

# Étude de caractères morphologiques et iso-enzymatiques sur des plantes issues de culture d'anthers chez le chou-fleur (*Brassica oleracea* var *botrytis*)

L Boucault<sup>1</sup>, JE Chauvin<sup>2</sup>, E Margale<sup>3</sup>, Y Hervé<sup>3</sup>

<sup>1</sup> GIP, Prince de Bretagne biotechnologie, Penn Ar Prat, 29250 Saint-Pol-de-Léon;

<sup>2</sup> INRA, centre de Rennes, ferme de Kerdevez, laboratoire d'amélioration des plantes maraîchères, 29250 Saint-Pol-de-Léon;

<sup>3</sup> INRA, centre de Rennes-le Rheu, station de génétique et d'amélioration des plantes,  
domaine de la Motte, 35650 Le Rheu, France

(Reçu le 6 février 1991; accepté le 8 août 1991)

**Résumé** — Des embryons ont été obtenus par culture d'anthers d'un génotype issu d'une variété-population de chou-fleur (*Brassica oleracea* L. *botrytis*), type automne. Une étude cytologique, l'établissement de profils isoenzymatiques et l'analyse de certains caractères morphologiques ont permis de mieux définir les particularités des plantes obtenues à partir de ces embryons. Soixante-quatre pour cent des plantes étudiées se sont avérées tétraploïdes alors que 26% seulement sont diploïdes et 6% triploïdes. Aucun haploïde n'a été observé. Une bonne corrélation ( $r = 0,973$   $p < 0,01$ ) a été notée entre le nombre de chloroplastes dans les cellules de garde des stomates et le niveau de ploïdie déterminé par dénombrement chromosomique. Certains critères morphologiques, comme la longueur des boutons avant l'anthèse ou la longueur des pétales à l'anthèse, se sont avérés être également de bons outils d'estimation du niveau de ploïdie. Le polymorphisme observé pour les 2 systèmes iso-enzymatiques, ACO et PGM, chez la plante mère a permis de mettre en évidence la ségrégation des allèles dans la descendance obtenue par culture d'anthers ce qui atteste de l'origine gamétophytique du matériel et de l'homozygotie des lignées issues de ces travaux. Aucun phénomène d'embryogenèse somatique n'a été observé.

***Brassica oleracea* var *botrytis* = chou-fleur / culture d'anthere / homozygotie / niveau de ploïdie / isoenzyme**

**Summary** — Study of morphological and electrophoretic traits of anther culture derived cauliflower plants (*Brassica oleracea* var *botrytis*). Anther culture derived embryos were obtained from an autumn type cauliflower (*Brassica oleracea* L. *botrytis*). Cytological, morphological (table I) and electrophoretic analyses of the regenerated plants were undertaken. A high frequency of tetraploids (64%) was observed. Only 26% of the plants were diploid, and 6% triploid. No haploids were obtained. A good correlation ( $r = 0.973$   $p < 0.01$ ) (table III) was noted between the number of chloroplasts in the stomatic guard cells and the ploidy level determined by chromosome counting (fig 2). A few morphological characteristics (length of the buds just before anthesis, petal length) may also be taken into account to estimate the ploidy level (table IV). The mother plant was analysed by starch gel electrophoresis and was found to be homozygous for most of the studied enzyme loci except for ACO and PGM for which polymorphism was observed (fig 1). This polymorphism allowed the verification of the gametophytic origin of the plants obtained by anther culture in which no more polymorphism was detected and segregation of the alleles could be studied (table II). No somatic embryos were observed.

***Brassica oleracea* var *botrytis* = cauliflower / anther culture / homozygous material / ploidy level / isozyme**

## INTRODUCTION

Le chou-fleur est une plante de grande valeur économique, particulièrement pour la région bretonne qui assure environ 75% de la production française. Ce cultigroupe, appartenant à l'espèce *Brassica oleracea* L., fait l'objet de travaux de sélection visant l'obtention de génotypes hybrides de qualité, homogènes et reproductibles par semences (Hervé, 1979; 1984). Cette dernière condition suppose l'homozygotie des lignées parentales.

Diverses techniques d'haploïdisation *in vitro* se sont avérées efficaces chez *Brassica oleracea* au sein des différents cultigrupes. Les plantes haploïdes obtenues conduisent, après doublement du stock chromosomique, à des lignées homozygotes qui peuvent être utilisées, notamment en sélection. Cependant, les études cytologiques du matériel obtenu par androgenèse montrent que les plantes ne sont pas toutes haploïdes mais peuvent être également diploïdes, triploïdes, tétraploïdes (Keller et Armstrong, 1983; Ockendon, 1984; Lelu et Bollon, 1985; Doré, 1986), ou aneuploïdes (Chiang *et al*, 1985). Des plantes chimériques, ayant un niveau de ploïdie variable suivant les tissus considérés, ont également été obtenues (Ockendon, 1986, 1988). Des anomalies de comportement méiotique ont été observées chez des lignées diploïdes issues d'haplométhodes chez le chou pommé par Chiang *et al* (1989).

