

Analyse des plantes de melon (*Cucumis melo* L) issues de croisements avec du pollen irradié à différentes doses

F Cuny ¹, R Dumas de Vaulx ², B Longhi ³, R Siadous ⁴

¹ Université d'Avignon, Laboratoire de cytologie et pathologie végétales, 33, rue Louis-Pasteur, F-8400 Avignon;

² INRA, station d'amélioration des plantes maraîchères,
domaine Saint-Maurice, F-84143 Montfavet Cedex;

³ Institut montpellierain d'imagerie médico-biologique, service de cytométrie en flux, mini-parc, bâtiment 2,
rue de la Croix-verte, F-34090 Montpellier;

⁴ Commissariat à l'énergie atomique, département de biologie, service de radioagronomie, CEN de Cadarache,
F-13108 Saint-Paul-Lez-Durance Cedex, France

(Reçu le 13 février 1992; accepté le 18 juin 1992)

Résumé — Chez le melon, les conséquences de l'irradiation γ du pollen du génotype Védrantais sur le rendement en embryons et en plantules haploïdes sont évaluées après autopolinisation et après hybridation avec le génotype F_1G_1 . L'utilisation de marqueurs génétiques nucléaires permet de confirmer l'origine parthénogénétique des embryons obtenus. La perturbation du processus de double fécondation semble mieux acceptée par le génotype F_1G_1 (3,4 d'embryons pour 100 graines) que par Védrantais (2 d'embryons pour 100 graines). Quelles que soient les doses d'irradiation comprises entre 0,15 et 2,5 kGy, la réponse parthénogénétique est toujours présente. Pour le génotype Védrantais testé, l'induction d'embryons est plus élevée en été qu'en automne. Au maximum 70% de ces embryons placés sur un milieu de culture spécifique ont évolué en plantes haploïdes. Le niveau de ploïdie des plantules a été déterminé en cytométrie en flux à partir de feuilles. Actuellement, l'utilisation en routine de cette technique permet un tri précoce des plants *in vitro* et l'élimination rapide des diploïdes issus de fécondations accidentelles. Aucun aneu- ploïde n'est détecté. Toutes les plantes obtenues présentent les phénotypes normaux attendus.

cytométrie en flux / parthénogénèse / embryon / niveau de ploïdie

Summary — Analysis of musk melon plants (*Cucumis melo* L) obtained after pollination with γ -irradiated pollen: effect of different doses. In musk melon, the effects of γ -irradiation applied to pollen, on haploid embryos and plantlet production have been evaluated after autopolinization or hybridization. The use of nuclear genetic markers confirmed the parthenogenetic origin of these embryos. The disruption of the double fertilization process seemed to be better accepted by the genotype F_1G_1 (3.4% of embryos) than by Védrantais (2% of embryos). Whatever the irradiation dose between 0.15 and 2.5 kGy, the parthenogenetical response was always present. For the Védrantais genotype, embryo induction was higher during summer than in autumn. A maximum of 70% of those embryos placed on a specific culture medium developed into haploid plants. Plantlet ploidy was determined from leaves using flow cytometry. Routine use of this method allows an early screened of plantlets and efficient elimination of diploids obtained from accidental fertilization. No aneuploid was detected. All the plants obtained showed the normal expected phenotypes.

flow cytometry / parthenogenesis / embryo / ploidy level

INTRODUCTION

Chez le melon ($2n = 2x = 24$), l'irradiation du pollen à 0,3 kGy a permis d'obtenir pour la première fois des haploïdes, avec un rendement intéressant : 2% d'embryons haploïdes (Sauton et Dumas de Vaulx, 1987). L'utilisation de marqueurs génétiques nucléaires confirme leur origine parthénogénétique. Mais il n'y a que la combinaison de la pollinisation avec du pollen inactivé par irradiation et de la culture d'em-

bryons immatures qui permette l'obtention de plantes haploïdes par parthénogénèse *in situ*. Jusqu'à présent, cette haplométhode n'a été testée que chez très peu d'espèces végétales, et seul un petit nombre a réagi positivement (Ivanov, 1938; Brewbaker et Emery, 1962). Il a souvent été constaté que la dose d'irradiation appliquée au pollen joue un rôle essentiel dans l'efficacité de la technique. Ainsi, généralement, des hybrides de phénotypes souvent anormaux et stériles (Powell *et al*, 1983; Daskalov, 1984; Eng-

