. *capitata*), selected as potential parents of hybrids, were cultivated *in vitro* and androgenetic plants of various ploidy levels were obtained from 2 of the 4 clones. After ploidy level estimation, haploid plants were colchicine-treated during the vernalization period. Doubled haploid plants (DH) and spontaneous diploid plants were observed for pollen quality and seed fitness. DH lines producing enough seeds were sown and compared with pure SG lines obtained by selfing in pedigree selection. Similarly, F<sub>1</sub> hybrids obtained by crossing between one DH line and one SG line were established in the field and compared with F<sub>1</sub> hybrids from a cross between two SG lines. Observations showed good intraline homogeneity, good vigour for all DH lines and good stability from generation to generation (DH<sub>1</sub>-DH<sub>2</sub>). DH lines originating from the clone in S<sub>4</sub> showed high inter-lines variability, whereas DH lines originating from the clone in S<sub>7</sub> were equivalent to SG lines. Several methods are proposed to improve different steps of DH line production and to simplify integration into a breeding programme. Haploidization by *in vitro* androgenesis can therefore be considered as an interesting tool for the breeder, provided that a reasoned strategy for its optimal use is conceived.

**Additional key words :** Haploidy, cabbage, embryo culture, chromosome number doubling, haplodiploidization, agronomical behaviour, stability, vigour, homogeneity, variability.

## I. INTRODUCTION

La culture d'anthers *in vitro* est une des méthodes les plus employées à l'heure actuelle pour produire des plantes haploïdes qui, après doublement du stock chromosomique, conduisent à des lignées homozygotes. Ces lignées peuvent être utilisées notamment en sélection comme matériel génétique.

Il existe déjà des variétés résultant d'haplodiploïdisation par culture d'anthers : variétés lignées pures chez des espèces autogames telles que le blé, le tabac, le riz ou le piment (HU & ZEN, 1985 ; DE BUYSER *et al.*, 1987) ou variétés hybrides F<sub>1</sub> chez des espèces allogames qui présentent une hétérosis intéressante. C'est le cas de l'asperge où le premier hybride F<sub>1</sub> mâle sera commercialisé à partir de 1990 (THEVENIN & DORÉ, 1976 ; CORRIOLS, communication personnelle).

Le présent article relate une expérience menée, chez le chou à choucroute (*Brassica oleracea* L. *ssp. capitata*), depuis la culture d'anthers *in vitro* jusqu'à l'étude du comportement au champ des lignées haploïdes doublées (HD) et des combinaisons hybrides F<sub>1</sub> utilisant ces lignées HD. L'objectif était l'évaluation de l'intérêt méthodologique de l'haplodiploïdisation par androgénèse *in vitro* pour l'amélioration de cette espèce bisannuelle allogame.

L'intégration de la culture d'anthers comme source de matériel homozygote suppose en effet pour chaque espèce, non seulement de mettre au point les différentes phases de production du matériel, mais aussi de vérifier sa valeur en sélection et son comportement sur le plan agronomique. Pour répondre à ces 2 conditions, d'une part des méthodes et des tests adaptés aux contraintes spécifiques de la sélection ont été recherchés, d'autre part les lignées HD ont été comparées à des lignées pures (SG) fixées par autofécondations successives en sélection généalogique.

Toutes les variétés modernes de chou sont des variétés hybrides en raison de l'hétérosis intéressante exploitable chez cette espèce. De plus, le chou à choucroute est une plante industrielle dont la récolte et la transformation sont mécanisées et une grande homogénéité pour les caractères de date de maturité, de forme de la pomme et de qualité technologique est recherchée.

Des hybrides F<sub>1</sub> ont donc été réalisés entre lignées HD et lignées SG pour étudier leur comportement agronomique en comparaison avec des hybrides F<sub>1</sub> entre lignées SG.

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### A. Matériel végétal

A l'intérieur du programme de sélection du chou à choucroute réalisé à la Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes de l'I.N.R.A. à Versailles, 3 clones, R, V, X, issus de 4 autofécondations (« S<sub>4</sub> ») et 1 clone Z issu de 7 autofécondations (« S<sub>7</sub> ») ont été utilisés comme plantes-mères. Ils ont été choisis car ils étaient destinés à la réalisation d'hybrides de clones (en particulier R × Z et Z × V).

Les plantes de chaque clone ont été cultivées en serre (en conditions semi-naturelles avec éclairage d'appoint) ou en chambre climatisée (thermopériode de 12-18 °C, humidité relative de 60 p. 100, photopériode de 16 heures et éclairage de 50 W/m<sup>2</sup>).

### B. Culture *in vitro* des anthers

Des boutons floraux de 2 à 4 mm de longueur ont été prélevés sur les plantes en début, milieu ou fin de floraison au cours du printemps et de l'été 1985. L'heure du prélèvement a été notée.

Les boutons floraux ont été désinfectés par trempage dans une solution d'hypochlorite de calcium à 2 p. 100 pendant 7 minutes puis rincés 2 fois dans de l'eau stérilisée. Les anthers des boutons floraux dont le rapport longueur des anthers/longueur des pétales est compris entre 1/2 et 7/8 (correspondant au stade des microspores juste avant la première mitose pollinique) ont été mises en culture dans des boîtes de Petri contenant un milieu appelé K<sub>46</sub>, proche de ceux préconisés par KELLER & ARMSTRONG (1983) pour le chou brocoli : avec 1 mg/l d'A.N.A. (\*), de 2,4 D. (\*\*), et de B.A. (\*\*\*) ; 800 mg/l de glutamine ont été ajoutés et l'agarose (0,8 g/l) employé à la place d'agar-agar. Le pH a été ajusté à 5,8 avant stérilisation dans un autoclave à 112 °C pendant 25 minutes.

Les boîtes de Petri scellées par un film de paraffine et un film en matière plastique étirable ont été placées à l'obscurité. Elles ont reçu un traitement thermique de 35 °C pendant 18 à 72 heures selon les expériences, puis de 25 °C pendant 14 jours. Elles ont été ensuite disposées à la lumière dans une salle de culture (thermopériode de 18-23 °C, photopériode de 16 heures, et éclairage de 12 W/m<sup>2</sup>).