Les travaux précités ne permettent, en général, pas de conclure quant à l'homozygotie du matériel obtenu par culture d'anthères, l'observation au champ du matériel autofécondé nécessitant au minimum une année supplémentaire d'expérimentation. Toutefois, la nature gamétophytique des plants issus d'androgenèse a pu être mise en évidence chez le brocoli grâce à une étude électrophorétique (Orton et Browers, 1985) et Doré et Bouldard (1988) ont souligné l'absence de variabilité phénotypique au champ dans les descendances en autofécondation de choux pommés issus de culture d'anthères.

Depuis le début des travaux de mise au point de la technique de culture d'anthères chez le chou-fleur à la station de génétique et d'amélioration des plantes du centre INRA de Rennes-Le Rheu, un certain nombre de plantes ont été régénérées. Les objectifs de la présente étude étaient :

- la vérification de l'origine gamétophytique de ces plantes issues d'androgenèse par analyse électrophorétique;

- l'évaluation du niveau de ploïdie du matériel, ceci par dénombrement chromosomique (observation de mitoses et de méioses), d'une part, et par comptage de chloroplastes dans les cellules de garde des stomates, d'autre part;

- l'analyse de certains caractères morphologiques de ces plantes après acclimatation et au cours de leur développement en serre.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Matériel végétal*

Le génotype utilisé pour les cultures d'anthères est une plante de chou-fleur d'automne sélectionnée dans une variété-population. Les mises en culture ont été réalisées suivant le protocole établi par Keller et Armstrong (1983) modifié par Yang (1989). Six cents embryons ont été obtenus pour 700 anthères mises en culture. Cent vingt plantes ont pu être régénérées à partir de ces embryons et acclimatées. Ce sont elles qui font l'objet de la présente étude après avoir été préalablement multipliées par voie végétative. Ainsi, 3 boutures par génotype ont été repiquées en conteneurs et installées en serre.

Dans ces conditions de culture, quelques génotypes ont rapidement présenté un développement anormal conduisant à une atrophie complète de l'apex végétatif. Les autres plantes ont eu un développement végétatif satisfaisant qui a permis l'induction d'une pomme et la floraison.

### *Analyse électrophorétique d'iso-enzymes*

La technique utilisée permet d'étudier les formes multiples d'enzymes ayant la même fonction catalytique, appelées iso-enzymes, et la ségrégation de leurs allèles. Neuf systèmes iso-enzymatiques ont été préalablement étudiés chez la plante mère : phosphoglucose isomérase, triose phosphate isomérase, glutamate oxaloacétate transaminase, 6-phosphogluconate déshydrogénase, aconitase, leucine aminopeptidase, phosphoglucomutase, malate déshydrogénase et isocitrate déshydrogénase, dont le déterminisme génétique a été établi chez les *Brassica* par Arus et Orton (1983), Arus et Shields (1983), Quiros (1987), Quiros *et al* (1987, 1988), Arus (1989). L'ensemble de la descendance issue de culture d'anthères a été analysé pour les 2 systèmes : aconitase (ACO) et phosphoglucomutase (PGM).

Le protocole expérimental est celui décrit par Arus et Orton (1983), Quiros et MacHale (1985), Chèvre *et al* (1991). Les extraits sont obtenus à partir de jeunes feuilles en croissance prélevées sur les plantes en pots et broyées dans le tampon d'extraction (Shields *et al*, 1983). Des papiers Whatman imbibés d'extrait sont ensuite déposés sur un gel d'amidon à 10,5% et

l'ensemble est mis sous tension pendant 4–6 h. Une fois la migration terminée, le gel est découpé en tranches qui sont mises à incuber dans une solution de révélation (Vallejos, 1983) à l'obscurité pendant environ 1 heure.

### Observation des mitoses sur racines

L'extrémité des racines en croissance prélevées sur des boutures réalisées à partir de feuilles est plongée pendant 4 h à température ambiante dans une solution de 8-hydroxyquinoléine à 0,29 g/l. La fixation a lieu durant 8 h dans de l'alcool acétique (3:1) à une température de 5 °C. Les tissus sont ensuite hydrolysés dans de l'acide chlorhydrique normal pendant 15 min à 60°C, puis colorés avec le réactif de Schiff pendant 30 min à température ambiante. Le montage est réalisé dans une goutte de carmin acétique.

### Observation des méioses

Les boutons contenant des anthers avec des cellules mères de grains de pollen au stade métaphase I sont prélevés à l'extrémité de l'inflorescence. Ils sont fixés dans le mélange de Carnoy (alcool-chloroforme-acide acétique 6:3:1) pendant 24 h à température ambiante avec renouvellement du fixateur 3–4 h après le prélè-

vement, puis stockés dans de l'alcool à 50% à 4°C. Les anthers sont dilacérées et montées entre lame et lamelle dans une goutte de carmin acétique additionné de perchlorure de fer à la limite du précipité.