vild, 1985; Sari Gorla *et al*, 1987), résultant vraisemblablement d'un état d'aneuploïdie de leur contenu chromosomique nucléaire (Snape *et al*, 1983), sont obtenus à faibles doses. Lorsque la dose d'irradiation augmente, ces hybrides disparaissent progressivement au profit des haploïdes (Pandey et Phung, 1982; Raquin, 1985; Zhang et Lespinasse, 1991). À fortes doses d'irradiation, la production d'haploïdes est quasiment nulle, alors que l'obtention de fruits parthénocarpiques peut exister (Zamir, 1983; Sanford *et al*, 1984; Zhang et Lespinasse, 1991). Afin d'optimiser l'induction d'haploïdes chez le melon, l'étude des effets des doses d'irradiation appliquées au pollen a été envisagée.

Généralement, le niveau de ploïdie d'une plante est déterminé par dénombrement des chromosomes dans les figures mitotiques des cellules méristématiques. Les cellules en mitose sont fixées au stade métaphase et l'ADN est coloré par la méthode de Feulgen. Cette technique bien que très fiable est fastidieuse, et de ce fait ne peut être utilisée en routine. D'autres techniques dites indirectes permettent de connaître, par extrapolation, le niveau de ploïdie du matériel végétal testé. Il s'agit par exemple, de dénombrer les chloroplastes dans les cellules de garde des stomates ou encore les pores germinatifs des grains de pollen. Les haploïdes sont généralement révélés par leur stérilité. Cependant, cette dernière observation nécessite l'attente de la floraison de la plante et la technique de détection d'haploïdes s'avère ainsi lourde et coûteuse. Récemment, la détermination du niveau de ploïdie basée sur la mesure de la teneur en ADN des noyaux en interphase par cytométrie en flux, a été appliquée aux végétaux (De Laat *et al*, 1987; Brown *et al*, 1991). Notre objectif a été d'utiliser cette technique cytologique pour le melon, afin de détecter de façon fiable et routinière les haploïdes parthénogénétiques induits par irradiation du pollen, à différentes doses. Nous déterminons dans quelle mesure d'éventuels aneuploïdes peuvent être détectés par cette méthode.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal et conditions de culture des plantes mères

La variété Védraçais, lignée pure andromonoïque du type Cantaloup Charentais (obtention Vilmorin), est utilisée à la fois comme parent pollinisateur et comme

parent femelle. Une seconde variété, PI124111 x gl/yg/nsv, notée F₁G₁ est également utilisée comme parent femelle. Celle-ci, de phénotype monoïque, possède les allèles récessifs glabre et *yellow-green* (couleur du feuillage) à l'état hétérozygote.

L'expérimentation a été réalisée pendant 2 années successives à la station d'amélioration des plantes de l'INRA de Montfavet, afin de détecter un éventuel effet saison sur l'obtention d'embryons haploïdes. Les plantes mères ont été cultivées :

- durant les mois de septembre et d'octobre 1989 dans une serre *cooling system* vitrée;
- durant les mois de mai et juin 1990 dans un tunnel plastique.

Irradiation du pollen

Les fleurs mâles sont prélevées le matin de l'anthèse et irradiées aux rayons gamma le jour même. Les irradiations γ émises par une source au cobalt 60 (1,184 x 10⁵ Bq) sont effectuées au centre d'étude nucléaire de Cadarache (ionisateur Cigal, France). Le débit utilisé est de 79 Gy/min. Des doses de 0,15; 0,5; 1,6; 2,5; 3,6 ou 4 kGy ont été appliquées aux fleurs mâles.

Réalisation des pollinisations manuelles

Les fleurs hermaphrodites de la variété Védraçais sont castrées puis ensachées 24 h avant l'ouverture des pétales et l'anthèse. Les fleurs femelles de F₁G₁ sont fermées la veille de l'anthèse avec une paire de pinces. Le jour de l'anthèse, chaque fleur est pollinisée par le pollen irradié de 4 fleurs. Les stigmates sont toujours saturés en pollen. Enfin, les fleurs sont ensachées ou fermées à nouveau, selon le cas.