### C. Culture des embryons androgénétiques

Lorsque les embryons « émergent » des anthers, ils sont prélevés et placés sur un milieu M<sub>8</sub>. Ce milieu contient les macroéléments et les microéléments de MONNIER (1973), 27,8 mg/l de FeSO<sub>4</sub> additionné de 37,3 mg/l de Na<sub>2</sub> E.D.T.A. (\*\*\*), 1 mg/l de vitamines B<sub>1</sub> et B<sub>6</sub>, 80 g/l de saccharose et 8 g/l d'agar-agar (Touzart et Matignon). Les embryons qui évoluent normalement en plantules peuvent être transférés dès le stade « développement des primordia foliaires » sur un milieu T<sub>0</sub> sans substance de croissance (DORÉ, 1975). Lorsque le méristème apical reste bloqué, un transfert est effectué sur le milieu T<sub>05</sub> différant de T<sub>0</sub> par la présence de B.A. (0,1 mg/l).

L'enracinement des plantules est obtenu par bouturage sur le milieu T<sub>0</sub>. Les plantes peuvent être maintenues et multipliées par bouturage des bourgeons axillaires.

(\*) A.N.A. = Acide naphtalène acétique.

(\*\*) 2,4 D. = acide 2,4 dichlorophénoxyacétique.

(\*\*\*) B.A. = benzyladénine.

(\*\*\*\*) E.D.T.A. = éthylène diéthylamine tétraacétique.

#### D. Culture des plantes androgénétiques et doublement du stock chromosomique

Les plantes enracinées ont été repiquées en terre dans un terreau horticole et placées en chambre climatisée (conditions indiquées au paragraphe A) dans une « mini-serre » (Bouillard Frères). Celle-ci est ouverte progressivement pour assurer l'acclimatation des plantes.

Les plantes ont été ultérieurement placées dans une chambre climatisée (7 °C, 16 heures de jour, 28 W/m<sup>2</sup> et 60 p. 100 d'humidité relative pendant 8 semaines) pour permettre leur vernalisation. Pendant cette période, les plantes haploïdes ont été traitées à l'aide d'un coton imbibé d'une solution de colchicine (Merck) à 0,2 p. 100, placé sur le méristème principal pendant 48 heures, selon une technique proche de celle utilisée par CURRAH & OCKENDON (1987).

Toutes les plantes ont été ensuite installées en serre (conditions définies au paragraphe A) au début de janvier 1986 pour floraison en mars.

#### E. Observations et fécondations effectuées sur les plantes androgénétiques

Le niveau de ploïdie des plantes a été estimé en mesurant la longueur des cellules de garde des stomates des feuilles (DORÉ, 1986), en effectuant 10 mesures par feuille et non 2 comme indiqué par erreur dans l'article.

Au stade de la floraison, plusieurs caractères ont été observés chez les plantes : vigueur de la plante et développement végétatif, épaisseur des feuilles, taille des fleurs. Chez les plantes ayant fleuri, la germination des grains de pollen a été évaluée *in vitro* sur le milieu utilisé chez le colza par GUERCHE (1986), et leur viabilité par des observations après coloration selon la technique d'ALEXANDER (1969).

Les plantes fleuries HD<sub>0</sub> issues de R et de Z (HD<sub>0</sub>-R et HD<sub>0</sub>-Z)\* ont été autofécondées au stade bouton à raison de 6 rameaux par plante. Ultérieurement les plantes fleuries HD<sub>1</sub>-Z ont été autofécondées. Ces mêmes plantes ont été aussi croisées pour production d'hybrides F<sub>1</sub> avec des lignées SG, issues de V après 10 autofécondations (S<sub>10</sub>) en sélection généalogique (SG<sub>10</sub>-V)\*.

#### F. Culture et observations réalisées sur les lignées et les hybrides F<sub>1</sub>

Les graines de 11 lignées HD<sub>1</sub>-R et d'1 lignée HD<sub>2</sub>-R et celles de 5 lignées HD<sub>1</sub>-Z et de 10 lignées HD<sub>2</sub>-Z ont été semées. Les plantes obtenues ont été mises en place au champ au printemps 1987 pour observations et comparaisons avec des plantes issues de 3 lignées SG<sub>10</sub>-R et 17 lignées SG<sub>10</sub>-Z pour comparaisons.

Dans le même essai, 6 hybrides F<sub>1</sub> de composition lignée HD<sub>1</sub>-Z × lignée SG<sub>9</sub>-V ont été installés au champ pour observations et comparaisons avec 8 hybrides F<sub>1</sub> de composition lignée SG<sub>9</sub>-Z × lignée SG<sub>9</sub>-V.

(\*) Dans la suite de l'article, toute lignée HD ou SG issue de R, V ou Z sera désignée par HD<sub>i</sub>-R, HD<sub>i</sub>-Z ou SG<sub>i</sub>-R, SG<sub>i</sub>-V, SG<sub>i</sub>-Z avec en indice (i) le nombre d'autofécondations effectuées.

Les plantes ont été disposées en parcelles élémentaires de 3 lignes de 8 plantes avec 2 répétitions. Les observations au champ effectuées en été et à l'automne 1987 ont porté sur de nombreux caractères morphologiques et d'intérêt agronomique et technologique concernant la plante, la feuille et la pomme :

— pour la plante : le volume, la précocité, la rusticité, la forme, le port, la disposition des feuilles extérieures, l'importance relative de la pomme par rapport à l'ensemble de la plante, la longueur du pied, l'importance du drageonnement, la tendance à la verse et l'intensité des attaques parasitaires ;

— pour la feuille : la forme, la couleur, l'aspect du limbe et de la nervation et la quantité de cire ;

— pour la pomme : le rapport hauteur/largeur, la longueur et le diamètre de l'axe, et des caractères ayant une incidence directe sur la qualité de la choucroute, en particulier la couleur, la compacité, la structure de la pomme, la lignification de l'axe et la finesse de la feuille.

### III. RÉSULTATS

#### A. Production des lignées homozygotes et d'hybrides F<sub>1</sub>

La production d'embryons a été extrêmement variable d'un jour à l'autre, d'une boîte de Petri à l'autre, d'une anthère à l'autre.

Seules les anthères prélevées sur les plantes R et Z ont permis l'évolution de microspores en embryons. Ainsi 276 embryons à partir de R et 34 embryons issus de Z ont été obtenus (tabl. 1). Les anthères embryogènes sont peu fréquentes mais le nombre d'embryons obtenus par anthère peut atteindre 60 : par exemple dans la série des 408 anthères de R mises en culture le 3 avril 1985, 188 embryons sont sortis de moins de 10 anthères.