### Dénombrement des chloroplastes

Le dénombrement des chloroplastes est réalisé par observation des cellules de garde des stomates sur un fragment d'épiderme de la face inférieure de la jeune feuille. Celui-ci est monté entre lame et lamelle dans une goutte de solution aqueuse contenant 1% de nitrate d'argent. Une trentaine de cellules stomatiques sont observées pour une plante donnée, à plusieurs emplacements sur chaque feuille, et sur des feuilles à différents niveaux sur la même plante.

### Evaluation de certains caractères morphologiques et traitement statistique des données

Différents caractères ont fait l'objet de mesures au cours du développement des plants en serre. La liste de ces caractères ainsi que celle des paramètres analysés sont données dans le tableau I. Cinq à dix mesures ont été effectuées par plant pour chacun des

**Tableau I.** Liste des caractères morphologiques ayant fait l'objet de mesures dans la descendance androgénétique de V23.2 et paramètres calculés à partir de ces mesures.

<i>Caractères mesurés</i>		<i>Unité/ Note</i>	<i>Paramètres analysés</i>
<i>de la feuille</i>			
longueur du limbe	(L)	cm	L/l
largeur du limbe en son milieu	(l)	cm	l <sub>2</sub> /L
largeur du limbe à 2 cm de la pointe	(l <sub>2</sub> )	cm	L <sub>P2</sub> /L
longueur du pétiole	(L <sub>P2</sub> )	cm	
surface apparente de la feuille	(St)	cm <sup>2</sup>	St/Sa
surface réelle de la feuille	(Sa)	cm <sup>2</sup>	
<i>de la fleur</i>			
longueur des boutons avant l'anthere	(L <sub>bout</sub> )	cm	L <sub>bout</sub>
longueur de sépales à l'anthere	(L <sub>sép</sub> )	cm	L <sub>sép</sub>
longueur des pétales à l'anthere	(L <sub>pét</sub> )	cm	L <sub>pét</sub>
<i>du développement</i>			
stade de développement de la pomme			
au temps t	(Ind)	0	végétatif
		1	induction
		2	pommaison
		3	commercial
stade de floraison au temps t	(Flo)	4	éclatement
		5	élongation
		6	anthere
		7	floraison

caractères étudiés soit, au total, 15–30 observations par génotype.

Les dimensions des feuilles ont été mesurées lorsque celles-ci ont atteint leur taille maximale pour les conditions de culture décrites. Les surfaces réelles et surfaces apparentes (ombres projetées) ont été évaluées à l'aide d'un planimètre. Ces 2 mesures permettent d'évaluer un coefficient de plissement de la feuille.

Les stades de développement de la pomme et de l'inflorescence ont été estimés à la date *t* à l'aide d'une grille de notation détaillée dans le tableau I.

Le traitement des données a été réalisé à l'aide du logiciel Statitcf sur microordinateur en faisant une analyse de variance sur les données morphologiques et cytogénétiques en tenant compte de 2 facteurs, niveau de ploïdie et génotype.

## RÉSULTATS

### Analyse iso-enzymatique

Conformément à la nomenclature (Arus *et al*, 1991), les zones d'activité sont notées en lettres majuscules et le (ou les) gène(s) correspondant à ces zones d'activité sont notés en lettres minuscules.

Parmi les 9 systèmes iso-enzymatiques, 2 systèmes uniquement présentaient un certain polymorphisme chez la plante mère, codée V23.2 (fig 1).

### Aconitase (ACO)

Les zones d'activité ACO-1 et ACO-4 se révèlent monomorphes chez V23.2 et chez les individus issus de culture d'anthers. Ces derniers sont donc, pour les gènes correspondants, homozygotes et identiques à la plante mère.

V23.2 est, par contre, hétérozygote pour Aco-2 et possède les 2 allèles a et b existant chez les choux (fig 1). Les profils observés dans la descendance androgénétique pour ce gène polymorphe révèlent qu'il y a bien ségrégation allélique avec des fréquences voisines de 1/2 pour l'allèle a comme pour l'allèle b (fig 1 et tableau II).

V23.2 présente 2 bandes pour Aco-3; les plantes issues d'androgenèse présentent également ce même profil iso-enzymatique. Cette observation sera discutée ultérieurement.

Système étudié	Déterminisme génétique chez les choux	Profils électrophorétiques observés	
		pour V23.2	dans la descendance V23.2
	4 zones d'activité:		2 profils
ACO enzyme monomérique	ACO-1 monomorphe	—	—
	ACO-2 correspondant à 1 gène ayant 2 formes alléliques a b	— —	— —
	ACO-3 correspondrait à 1 gène ayant 2 formes alléliques	----	----
	ACO-4 correspondant à 1 gène ayant 2 formes alléliques	----	----
	3 zones d'activité correspondant à 3 gènes:		2 profils
PGM enzyme monomérique	Pgm-3 pour lequel on connaît 2 allèles a b	— —	— —
	Pgm-1 pour lequel on connaît 4 allèles a b c d	— — — —	— — — —
	Pgm-2 pour lequel on connaît 4 allèles a b c d	— — — —	— — — —

—: bandes correspondant à une activité enzymatique importante  
----: bandes correspondant à une activité enzymatique faible

Fig 1. Déterminisme génétique des 2 systèmes isoenzymatiques aconitase (ACO) et phosphoglucomutase (PGM) pour l'espèce *Brassica oleracea* et profils observés pour le génotype V23.2 et sa descendance androgénétique.