Sauvetage des embryons immatures

Les fruits sont récoltés 20 j après la pollinisation, c'est-à-dire avant la maturité totale du fruit qui se situe environ 15 j plus tard. Les graines prélevées dans les fruits, préalablement désinfectées par flambage, sont ouvertes aseptiquement au scalpel, sous loupe binoculaire. Les embryons en sont extraits et sont placés en conditions aseptiques sur le milieu de culture spécifique des embryons de melon (Sauton et Dumas de Vault, 1987). La mise en œuvre de la culture *in vitro* est indispensable à la poursuite du développement des embryons immatures.

Repiquage et clonage des plantules

Les embryons placés sur le milieu de culture se développent en plantules qui peuvent être transférées 7 à

15 j plus tard en tube à essai sur le même milieu de culture. Quelques gouttes d'une solution 10^{-5} M de gibbérelline GA3 sont déposées sur les apex caulinaires non développés. Les plantules âgées d'environ 1 mois sont clonées par bouturage des nœuds sur le même milieu. Les cultures en boîtes de Pétri ou en tube à essai sont placées en chambre climatisée en photopériode de 12 h et à une température constante de 25 °C. Quinze j après chaque bouturage, les plantes au stade «3 à 4 feuilles» peuvent être transférées en pots individuels, sous serre. Cependant, une partie du matériel végétal est conservée *in vitro* par bouturages successifs en vue des analyses ultérieures.

Tri des plantes

Analyses des caractéristiques génétiques des plantules issues de la F₁G₁

Le phénotype correspondant à l'allèle glabre est détecté précocement sur les plants *in vitro*. Par contre, l'allèle *yellow-green*, responsable de la couleur vert-jaune des feuilles, est détecté plus tardivement sur les plantules transférées en terre.

Observations morphologiques

Les plantes haploïdes présentent des fleurs de petites tailles et les anthères contiennent des grains de pollen stériles.

Observations cytologiques

Le dénombrement chromosomique est effectué par la méthode de Feulgen, sur des pointes racinaires de plantes en croissance active après leur transfert en terre. Les pointes racinaires prélevées en fin de matinée sont traitées selon la technique décrite par Dumas de Vaulx (1970).

Analyse du niveau de ploïdie des feuilles par cytométrie en flux

La détermination du niveau de ploïdie a été réalisée au service de cytométrie en flux de l'Institut montpelliérain d'imagerie médico-biologique. Le cytomètre utilisé est un ACR 1400 (Bruker) équipé d'une lampe à vapeur de mercure Ushio-102DH-100 W et de 4 tubes photomultiplicateurs (PMT) (longueur d'onde d'excitation : 490 nm \pm 10 nm; fluorescence de l'iodure de propidium : 640 nm \pm 80 nm).

Une feuille est hachée rapidement à la lame de rasoir dans 0,5 ml de tampon phosphate pH 7,10 contenant KNO₃ 20 mM, NH₄NO₃ 20 mM, CaCl₂ 3 mM, MgSO₄ 1,5 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, sorbitol 50 mM et thioglycolate de Na 50 mM. La suspension est ensuite

filtrée sur toile à bluter en nylon d'une ouverture de maille de 50 μ m. On ajoute ensuite l'iodure de propidium (concentration finale : 50 μ g/ml) ainsi que du Triton X-100 (concentration finale : 0,1% v/v). L'échantillon est mis à colorer pendant 15 min à 4 °C et à l'obscurité. La coloration des acides nucléiques double-brin est obtenue par l'iodure de propidium (fluorochrome intercalant spécifique des acides nucléiques double-brin ADN et ARN). L'intensité de fluorescence rouge de l'iodure de propidium mesurée est proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans les noyaux (l'iodure de propidium se fixe sur l'ADN de manière stoechiométrique).