Les embryons obtenus étaient à des stades variés de l'embryogenèse : du stade globulaire au stade « 2 cotylédons » (fig. 1). Seuls 2 d'entre eux ont évolué directement en plantules. Pour tous les autres, plusieurs repiquages ont été nécessaires pour parvenir à des plantules « équilibrées », bonnes à être transférées en terre. En tout 77 plantes (HD<sub>0</sub>-R) provenant de R et 12 provenant de Z (HD<sub>0</sub>-Z) se sont développées et ont été repiquées en terre (tabl. 1).

Toutes les expériences qui ont donné un résultat favorable concernaient les plantes-mères en début ou en milieu de floraison. Le traitement thermique de 48 heures à 35 °C est celui qui a donné le plus souvent des résultats positifs tandis que l'heure de prélèvement semble être sans effet. Chez les 2 populations androgénétiques les plantes diploïdes sont les plus fréquentes (tabl. 2). Le niveau haploïde, diploïde ou triploïde estimé par la mesure des cellules de garde des stomates a été confirmé dans 88 p. 100 des cas par les observations faites au stade de la floraison et portant sur le port de la plante, l'épaisseur des feuilles et la taille des fleurs (tabl. 2).

Seules les plantes diploïdes et quelques plantes haploïdes ont fleuri : 29 issues de R et 6 issues de Z étaient diploïdes spontanées, 2 issues de R et 1 issue de Z étaient haploïdes doublées. Les plantes triploïdes ont connu un développement végétatif important mais n'ont



Figure 1

Embryons androgénétiques sortant d'une anthère du clone R, à des stades de développement variés.

Androgenetic embryos at different stages arising from an anther of R clone.

pas été sensibles au traitement de vernalisation efficace pour les plantes diploïdes.

Le traitement à la colchicine a provoqué des dommages (inhibition, nécrose ou même destruction) au niveau du méristème apical chez plusieurs plantes. Le développement d'un méristème axillaire n'a pas été suffisamment rapide pour permettre sa vernalisation. Les 2 seules plantes haploïdes qui ont fleuri en serre étaient en chimère sectorielle ( $n$  ou  $2n$  selon les rameaux).

Le test de germination *in vitro* des grains de pollen des HD<sub>0</sub> a montré que beaucoup d'entre eux ont une faculté germinative faible ou nulle.

L'observation des grains de pollen après coloration d'ALEXANDER montre, chez les mêmes génotypes, la présence de grains de pollen petits et lorsque des grains de petite taille sont uniquement présents, il n'y a pas de germination.

Parmi toutes les plantes HD<sub>0</sub>, 18 HD<sub>0</sub>-R et 5 HD<sub>0</sub>-Z ont produit des graines (HD<sub>1</sub>) après autofécondation. Le nombre de graines par silique est faible (de 0,12 à 2,50) chez les plantes HD<sub>0</sub>-R alors que le clone R en produit de 2,38 à 7,14 selon les conditions environnementales. Pour les plantes HD<sub>0</sub>-Z le nombre de graines par silique (sauf exception) est plus élevé et du même ordre que celui du clone Z. Si l'on classe les moyennes des nombres de graines obtenues par silique d'après les observations effectuées sur la qualité du pollen, la comparaison des moyennes montre que les classes obtenues sont significativement différentes entre elles. Les 2 classes où aucune graine n'a été obtenue sont celles où les grains de pollen de petite taille sont majoritaires (tabl. 3).

## B. Etude du comportement des lignées et des hybrides F<sub>1</sub>

### 1. Les lignées

L'homogénéité intralignée est remarquable pour tous les caractères observés chez toutes les lignées HD<sub>1</sub>, HD<sub>2</sub> et SG (fig. 2), qu'elles soient issues de R ou de Z à l'exception d'une seule HD<sub>1</sub>-R (n° 141) où on trouve 2 plantes chétives sur 24.

TABLEAU 1

Bilan de la culture d'anthères pour les 4 génotypes R, V, X et Z.  
Results of anther culture for the four genotypes, R, V, X and Z.

Génotype	Nombre d'anthères mises en culture (a)	Nombre d'embryons obtenus (b)	$\frac{b}{a}$ (%)	Nombre de plantes obtenues (c)	$\frac{c}{b}$ (%)	Nombre de plantes reprises en terre (d)	$\frac{d}{c}$ (%)	$\frac{d}{a}$ (%)
R	1 644	276	16,8	77	27,9	73	94,8	4,4
V	762	0						
X	900	0						
Z	2 196	34	1,5	12	35,2	11	91,7	0,4

TABLEAU 2

Niveau de ploïdie des plantes androgénétiques issues des plantes-mères R et Z.  
Ploidy level of androgenetic plants from R and Z mother plants.

Génotype de la plante-mère	R				Z			
	$n$	$2n$	$3n$	Mixoploïde	$n$	$2n$	$3n$	Mixoploïde
Nombre de plantes estimées par la mesure de la longueur des cellules de garde des stomates	13	32	25	3	0	5	6	0
Nombre de plantes estimées par les observations à la floraison	13	29	28	—	0	6	5	
Fréquence	17,8%	39,7 %	38,4 %	4,1 %	0 %	54,5 %	45,5 %	0 %

TABLEAU 3

Nombre de graines obtenues par silique chez les plantes androgénétiques  $HD_0$ -R et la plante-mère R en fonction des types de pollen observés après coloration d'ALEXANDER.

Number of seeds obtained per silique in  $DH_0$ -R androgenetic plants and the mother plant R according to pollen types observed after ALEXANDER staining.

Génotype	Grains de pollen tous roses (*) (A)	Majorité de grains de pollen roses (*) (B)	Majorité de grains de pollen verts (*)	Grains de pollen tous verts (*)
Plantes $HD_0$ -R	0,18	0,04	0	0
	0,93	0,08	0	0
	1,30	0,12	0	0
	1,49	0,14	0	0
	1,81	0,27	0	0
		0,29	0	0
	2,50	0,63		
		0,93		
		0,94		
		0,99		
	1,40			
Clone R	2,38			
	2,50			
	3,18			
	3,57			
	5,00			
	5,31			
	7,14			

(\*) Après coloration d'ALEXANDER les grains de pollen viables sont colorés en rose tandis que les grains de pollen vides et de petite taille sont colorés en vert.

La comparaison entre A et B à l'aide du test U montre que ces 2 distributions sont significativement différentes ( $U = 2,50$ ) au seuil de 5 %.