### Phosphoglucomutase (PGM)

V23.2 est fixée pour Pgm-1 et Pgm-3 mais hétérozygote pour Pgm-2 pour lequel ce génotype présente 2 bandes correspondant à 2 allèles différents. Ces allèles n'ayant pas pu être identifiés, nous appellerons l'allèle le plus anodique x, et l'allèle le plus cathodique y, conformément à leur distance de migration sur le gel.

**Tableau II.** Étude de la ségrégation des allèles et couple d'allèles dans la population d'origine pollinique issue de V23.2 pour les gènes Aco-2 et Pgm-2.

Gènes	Aco-2		Pgm-2	
	a	b	x	y
Allèles	a	b	x	y
Effectifs observés	46	57	40	63
Effectifs théoriques	1/2 51,5	1/2 51,5	1/2 51,5	1/2 51,5
$\chi^2$ observés	1,17		5,14	
$\chi^2$ théorique (0,05)			3,84	
$\chi^2$ théorique (0,01)			6,63	
Couples d'allèles	ax	ay	bx	by
Effectifs observés	18	28	22	35
Effectifs théoriques	1/4 25,75	1/4 25,75	1/4 25,75	1/4 25,75
$\chi^2$ observé			6,4	
$\chi^2$ théorique (0,05)			7,8	
$\chi^2$ théorique (0,01)			11,3	

L'étude de la descendance androgénétique montre qu'il y a bien ségrégation des 2 formes alléliques mais le calcul du  $\chi^2$  ne nous permet pas d'accepter l'hypothèse d'une répartition 1/2-1/2, au seuil de 5% (tableau II).

Pour savoir si nous disposons de 2 marqueurs indépendants, nous avons également étudié la ségrégation des couples alléliques pour les 2 gènes Aco-2 et Pgm-2. Le calcul du  $\chi^2$  (tableau II) nous permet de préciser que les allèles se répartissent dans la descendance de façon indépendante. Ceci implique qu'il n'y a pas de liaison entre les 2 gènes Aco-2 et Pgm-2; nous avons donc bien 2 marqueurs indépendants.

### Analyse cytogénétique

Le dénombrement des chloroplastes dans les cellules de garde des stomates permet de définir 2 groupes parmi les plants issus d'androgénèse : l'un dont le nombre de chloroplastes varie de 10 à 13 et l'autre entre 14 et 23 (fig 2). L'analyse cytogénétique a permis de mettre en évidence

les plantes du premier groupe était diploïdes et celles du second groupe triploïdes ou tétraploïdes. Le coefficient de corrélation, calculé à partir de nos données expérimentales, entre le niveau de ploïdie et le nombre de chloroplastes dans les cellules de garde des stomates est de 0,973 ( $p < 0,01$ ) (tableau III).

Le dénombrement des chloroplastes sur des feuilles prélevées à différents étages foliaires et le dénombrement des chromosomes en mitose et en méiose font apparaître dans la population observée 26% de plantes diploïdes, 64% de tétraploïdes, 6% de triploïdes et 4% de plantes chimériques. Il est à noter qu'aucun haploïde n'a été obtenu. Parmi les chimères, 2 génotypes se sont révélés être chimériques pour les 3 boutures observées et présentent toutes des feuilles tétraploïdes et des fleurs diploïdes. Pour 3 autres génotypes, les différentes boutures issues d'une même plante ne présentent pas le même niveau de ploïdie.

L'analyse des méioses chez les tétraploïdes n'a permis de mettre en évidence que des bivalents. Aucun tétravalent n'a été observé.