Pour améliorer la précision et la répétabilité des mesures, nous utilisons une référence interne dans chaque échantillon: 1 000 à 10 000 noyaux en suspension d'une graminée (*ray-grass*) sont ajoutés à l'échantillon avant coloration de l'ADN. Les noyaux de la graminée sont isolés dans les mêmes conditions que ceux de l'échantillon. Le pic supplémentaire obtenu est utilisé comme référence (étalon).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Nouaison des fruits et rendement en embryons en fonction de la dose d'irradiation appliquée au pollen

Les fruits se sont développés dans tous les cas, hormis ceux issus de fleurs non pollinisées, dont l'ovaire a séché, ou pollinisées avec du pollen irradié à 3,6 et 4 kGy. La dose létale pour le pollen de melon est de 4 kGy (Cuny et Roudot, 1991). Pour des doses d'irradiation inférieures à 1,6 kGy, le taux de nouaison n'est pas affecté par l'irradiation du pollen. Lorsque le pollen est traité aux rayons gamma, 97% des graines des fruits obtenus ne sont pas embryonnées. Deux types d'embryons sont observés : des embryons bloqués au stade globulaire et des embryons cotylédonnaires (embryons en forme de cœur). Ces derniers ne remplissent que la moitié de la graine. Leurs cotylédons sont étalés et plus ou moins dissymétriques. Des irradiations du pollen comprises entre 0,15 et 2,5 kGy donnent des rendements en embryons pratiquement identiques. Cependant 3 faits marquants peuvent être soulignés : 1) les rendements en embryons sont plus élevés pour le génotype femelle F₁G₁ que pour Védrantais; en effet, le pourcentage d'embryons cotylédonnaires est de l'ordre de 2,4% par fruit pour le génotype F₁G₁ (tableau I) et de 1,4% seulement pour Védrantais (tableau II); cet effet du génotype du parent femelle sur le rendement en embryons a déjà été signalé chez le

Tableau I. Effet de la dose d'irradiation du pollen de melon du génotype Védrantais sur le rendement en embryons et en plants *in vitro* après hybridation avec le génotype F₁G₁ (exprimé en nombre). Expérimentation réalisée durant les mois de juin et de juillet 1990. Le chiffre entre parenthèses représente le pourcentage d'individus obtenus.

	Dose (kGy)				
	0,15	0,5	1,6	2,5	3,6
Nombre de fleurs pollinisées	11	14	10	8	12
Nombre de fruits noués	8	10	8	2	1
Nombre total d'embryons globulaires	64 (1)	84 (1)	50 (0,9)	11 (1,1)	0
Nombre de plants <i>in vitro</i> après 3 mois de culture (issus de 2 fruits)	5 (71)	—	10 (91)	—	—
Nombre de plants <i>in vitro</i> après 6 mois de culture (issus de 2 fruits)	2 (29)	—	2 (18)	—	—
Nombre total d'embryons cotylédonnaires	129 (2,1)	121 (1,6)	139 (2,4)	24 (2,4)	0
Nombre de plants <i>in vitro</i> après 3 mois de culture (issus de 2 fruits)	27 (84)	—	30 (83)	—	—
Nombre de plants <i>in vitro</i> après 6 mois de culture (issus de 2 fruits)	20 (62,5)	—	25 (70)	—	—

Tableau II. Effet de la dose d'irradiation du pollen de melon du génotype Védrantais sur le rendement en embryons après autofécondation (exprimé en nombre). Expérimentation réalisée durant les mois de juin et de juillet 1990. Le chiffre entre parenthèses représente le pourcentage d'individus obtenus.

	Dose (kGy)				
	0,15	0,5	1,6	2,5	3,6
Nombre de fleurs pollinisées	5	3	4	5	5
Nombre de fruits noués	4	3	4	3	1
Nombre total d'embryons globulaires	3 (0,1)	12 (0,6)	20 (0,6)	19 (0,65)	0
Nombre total d'embryons cotylédonnaires	31 (1,2)	29 (1,4)	43 (1,3)	25 (1)	0

melon (Brun, 1990); on notera que le meilleur rendement en embryons par fleur pollinisée est obtenu pour le génotype F₁G₁, après irradiation du pollen à la dose de 1,6 kGy; 2) pour les deux génotypes, les rendements en embryons globulaires sont toujours 2 à 3 fois plus faibles que ceux en embryons cotylédonnaires; 3) pour le

génotype Védrantais, le seul testé, on constate un effet très net de la saison sur le rendement en embryons en fonction de la dose d'irradiation appliquée au pollen; en effet, lors de l'expérimentation de juin–juillet 1990 (tableau II), les rendements les plus élevés sont obtenus aux fortes doses d'irradiation (0,5 et 1,6 kGy); à l'op-

Tableau III. Effet de la dose d'irradiation du pollen de melon du géotype Védrantais sur le rendement en embryons et en plants *in vitro* après autofécondation (exprimé en nombre). Expérimentation réalisée durant les mois de septembre et octobre 1989. Le chiffre entre parenthèses représente le pourcentage d'individus obtenus.