Figure 2

Différentes plantes d'une parcelle élémentaire, de deux lignées  $HD_1$ -R ( $HD3$  et  $HD78$ ).

Different plants within an elementary plot of two  $DH_1$ -R lines ( $DH3$  and  $DH78$ ).

Leur vigueur est très bonne : un échantillon de 5 plantes de chacune des lignées  $HD_1$ -Z révèle un poids moyen de 7,5 kg par plante alors qu'il est de 12,7 kg pour l'hybride  $F_1$  Z  $\times$  V.

#### a) $HD_1$ -R et $SG_{10}$ -R

Il n'y a pas de variations importantes dans la vigueur des différentes lignées. Un échantillon de 5 plantes exprime un poids moyen par plante compris entre 6,4 et 8,6 kg selon les  $HD_1$  et de 8,6 kg pour les SG (ces dernières ont été sélectionnées pour la vigueur de manière permanente). La sensibilité à *Alternaria* sp., la tendance au drageonnement et à la lignification de l'axe, caractéristique du clone de départ, se retrouvent chez toutes les lignées. Pour les autres caractères, il existe une très grande variabilité interlignées HD avec des associations différentes intéressant des caractères faciles à observer comme la couleur des feuilles, la forme de la pomme, la forme de la base de la plante ou la longueur de son axe (fig. 3 et 4).

#### b) $HD_1$ -Z et $SG_{10}$ -Z

Toutes les lignées sont équivalentes entre elles pour tous les caractères observés en particulier le volume de la plante, la forme de la pomme, l'aspect et la forme de la feuille (fig. 5).

#### c) $HD_1$ -Z et $HD_2$ -Z

Les lignées  $HD_1$  et  $HD_2$  sont équivalentes pour tous les caractères observés.

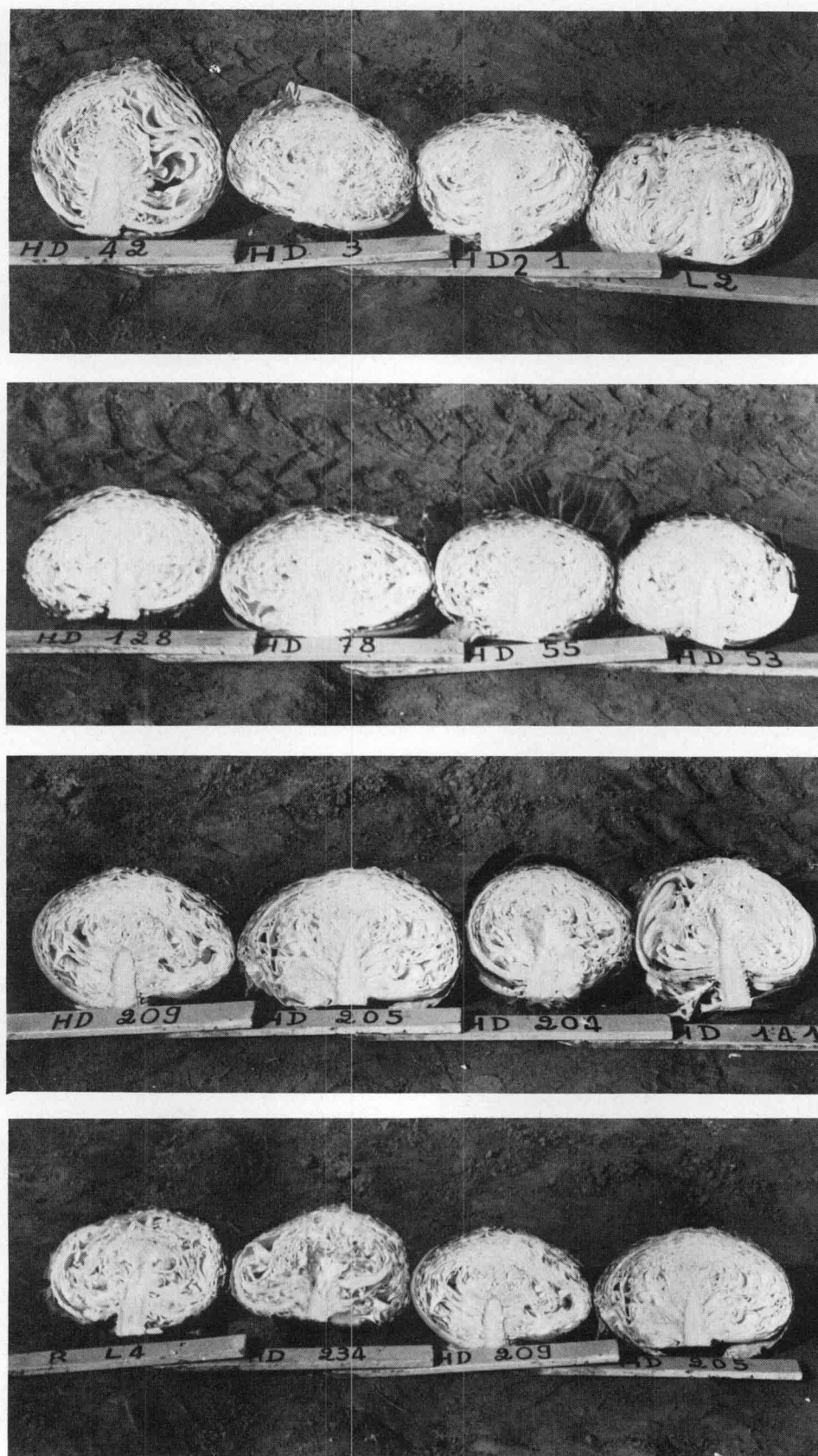


Figure 3

Sections longitudinales dans les pommes montrant la variabilité entre les lignées issues de R :

● 13 lignées HD<sub>1</sub> (HD<sub>3</sub> à HD<sub>234</sub>) ; 1 lignée HD<sub>2</sub> (HD<sub>21</sub>) ; 2 lignées SG (L<sub>2</sub> et L<sub>4</sub>).

Longitudinal sections in curds showing the variability existing between different pure lines originating from R :

● 13 lines DH<sub>1</sub> (DH<sub>3</sub> to DH<sub>234</sub>) ; 1 line DH<sub>2</sub> (DH<sub>21</sub>) ; 2 lines SG (L<sub>2</sub> and L<sub>4</sub>).