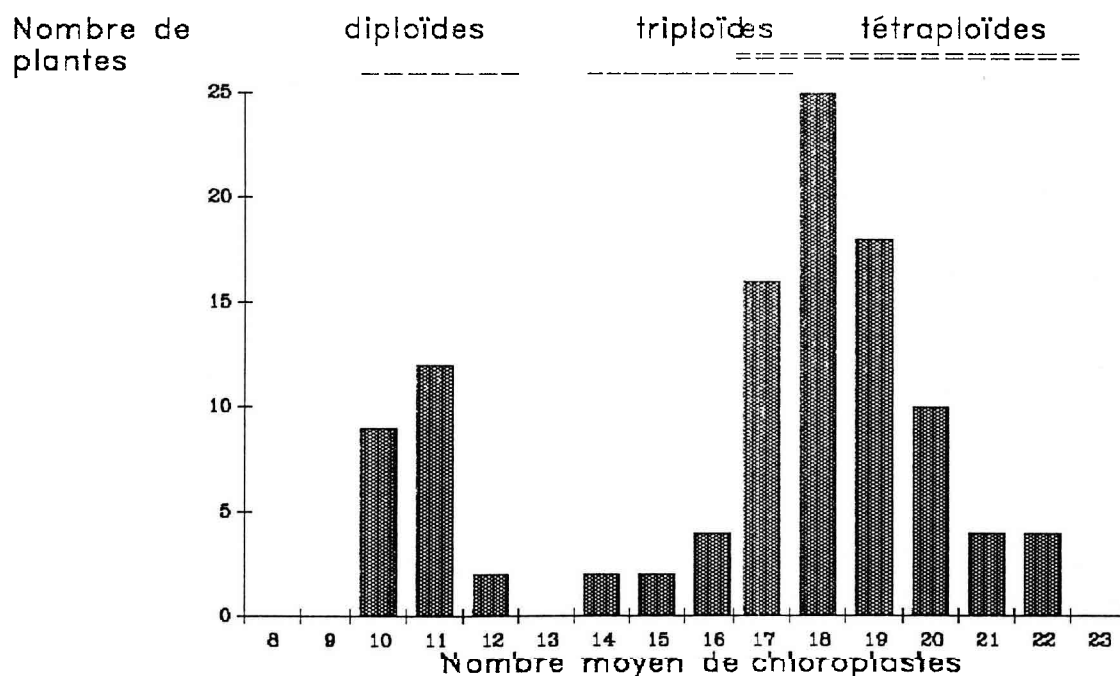


Fig 2. Distribution du nombre moyen de chloroplastes dans les cellules de garde des stomates pour les descendance de V23.2.

### Analyse de la variabilité morphologique

Le tableau III nous montre les coefficients de corrélation entre les différents paramètres analysés et le niveau de ploïdie. La longueur des boutons ( $L_{bout}$ ) et des pétales ( $L_{pét}$ ), la taille du pétiole par rapport à la taille de la feuille ( $LPé/L$ ), la forme de l'extrémité de la feuille, traduite par le rapport  $l_2/L$ , et son degré de plissement ( $St/Sa$ ), étant donné leur bonne corrélation avec le niveau de ploïdie pourront être utilisés comme des estimateurs de ce critère. La valeur moyenne calculée et l'écart type pour ces différentes va-

riables dans l'un et l'autre groupe de plantes sont indiqués dans le tableau IV.

Nous avons également observé, pour certains des caractères phénotypiques étudiés, une importante variabilité génétique au sein des groupes de plantes ayant un même niveau de ploïdie. C'est le cas pour la forme de la feuille, traduite par le rapport  $L/l$ , le stade de développement de l'inflorescence au temps  $t$ , ainsi que pour des caractères n'ayant pas fait l'objet de mesures précises mais simplement d'observations : port de la plante, blancheur et forme de la pomme.

Tableau III. Corrélations observées entre les différentes variables comprises dans l'analyse. Les chiffres en italique correspondent à un seuil de signification de 1%.

	<i>Ploid</i>	<i>Mchlo</i>	<i>L/l</i>	<i>St/Sa</i>	<i>l<sub>2</sub>/L</i>	<i>LPé/L</i>	<i>L<sub>bout</sub></i>	<i>L<sub>sép</sub></i>	<i>L<sub>pét</sub></i>	<i>Flo</i>	<i>Ind</i>
Ploid	1,000										
Mchlo	<i>0,973</i>	1,000									
L/l	-0,193	-0,169	1,000								
St/Sa	<i>0,541</i>	<i>0,537</i>	-0,210	1,000							
l <sub>2</sub> /L	<i>0,509</i>	0,494	-0,505	0,268	1,000						
LPé/L	<i>0,525</i>	<i>0,524</i>	-0,601	0,334	<i>0,627</i>	1,000					
L <sub>bout</sub>	<i>0,673</i>	<i>0,662</i>	-0,215	0,416	0,463	<i>0,602</i>	1,000				
L <sub>sép</sub>	0,475	0,422	-0,305	0,394	0,253	0,362	0,513	1,000			
L <sub>pét</sub>	<i>0,616</i>	<i>0,590</i>	-0,044	0,372	0,291	0,407	<i>0,588</i>	<i>0,762</i>	1,000		
Flo	0,138	0,105	0,236	0,196	-0,093	0,208	0,195	0,051	0,116	1,000	
Ind	-0,215	-0,184	0,264	-0,160	-0,338	-0,252	-0,217	-0,210	-0,285	0,366	1,000

**Tableau IV.** Liste des caractères pour lesquels une différence significative (F-0,01) a été observée entre les plantes diploïdes et les plantes tétraploïdes. Valeurs des moyennes et des écarts types pour ces caractères dans nos conditions de culture.