	Dose (kGy)			
	0,15	0,5	1,6	3,6
Nombre de fleurs pollinisées	6	20	10	4
Nombre de fruits noués	5	14	7	0
Nombre total d'embryons globulaires	72 (1,9)	26 (0,25)	16 (0,3)	—
Nombre de plants <i>in vitro</i> après 3 mois de culture (issus de tous les fruits noués)	0	7 (27)	5 (31)	—
Nombre de plants <i>in vitro</i> après 6 mois de culture (issus de tous les fruits noués)	0	3 (12)	2 (12,5)	—
Nombre total d'embryons cotylédonnaires	66 (1,7)	85 (0,85)	23 (0,6)	—
Nombre de plants <i>in vitro</i> (issus de tous les fruits noués)	34 (52)	69 (81)	18 (78)	—
Nombre de plants <i>in vitro</i> après 6 mois de culture (issus de tous les fruits noués)	22 (33)	47 (55)	12 (52)	—

posé, lors de l'expérimentation d'automne 1989 (tableau III) l'irradiation à faible dose (0,15 kGy) fournit les meilleurs rendements. De toute façon, les rendements les plus élevés sont toujours obtenus en début d'été.

Chez les autres espèces végétales, où des croisements intra- et interspécifiques ont été réalisés avec du pollen irradié, la production d'embryons après irradiation à forte dose n'a jamais été signalée à notre connaissance. Les rendements en embryons haploïdes parthénogénétiques, cités dans la bibliographie, sont généralement très faibles et n'atteignent que très rarement les 3,4% obtenus chez le melon (Doré, 1989; Raquin, 1985; Rode et Dumas de Vault, 1987). Le melon présente donc un comportement relativement original vis-à-vis de l'irradiation du pollen; cela pourrait être la conséquence d'une radiorésistance pollinique élevée, $DL_{50} = 3$ kGy (Cuny et Roudot, 1991).

Rendement de l'haplométhode mesurée en nombre de plants *in vitro* viables

Généralement, le taux de reprise de croissance des embryons globulaires est très faible : dans

le meilleur des cas, 29% des embryons évoluent en plantules. Par contre, la reprise de croissance des embryons cotylédonnaires, est nettement plus élevée : 70% des embryons cotylédonnaires du géotype F_1G_1 (tableau I) et 55% de Védrantais (tableau III) donnent des plantules. Pour ce dernier, les conditions automnales de l'expérimentation peuvent être la cause de la reprise de croissance plus faible des embryons. De nombreux plants *in vitro* sont anormaux. Ils sont caractérisés par une absence de système caulinaire alors que le système racinaire ainsi que l'hypocotyle se développent normalement. Après environ 3 mois de culture *in vitro*, la majorité de ces plantules anormales dégénèrent, ce qui conduit à une perte importante de matériel. Parfois la stimulation de l'apex caulinaire par des gibbérellines permet le développement d'une plantule tout à fait normale. Après 6 mois de culture *in vitro*, seules les plantules présentant un développement normal sont conservées (tableaux I et III).

Les avortements, les problèmes de germination des embryons et de croissance des plantules peuvent résulter de la présence de gènes récessifs délétères qui s'expriment du fait de l'état haploïde du matériel végétal.

Contrairement à notre attente, les plus faibles rendements en plants sont obtenus à faible dose d'irradiation (tableaux I et III). Cette situation paradoxale et inattendue a déjà été évoquée chez de nombreuses autres espèces végétales. Par exemple, chez le pommier, les haploïdes parthénogénétiques obtenus après irradiation du pollen à 0,125 kGy ne sont pas viables, alors qu'ils le sont aux doses plus élevées, 0,5 kGy (Zhang et Lespinasse, 1991). De même, chez le maïs, les effets de l'irradiation du pollen (stérilité, nombre de grains par épis...) apparaissent plus prononcés à 0,1 kGy qu'à 0,2 kGy (Sari Gorla *et al*, 1987). Pandey et Phung (1982) expliquent ces résultats par le fait que vraisemblablement les faibles doses d'irradiation n'altèrent que très peu le système nucléaire du pollen, qui conserve ainsi certaines potentialités fécondantes. Il en résulte la formation d'hybrides plus ou moins stériles, d'aneuploïdes et d'haploïdes. L'apparition des phénotypes anormaux et les stérilités sont principalement la conséquence de l'état aneuploïde instauré et des réarrangements chromosomiques qui en résultent (Snape *et al*, 1983). Les fortes doses d'irradiation, beaucoup plus drastiques, altèrent fortement le système nucléaire pollinique et conduisent à la formation d'un seul type de pollen non fécondant mais inducteur d'haploïdes ou de diploïdes, par parthénogenèse *in situ*.