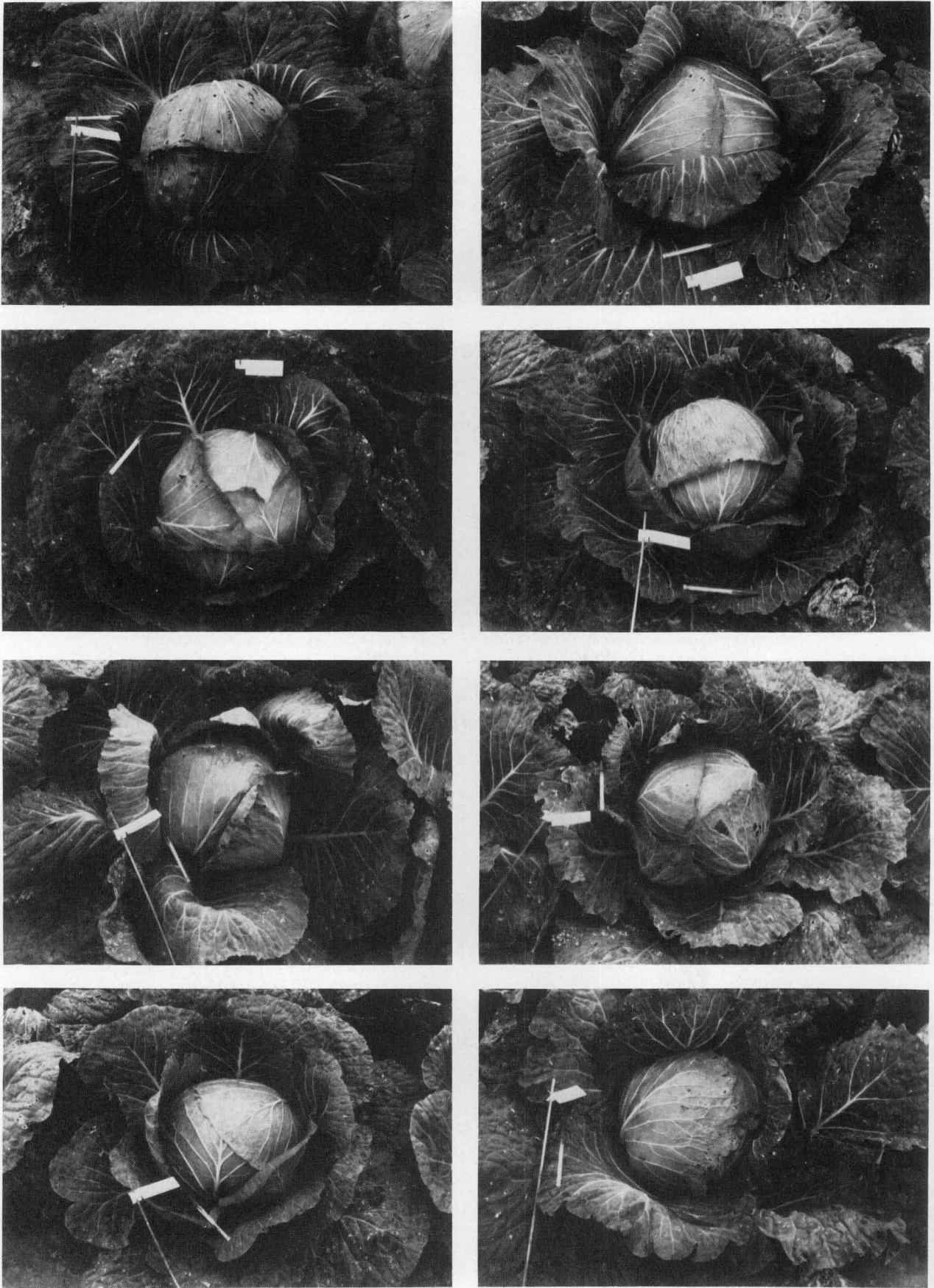


Figure 4

Plantes de 8 différentes lignées  $DH_1-R$ .

La forme de la pomme, la forme des feuilles, leur aspect, le port de la plante, etc... sont très variables d'une  $DH_1$  à l'autre.

Plants from 8 different  $DH_1-R$  lines.

Note variability in curd shape, leaf shape and aspect, plant bearing, etc.



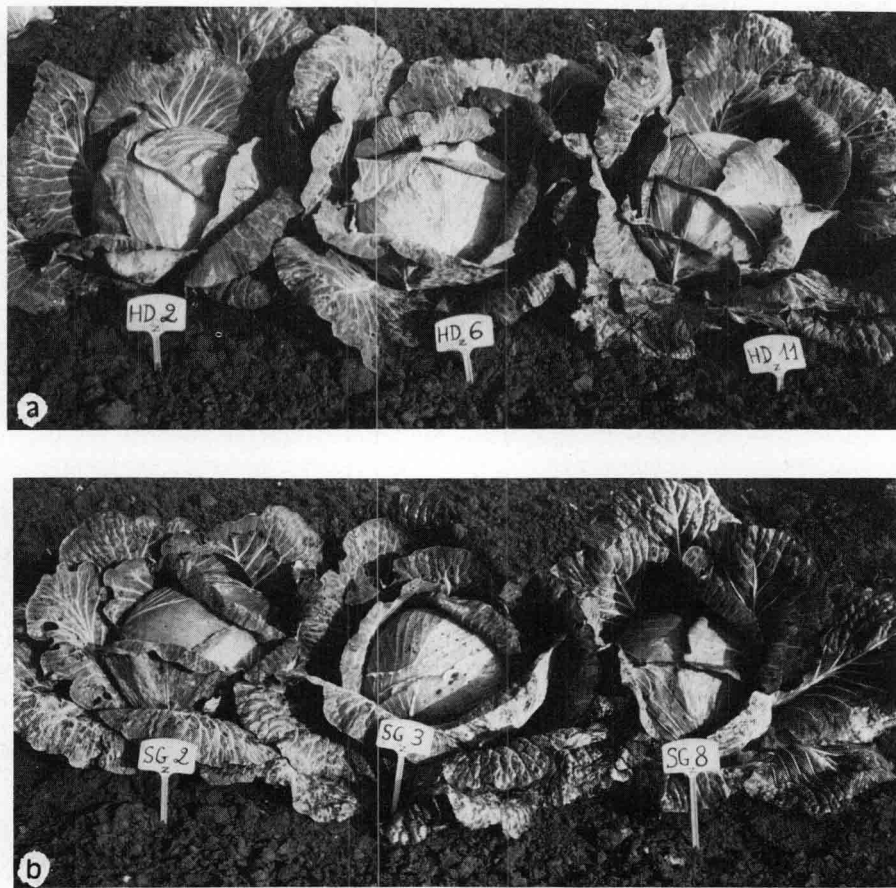


Figure 5

Plantes issues de Z au champ :

a : 3 lignées  $HD_1$  (HD2, HD6, HD11),

b : 3 lignées  $SG_{10}$  (SG2, SG3, SG8).