Caractère	Moyennes et écarts types observés	
	pour les diploïdes	pour les tétraploïdes
Nombre de chloroplastes dans les cellules de garde des stomates	11,37 ± 0,5	18,46 ± 0,98
Coefficient de plissement de la feuille ( $St/Sa$ )	1,24 ± 0,098	1,37 ± 0,114
Forme de la pointe de la feuille ( $l_2/L$ )	0,25 ± 0,051	0,31 ± 0,07
Longueur relative du pétiole ( $LPé/L$ )	0,31 ± 0,107	0,46 ± 0,131
Longueur du bouton avant l'anthèse ( $L_{bout}$ )	7,59 mm ± 0,64	8,79 mm ± 0,66
Longueur des sépales à l'anthèse ( $L_{sép}$ )	8,87 mm ± 0,88	10,03 mm ± 1,06
Longueur des pétales à l'anthèse ( $L_{pét}$ )	15,78 mm ± 1,51	19,14 mm ± 2,03
Stade de développement 3 mois après le rempotage	2,29 ± 0,012	2,67 ± 0,031

## DISCUSSION - CONCLUSION

La plante mère s'est révélée hétérozygote pour les gènes Aco-2 et Pgm-2 qui, de plus, ne présentent pas de liaison. Nous disposons donc là de 2 marqueurs indépendants dont le suivi dans la descendance androgénétique nous permet de conclure quant à l'origine des plantes obtenues. En effet, nous observons une ségrégation des allèles pour l'un et l'autre des marqueurs. Cette ségrégation, ainsi que l'absence de plantes hétérozygotes, confirment que les plants observés, quel que soit leur niveau de ploïdie, ont bien été régénérés à partir de microspores et non pas à partir de tissus somatiques de l'anthere. Ce résultat est conforme aux observations histologiques réalisées sur les tissus de l'anthere prélevés à différents stades en cours de culture *in vitro* qui n'ont jamais permis de mettre en évidence des processus d'embryogenèse somatique.

Nous constatons par ailleurs que, si la ségrégation des allèles dans la descendance est mendélienne pour le gène Aco-2, ce n'est pas le cas pour Pgm-2, pour lequel l'allèle le plus cathodique est plus fréquent (61%) que l'allèle le plus anodique (39%). Ce phénomène a déjà été rencontré chez des plantes régénérées à partir de

culture d'anthers de brocoli (Orton et Browsers, 1985). Il pourrait s'expliquer par l'existence d'une information génétique spécifique portée par certains génotypes leur permettant un meilleur développement au cours des différentes phases de la régénération *in vitro*. Cette information serait ici sur un ou des loci proches de Pgm-2. Ce phénomène demande à être confirmé car il aurait, bien sûr, l'inconvénient d'introduire un biais dans le schéma de création de lignées, des fréquences s'ajustant à la distribution théorique 1-2-1 étant par contre observées dans les génotypes issus de l'autofécondation de la plante mère V23.2 (Boucault, non publié).

Le déterminisme génétique du système ACO-3 ou ACO-4 (les zones d'activité pour ces 2 systèmes ne sont pas toujours aisées à distinguer tant elles sont proches) ne semble pas être définitivement établi. En effet l'hypothèse de la présence de 2 gènes (soit pour ACO-3, soit pour ACO-4) doit être émise pour expliquer les résultats obtenus dans notre étude et contrairement à ce qu'indiquent les données bibliographiques actuellement disponibles (Arus, 1989) qui ne mettent en évidence la présence que d'un seul gène.

L'étude cytogénétique a révélé un pourcentage de tétraploïdes très élevé (64%) dans la descendance par rapport à celui des diploïdes (26%). Ockendon, quant à lui, a obtenu en 1988 après culture d'anthers de choux-fleurs, 40,6% de diploïdes, 53,4% de tétraploïdes, 1% d'haploïdes, 4,7% de triploïdes et 0,3% d'octoploïdes. Chez le chou de Bruxelles et le chou pommé, l'obtention de plantes polyploïdes est moins fréquente (Chiang *et al*, 1985; Doré, 1986).

Il faut souligner ici que le fait de n'avoir observé en méiose, pour les choux-fleurs tétraploïdes, que des bivalents laisse supposer qu'il existe dans le cultigroupe un mécanisme de régulation de l'appariement des chromosomes homologues. Ainsi, durant la méiose, les choux-fleurs tétraploïdes se comportent comme des plantes diploïdes. Différents facteurs affectent cependant ultérieurement la fertilité de ces plantes polyploïdes en terme de rendement grainier en autofécondation (Chauvin, non publié).