Niveau de ploïdie des plantes

L'examen cytologique réalisé sur les pointes de racines après coloration par la technique de Feulgen révèle la présence de nombreuses racines mixoploïdes (n , $2n$, $4n$). Du fait de la difficulté à dénombrer les cellules haploïdes par rapport aux autres cellules sur les préparations racinaires, nous n'avons souvent pas pu conclure en ce qui concerne le niveau de ploïdie de certains clones.

L'analyse en cytométrie en flux des feuilles des plants *in vitro*, permet la détermination rapide et précise du niveau de ploïdie du clone testé. Cette technique est basée sur la mesure de la teneur en ADN des noyaux interphasiques. Du fait de la forte corrélation qui existe entre le niveau de ploïdie déterminé par la cytométrie en flux et le nombre chromosomique, les haploïdes peuvent être facilement détectés (Fahleson *et al*, 1988). En calibrant l'échelle de fluorescence rouge au moyen d'échantillons de niveaux de ploïdie connus (plantules diploïdes), le niveau de

ploïdie des échantillons peut être déterminé par comparaison.

La présence simultanée de pics 2C, 4C, 8C sur un même histogramme obtenu à partir d'une même feuille révèle l'état mixoploïde stable du melon (fig 1a). Pour la détermination du niveau de ploïdie, seul le premier pic est retenu, et cela quelle que soit son amplitude. On pose l'hypothèse que le premier pic reflète le niveau de ploïdie germinale. La présence de mixoploïdie exclut la possibilité de déterminer les proportions exactes de cellules dans chaque niveau de ploïdie, pour deux raisons :

- le second pic contient à la fois les cellules haploïdes en phase G_2/M c'est-à-dire en division et les cellules diploïdes en phase G_0/G_1 ;
- le second pic peut contenir de 0 à 3% de doublés de cellules en G_0/G_1 et ainsi de suite (en proportions respectives) pour les zones 4C, 8C...

Chez le génotype F_1G_1 , toutes les plantes obtenues à partir de pollen irradié aussi bien à faible dose (0,15 kGy) qu'à fortes doses (0,5, 1,6 et 2,5 kGy) présentent un spectre de type haploïde (fig 1b). Ce résultat est confirmé par la présence de fleurs de petite taille et stériles. La disjonction des gènes marqueurs (tableau IV) est conforme à celle attendue (proportions 1:1).

Chez Védrantais, quatre plantules étaient diploïdes. Trois plantules correspondaient à la dose de 0,15 kGy et une à la dose de 0,5 kGy.

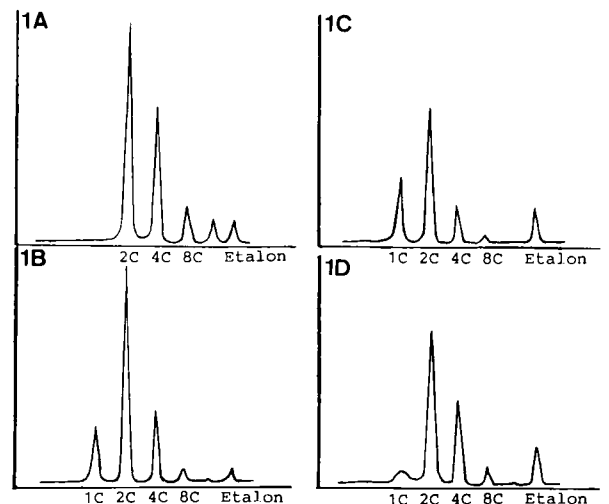


Fig 1. Histogramme d'ADN nucléaires obtenus en cytométrie en flux à partir de noyaux isolés de feuilles de melon. A : feuille de plant *in vitro*, témoin diploïde. B : feuille de plant *in vitro* haploïde. C : jeune feuille de plant cultivé en serre. D : feuille adulte de plant cultivé en serre. En abscisse : intensité de fluorescence de l'iodure de propidium (nous utilisons une échelle logarithmique, chaque doublement du génome apparaît ainsi à intervalle constant); en ordonnée : fréquence relative d'apparition des noyaux dans leur classe.