Plants originating from Z in the field :

a : 3  $DH_1$  lines (DH2, DH6, DH11),

b : 3  $SG_{10}$  lines (SG2, SG3, SG8).

## 2. Hybrides $F_1$

Les hybrides  $F_1$  avec la lignée V sont équivalents entre eux quelle que soit l'origine du parent Z : en particulier pour les caractères morphologiques (fig. 6).

## IV. DISCUSSION

La production de plantes androgénétiques est déterminée par 2 processus successifs bien distincts : l'induction du phénomène d'androgénèse et le développement d'un embryon en une plante.

La première étape apparaît ici soumise à de nombreux facteurs qui sont loin d'être contrôlés. Parmi eux, le facteur génotypique est très important : on remarquera que les 2 clones qui ont réagi positivement appartiennent à la même population d'origine et qu'aucun embryon n'a pu être obtenu avec les clones X et V ce qui a restreint l'intérêt de l'expérience. L'utilisation de lignées HD dans un programme de sélection suppose en effet de pouvoir en disposer pour tous les géniteurs souhaités et en nombre suffisant.

De même des facteurs physiologiques interviennent et jouent un rôle non négligeable. L'intérêt et l'effet du traitement thermique favorable à l'induction du

phénomène semblent ne pas être les mêmes d'un clone à l'autre et peuvent être en relation avec l'état physiologique des plantes-mères. L'effet « anthère » mis en évidence par PELLETIER & ILAMI (1972) chez le tabac et observé par de nombreux auteurs, semble ici exacerbé avec un nombre très faible d'anthères embryogènes et un rendement en embryons par anthère embryogène souvent très élevé. Ces résultats rejoignent nos observations chez le chou broccoli et le chou de Bruxelles ainsi que celles d'OCKENDON (1984, 1985 et 1986) et de LELU & BOLLON (1985) chez ce même cultigrroupe et chez le chou cabus ; ou enfin celles d'ORTON & BROWERS (1985) chez le broccoli. Par contre KELLER *et al.* (1987) indiquent des capacités embryogènes très élevées « en conditions optimales » pour tous les cultigrupes de *B. oleracea* et avec une forte proportion de génotypes répondant de manière positive.

La deuxième étape qui concerne le développement des embryons en plantes est une étape beaucoup mieux contrôlée au point de vue méthodologique. On constate néanmoins que les pertes ne sont pas négligeables et on peut se demander si elles ne correspondent pas pour une part à l'expression de gènes sublétaux affectant la croissance et le développement en plante comme le proposaient aussi ORTON & BROWERS (1985) chez le broccoli. Il s'agit d'ailleurs d'une forme de sélection naturelle comparable à celle qui s'exerce au niveau de la

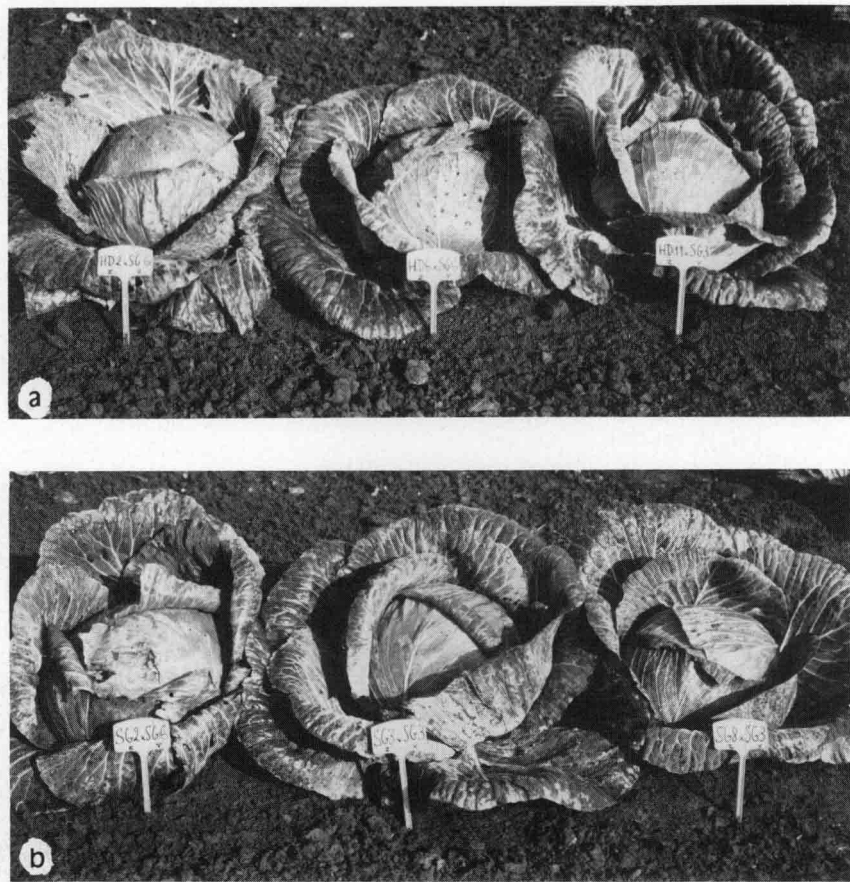


Figure 6

Plantes hybrides  $F_1$  ( $Z \times V$ ) au champ :

a) 3 lignées  $HD_1-Z$  croisées avec une même lignée  $SG_0-V$ .

b) 3 lignées  $SG_0-Z$  croisées avec la même lignée  $SG_0-V$ .

$F_1$  hybrid plants ( $Z \times V$ ) in the field :

a) 3  $DH_1-Z$  lines crossed with the same  $SG_0-V$  line.

b) 3  $SG_0-Z$  lines crossed with the same  $SG_0-V$  line.

production des graines en autofécondation et qui se traduit par l'avortement de certains embryons ; il en est de même dans le règne animal (ERICKSON, 1985).