La tendance des plantes issues de culture d'anthers à réaliser un doublement chromosomique spontané est un phénomène fréquent (asperge, aubergine, colza). Des processus d'endomitoses survenant plus ou moins précocement lors du développement de la microspore ou du jeune embryon, semblent pouvoir expliquer ces phénomènes (Raquin *et al*, 1982; Sangwan et Sangwan-Norreel, 1987). Le fort pourcentage de tétraploïdes obtenus pourrait remettre en cause l'utilisation de la technique de culture d'anthers à des fins de création variétale chez le chou-fleur. Toutefois la comparaison de nos résultats avec ceux obtenus par Ockendon (1988), d'une part, et des résultats plus récents obtenus au laboratoire (non publiés) laissent penser qu'un fort effet du génotype de départ doit être pris en compte. En outre, l'influence du milieu de culture des anthers et du milieu de repiquage des embryons sur le niveau de ploïdie peut être mis en cause (Hassawi *et al*, 1990) et est en cours d'étude. L'existence de boutures issues d'un même génotype mais présentant différents niveaux de ploïdie peut également être expliquée par des processus d'endomitoses au sein des tissus d'un embryon en cours de croissance qui auraient pour effet d'aboutir à la formation d'embryons chimériques. Ainsi, lors de la multiplication *in vitro*, suivant l'endroit où apparaît le bourgeon néoformé, des plantes diploïdes ou polyploïdes ont pu être régénérées. Ces phénomènes sont particulièrement fréquents *in vitro*

lorsque l'on passe par un stade de dédifférenciation cellulaire (Koorneef *et al*, 1988; Franklin *et al*, 1989). Les embryons sont également susceptibles de générer des plants chimériques avec des feuilles tétraploïdes et des fleurs diploïdes que nous avons pu mettre en évidence au cours de cette étude. De telles plantes ont également été observées par Ockendon chez le chou de Bruxelles (1986) et le chou-fleur (1988).

Le nombre de chloroplastes dans les cellules de garde des stomates étant bien corrélé avec le nombre de chromosomes de la plante, le dénombrement de ces organites s'avère un outil d'évaluation précoce du niveau de ploïdie. Cette technique avait déjà été utilisée avec succès chez la betterave (Essad et Touvin, 1959), le chou fourrager (Chèvre *et al*, 1989), la pomme de terre (Schreiter *et al*, 1989) mais la vérification restait à faire en ce qui concerne le chou-fleur. Cette technique permettra de trier rapidement les plantules suivant leur niveau de ploïdie. Toutefois, une vérification du matériel au champ devra être encore effectuée compte tenu des possibilités d'apparition de chimères. La bonne corrélation de critères morphologiques tels la longueur des pétales à l'anthèse, des boutons avant l'anthèse, avec le niveau de ploïdie pourra alors permettre une discrimination des diploïdes et polyploïdes.

Si la variabilité observée dans la descendance androgénétique est, dans une large mesure et pour la plupart des caractères étudiés, imputable à des différences de niveau de ploïdie entre les plantes, on détecte encore, au sein des différents groupes de ploïdie, une variabilité génétique significative pour des caractères comme la forme des feuilles, la précocité de pomaison et de floraison, le port des plantes, les qualités de la pomme. Ceci traduit une hétérozygotie assez importante du matériel de départ, que ne permettait pas de prévoir l'analyse des profils isoenzymatiques de ce génotype.

Cette étude a permis de répondre aux premières questions que peuvent se poser les sélectionneurs devant le matériel génétique issu d'une haplométhode. L'origine gamétophytique des plants, la variabilité observée pour l'ensemble des caractères étudiés confirment l'intérêt de ce matériel dans un but de création variétale. L'étude des produits issus de l'autofécondation de ces plants initiaux permettra d'apprécier les potentialités de cette technique sur des effectifs plus importants et dans des conditions normales de culture.