La fréquence importante de plantes diploïdes observée dans cette expérience est tout à fait comparable à celle observée chez *Brassica oleracea* (OCKENDON, 1986 ; CHIANG *et al.*, 1985 ; KELLER & ARMSTRONG, 1983 ; DORÉ, 1986 ; ORTON & BROWERS, 1985) et l'homogénéité remarquable intralignée sur les nombreux caractères étudiés a permis de vérifier qu'ils proviennent bien de gamètes réduits. Ce dernier point est évidemment capital pour l'utilisation de l'androgénèse comme source de plantes homozygotes !

La régénération de plantes de niveaux de ploïdie différents entraîne, dans une stratégie efficace de sélection, la nécessité de les évaluer précocement. Nous avons pu vérifier encore une fois que la mesure de la longueur des cellules de garde des stomates est une méthode fiable d'estimation. Nous avons pu également confirmer le manque d'intérêt ultérieur des plantes triploïdes : la possibilité de les éliminer avant vernalisation représente un gain de place donc une économie appréciable.

L'obtention de plantes haploïdes entraîne la nécessité d'un doublement du stock chromosomique suffisamment précoce pour permettre l'initiation florale de rameaux diploïdes. Le traitement à la colchicine pen-

dant la vernalisation répond bien à ce souhait puisqu'il a permis d'obtenir une floraison groupée : il nécessite cependant quelques adaptations pour réduire les risques d'accidents au niveau du méristème principal. Diminuer la concentration de colchicine pourrait être l'une d'elles.

La « récupération » des plantes haploïdes nécessite des interventions successives ce qui a conduit certains auteurs, dans des expériences où le rendement en embryons est suffisamment élevé, à n'utiliser dans le programme de sélection que des lignées HD spontanément doublées. Il reste à démontrer que cela n'introduit pas un biais.

L'observation d'un échantillon de la population pollinique après coloration d'ALEXANDER, a permis de visualiser des qualités très variables de pollen. Ce test apparaît comme un bon indicateur précoce de la stérilité pollinique : seules les plantes dont l'échantillon de grains de pollen contenait du pollen coloré en rose donc viable, et de taille normale ont donné des graines. On pourrait donc l'utiliser pour éliminer les plantes dont l'autofécondation ne donnera pas de graines. Le test de germination des grains de pollen *in vitro* s'est révélé moins fiable dans nos conditions pour évaluer la qualité du pollen.

L'aptitude grainière des clones de départ est très différente : celle de R (en  $S_4$ ) n'est pas très bonne et aucun HD n'a présenté une amélioration de ce caractère

(mais il y a un HD du même niveau que le clone R) ; par contre dans le cas de Z (en  $S_7$ ) pour lequel la sélection a déjà été pratiquée (plus longtemps) pour ce caractère, l'aptitude grainière des 5 lignées HD<sub>1</sub> et des 10 lignées HD<sub>2</sub> n'est pas affaiblie par rapport à celle des lignées SG. Le comportement des lignées HD observées ici est donc tout à fait équivalent à celui d'une lignée SG. La stabilité du matériel HD d'une génération à l'autre a pu aussi être vérifiée ce qui constitue un point capital.

Les différentes associations des nombreux caractères observés chez les lignées HD-R montre qu'une sélection gamétique ne peut être mise en évidence. Chez le brocoli, ORTON & BROWERS (1985) ont pour leur part observé une distorsion dans la ségrégation de 3 caractères isozymatiques mais leur étude portait toutefois sur une population uniquement composée d'HD spontanément doublés.

La vigueur de toutes les lignées HD est bonne. Ceci provient certainement du fait que les plantes-mères avaient été sélectionnées au préalable comme parents potentiels d'hybrides, autrement dit l'accumulation de gènes favorables pour les caractères de vigueur et d'adaptation avait déjà été réalisée. On voit ici l'efficacité et le bien-fondé d'effectuer une telle démarche avant d'entreprendre une haplodiploïdisation chez une espèce allogame.

Mais on voit en même temps que si l'on veut que l'haplodiploïdisation ait un intérêt, une originalité, il ne faut pas non plus l'introduire trop tard dans le schéma de sélection généalogique pour qu'il y ait encore suffisamment de variabilité présente entre les gamètes : pour chaque gène, le taux d'hétérozygotie est encore de 12,5 p. 100 en  $S_4$ , il n'est plus que de 2 p. 100 en  $S_7$ . Les lignées HD-Z (en  $S_7$ ) sont équivalentes aux lignées SG<sub>10</sub>-Z et elles ne sont pas originales les unes par rapport aux autres.

En outre ceci démontre que la méthode de production *in vitro* employée ici n'introduit pas par elle-même une variabilité « spécifique ».

Par contre comme prévu la variabilité interlignées chez les lignées HD-R est importante : elle est certes le reflet de l'hétérozygotie résiduelle encore présente en  $S_4$ , mais les lignées HD sont en fait plus « typées » les unes par rapport aux autres que des lignées SG issues de l'autofécondation d'une plante en  $S_4$ . Ceci peut s'expliquer par la structure constitutive radicalement différente entre les 2 types de lignées HD et SG (fig. 7). L'haplodiploïdisation représente un système de reproduction particulier (conduisant à la fixation des caractères en une fois) et non pas une méthode de sélection. Par la sélection généalogique au contraire, la fixation est progressive et la sélection est réalisée simultanément. On obtient ainsi des structures relativement « tamponnées » (avec une bonne balance génétique) alors que le système d'haplodiploïdisation, plus brutal, conduit à des structures plus « tranchées ». L'haplodiploïdisation apparaît donc comme un révélateur de l'hétérozygotie résiduelle réelle, habituellement masquée en sélection généalogique.