## RÉFÉRENCES

- Arus P (1989) Linkage analysis of isozyme genes in *Brassica oleracea*. In : *Proc 5th Cruciferae Workshop* (Quiros CF, Mc Guire PE, Eds), University of California, Davis, 45
- Arus P, Orton TJ (1983) Isozyme and linkage relationships of isozyme loci in *Brassica oleracea*. *J Hered* 74, 405-412
- Arus P, Shields CR (1983) Cole crop (*Brassica oleracea*). In : *Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part B* (SD Tanksley, TJ Orton, eds) Elsevier Sci Publ BV, Amsterdam, 339-351
- Arus P, Chèvre AM, Delourme R, Eber F, Kerlan MC, Margalé E, Quiros CF (1991) Isozyme nomenclature for eight enzyme systems in three *Brassica* species Proc 8th Int Rapeseed Congr, Saskatoon, Canada (sous presse)
- Chèvre AM, Eber F, Thomas G, Baron F (1989) Études cytologiques de choux tétraploïdes (*Brassica oleracea* L ssp *acephala*) obtenus à partir de lignées diploïdes après traitement à la colchicine. *Agronomie* 9, 521-525
- Chèvre AM, This P, Eber F, Deschamps M, Renard M, Delseny M, Quiros CF (1991) Characterization of disomic addition lines *Brassica napus* - *Brassica nigra* by isozyme, Fatty acid and RFLP markers. *Theor Appl Genet* 81, 43-49
- Chiang MS, Fréchette S, Kuo CG, Chong C, Delafield SJ (1985) Embryogenesis and haploid plant production from anther culture of cabbage (*Brassica oleracea* var *capitata*). *Can J Plant Sci* 65, 1033-1037
- Chiang MS, Chong C, Crête R, Fréchette S (1989) Anther-culture-derived 2x-plants in cabbage (*Brassica oleracea* L ssp *capitata* L). I. Meiotic abnormalities. *Cytologia* 54, 597-603
- Doré C (1986) Évaluation du niveau de ploïdie des plantes d'une population de choux de Bruxelles (*Brassica oleracea* ssp *gemmifera*) d'origine pollinique. *Agronomie* 6, 797-801
- Doré C, Bouldard L (1988) 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 F1. *Agronomie* 8, 851-862
- Essad S et Touvin H (1959) Techniques de production et de contrôle des betteraves polyploïdes. *Ann Amélior Plant* IV, 553-574
- Franklin Cl, Mott RL, Vuke TM (1989) Stable ploidy levels in long-term callus cultures of loblolly pine. *Plant Cell Rep* 8, 101-104
- Hassawi DS, Qi J, Liang GH (1990) Effects of growth regulator and genotype on production of wheat and triticales polyhaploids from anther culture. *Plant Breeding* 104, 40-45
- Hervé Y (1979) Le matériel végétal. Amélioration génétique. In : *Le Chou-fleur*, CTIFL-INVUFLEC, 19-36
- Hervé Y (1984) L'amélioration génétique du chou-fleur : vers les variétés hybrides. *Aujourd'hui et Demain* juin, 4-11
- Keller WA, Armstrong KC (1983) Production of haploids via anther culture in *Brassica oleracea* var. *italica*. *Euphytica* 32, 151-159
- Koorneef M, Van Diepen JAM, Hanhart CJ, Kieboom de Waart AC, Martinelli L, Schoenmakers HCH, Wijbrandi J (1988) Chromosomal instability in cell and tissue cultures of tomato haploids and diploids. *Euphytica* 43, 179-186
- Lelu MA, Bollon H (1985) Obtention d'haploïdes par culture d'anthers de *Brassica oleracea* L var *capitata* et var *gemmifera*. *C R Séances Acad Sci (Paris)*, 300, Série III, 2, 71-76
- Ockendon DJ (1984) Anther culture in Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var *gemmifera*) I. Embryo yields and plant regeneration. *Ann Appl Biol* 105, 285-291
- Ockendon DJ (1986) Utilisation of anther culture in breeding Brussels sprouts. In: *Genetic Manipulation in Plant Breeding* (W Horn, CJ Jensen, W Odenbach, O Scheider, eds) Walter de Gruyter, Berlin, 265-272
- Ockendon DJ (1988) The ploidy of plants obtained from anther culture of cauliflowers (*Brassica oleracea* var *botrytis*). *Ann Appl Biol* 113, 319-325
- Orton TJ, Browers MA (1985) Segregation of genetic markers among plants regenerated from cultured anthers of brocoli (*Brassica oleracea* var *italica*). *Theor Appl Genet* 69, 637-643
- Quiros CF (1987) Duplicated isozyme loci and cellular compartmentation of their products in *Brassica Cruciferae Newsl* 12, 24
- Quiros CF, MacHale N (1985) Genetic analysis of isozyme variants in diploid and tetraploid potatoes. *Genetics* 111, 131-145
- Quiros CF, Ochoa O, Kiamian SF, Douches D (1987) Analysis of *Brassica oleracea* genome by generation of *B campestris-oleracea* chromosome addition lines: characterization by isozymes and rDNA genes. *Theor Appl Genet* 74, 758-766
- Quiros CF, Ochoa O, Douches D (1988) Exploring the role of the  $x=7$  species in *Brassica* evolution: hybridization with *B nigra* and *B oleracea*. *J Hered* 79, 351-358
- Raquin C, Amssa M, Henry Y, de Buyser J, Essad S (1982) Origine des plantes polyploïdes obtenues par culture d'anthers. Analyse cytophotométrique *in situ* et *in vitro* des microspores de pétunia et de blé tendre. *Z Pflanzenzüchtg* 89, 265-277
- Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS (1987) Biochemical cytology of pollen embryogenesis. *Int Rev Cytol*, 107, 221-272
- Schreiter J, Munzert B, Moll A (1989) Bestimmung der Ploidiegrades durch Chloroplastenzählungen in Stomata bei *In-vitro* Kallusregeneraten von Kartoffeln. *Arch Züchtungsforsch*. Berl 19, 69-73
- Shields CR, Orton TJ, Stuber CW (1983) An outline of general resource needs and procedures for the

- electrophoretic separation of active enzymes from plant tissues. *In : Plant Genetics and Breeding. Part A* (Tanksley SD, Orton TJ, eds) Elsevier Sci Publ BV, Amsterdam, 443-468
- Vallejos CE (1983) Enzyme activity staining. *In : Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A* (Tanksley SD, Orton TJ, eds) Elsevier Sci Publ BV, Amsterdam, 469-516
- Yang Q (1989) Essais d'induction de plantes androgénétiques chez le chou-fleur et études cytologiques des structures obtenues. Thèse docteur ingénieur. Univ Rennes I