En même temps les lignées HD-R ont des phénotypes très différents alors que les lignées SG<sub>10</sub> ont toutes le même phénotype. Ceci peut s'expliquer par le fait que les plantes androgénétiques sont issues d'une population pollinique et la compétition pollinique qui s'exerce

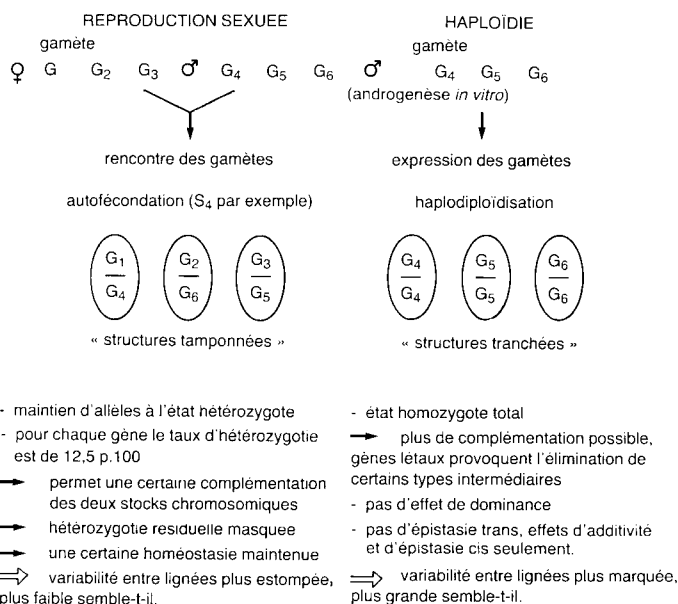


Figure 7

Comparaison entre les caractéristiques des produits d'une autofécondation en  $S_4$  et ceux d'une haplodiploïdisation (au niveau des plantes HD<sub>0</sub> et des  $S_5$ ).

Comparison between the characteristics of the products of a  $S_4$  selfing and those obtained by haplodiploidization (at DH<sub>0</sub> and  $S_5$  plant level).

normalement au niveau du style avant fécondation, est supprimée. Par contre les lignées SG<sub>10</sub> sont les « rescapées » des compétitions polliniques successives qui s'exercent à chaque autofécondation.

## V. CONCLUSION

Les différentes étapes qui conduisent à l'obtention de lignées HD et d'hybrides F<sub>1</sub>, depuis la culture des anthères *in vitro* sont nombreuses.

Nous avons proposé et mis au point un certain nombre de méthodes visant, d'une part à améliorer le rendement en matériel HD, et d'autre part à simplifier son intégration dans un programme de sélection.

Nous avons pu aussi démontrer par l'ensemble des études réalisées sur le comportement des lignées HD et des hybrides F<sub>1</sub>, que le système particulier de reproduction qu'est l'haploïdie permet d'accéder à un matériel végétal original tout à fait valable sur le plan agronomique notamment.

L'haplodiploïdisation par androgénèse *in vitro* apparaît chez le chou à choucroute comme un outil très intéressant en sélection à condition de concevoir une stratégie adaptée à ses contraintes spécifiques pour son utilisation optimale. C'est pourquoi il faut chercher à mieux maîtriser l'induction du phénomène, d'une part en tentant d'élucider le déterminisme de l'aptitude à l'androgénèse pour pouvoir enrichir les populations avec les gènes favorables, et d'autre part en poursuivant des améliorations au niveau de la production *in vitro*.

Enfin la nécessité d'observer un grand nombre de lignées HD nous conduit à envisager l'introduction de l'autofertilité dans les populations pour réduire l'interaction manuelle au niveau de la production des graines.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alexander M.**, 1969. Differential staining of aborted and non-aborted pollen. *Stain Technology*, 44, 117-122.
- Chiang M. S., Frechette S., Kuo C. G., Calvin Chong, Delafield S. J.**, 1985. Embryogenesis and haploid plant production from anther culture of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.). *Can. J. Plant Sci.*, 65, 1033-1037.
- Currah L., Ockendon D. J.**, 1987. Chromosome doubling of mature haploid Brussels sprout plants by colchicine treatment. *Euphytica*, 36, 167-173.
- De Buyser J., Henry Y., Lonnet P., Hertzog R., Hespel A.**, 1987. « Florin » : a haploid wheat variety developed by the anther culture method. *Plant Breed.*, 98, 1, 53-56.
- Doré C.**, 1975. La multiplication clonale de l'Asperge (*Asparagus officinalis*) par culture *in vitro* : son utilisation en sélection. *Ann. Amélior. Plantes*, 25, 2, 201-224.
- Doré C.**, 1986. Evaluation du niveau de ploïdie des plantes d'une population de choux de Bruxelles (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata*) d'origine pollinique. *Agronomie*, 6, 797-801.
- Erickson R. P.**, 1985. La saga des spermatozoïdes. *La Recherche*, 169, 1006-1016.
- Guerche P.**, 1986. Germination de grains de pollen de Colza. C. R. Groupe de travail I.N.R.A. « Cytologie et Cytogénétique », Ploudaniel, p. 37.
- Hu H., Zen J. Z.**, 1985. Development of new varieties via anther culture. In : *Handbook of Plant Cell Culture*, 3, 65-90. Evans, Sharp, Ammirato (Eds), Mac Millan N.Y.
- Keller W., Armstrong K.**, 1983. Production of haploids via anther culture in *Brassica oleracea* var. *italica*. *Euphytica*, 32, 151-159.
- Keller W. A., Arnison P. G., Cardy B. J.**, 1987. Haploid from gametophytic cells : recent developments and future prospects. In : *Plant Tissue and Cell Culture*, 223-241. Green & Somers (Eds.) Alan L. Niss, New York.
- Lelu M. A., Bollon H.**, 1985. Obtention d'haploïdes par culture d'anthers de *Brassica oleracea* var. *gemmifera*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 300, 2, Ser. 3, 71-76.
- Monnier M.**, 1973. Croissance et développement des embryons globulaires de *Capsella bursa-pastoris* cultivés *in vitro* dans un milieu à base d'une nouvelle solution minérale. *Bull. Soc. Bot. Fr. Mem. Coll. Morph.*, 179-194.
- Ockendon D. J.**, 1984. Anther culture in Brussel sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). I. Embryo yields and plant regeneration. *Ann. appl. Biol.*, 105, 2, 285-291.
- Ockendon D. J.**, 1985. Anther culture in Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). II. Effect of genotype on embryo yields. *Ann. appl. Biol.*, 107, 101-104.
- Ockendon D. J.**, 1986. Utilisation of anther culture in breeding Brussels sprouts. In : *Genetic manipulation in plant breeding*. Horn W. et al. (Eds.), 265-272. Walter de Gruyter, Berlin.
- Orton T. J., Browers M. A.**, 1985. Segregation of genetic markers among plants regenerated from anthers of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Theor. appl. Genet.*, 69, 637-643.
- Pelletier G., Ilami M.**, 1972. Les facteurs de l'androgénèse *in vitro* chez *Nicotiana tabacum*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 68, 5, 97-114.
- Thevenin L., Doré C.**, 1976. L'amélioration de l'asperge (*Asparagus officinalis* L.) et son atout majeur : la culture *in vitro*. *Ann. Amélior. Plantes*, 26, 4, 655-674.