Tableau IV. Répartition des gènes marqueurs dans la population d'haploïdes (F_2G_1) issue de F_1G_1 fécondée par du pollen irradié à 0,15 et 1,6 kGy.

Marqueur nucléaire	Pollen non irradié (disjonction théorique)	Pollen irradié		χ^2 (valeur probabilité)	
		gl-	gl+		
Glabre	1 : 1	21	29	1,3	0,25
Yellow-green	1 : 1	10	19	2,8	0,09

Du fait de l'absence de marqueurs génétiques, il est impossible de conclure quant à leur origine. Quatre hypothèses peuvent être émises : 1) la dose de 0,15 kGy est insuffisante pour éliminer totalement le pouvoir fécondant du pollen; 2) des contaminations par du pollen non irradié ont lieu durant la castration des fleurs; 3) il existe des doublements spontanés du stock chromosomique haploïde chez certains génotypes (Zhang et Lespinasse, 1991); chez le kiwi, par exemple (Pandey *et al*, 1990), la capacité de production d'embryons diploïdes parthénogénétiques est très variables en fonction à la fois du génotype paternel et du génotype maternel; 4) des gamétophytes diploïdes issus de cellules mères non réduites à la méiose peuvent être présents.

Sur l'ensemble des plantes analysées (150), aucun aneuploïde n'a été détecté dans nos conditions expérimentales. Nous avons considéré qu'une plantule est aneuploïde lorsque la position du pic de fluorescence correspondant à la quantité 2C d'ADN est éloignée par plus de 3 canaux du pic diploïde témoin. Cet intervalle de confiance a été défini en déterminant les déviations de 3 plantes témoins diploïdes, après normalisation des fluorescences au moyen de l'étalon interne. Le logiciel de cytométrie en flux (*Flower version 3.41*) convertit sur une échelle linéaire (0 à 255 canaux) la position de chaque pic de fluorescence et fournit le numéro du canal correspondant au maximum d'événements. Avec 3 canaux correspondant à 1,3 déviations standard, cet intervalle de confiance équivaut à 8% du génome 2C ($2n = 2x = 24$). Des anomalies à ± 2 chromosomes peuvent être ainsi mises en évidence chez le melon. Le coefficient de variation des pics G_0/G_1 est de 1. De nombreux auteurs constatent la présence d'aneuploïdes à la suite de croisements avec du pollen irradié (Ivanov, 1938; Brewbaker et Emery, 1962; Snape *et al*, 1983; Shintaku *et al*, 1988). Pandey et Phung

(1982), par exemple, ont obtenu des aneuploïdes de *Nicotiana* comportant 24 + 1 à 24 + 11 chromosomes.

Chez les plantes en culture *in vitro*, le niveau de ploïdie est stable au cours du temps. Les analyses ont été effectuées sur une période d'une année avec 2 à 4 répétitions échelonnées au cours du temps.

Quatorze plantes ont été analysées après leur transfert en terre. On constate que seules les jeunes feuilles présentent des histogrammes avec un pic haploïde important (fig 1c), comparable à celui obtenu à partir d'un plant *in vitro* (fig 1b). Dans le cas des feuilles adultes, on obtient des histogrammes avec un pic haploïde nettement minoritaire (fig 1d). Il semblerait qu'au cours du vieillissement de la feuille, la majorité des cellules doublent spontanément leur stock chromosomique. Cependant, les cellules germinales conservent toujours leur état haploïde et les fleurs formées sont toujours stériles. Il convient donc d'être relativement prudent quant au choix du matériel utilisé pour l'analyse en cytométrie en flux. Les plantes *in vitro* ou les jeunes feuilles de jeunes plantes cultivées en pots semblent constituer le matériel le mieux approprié pour une étude du niveau de ploïdie en cytométrie en flux. Cette technique permet ainsi un tri précoce des plantules.

CONCLUSION

Chez le melon, l'irradiation du pollen (1,6 kGy) permet la production d'embryons parthénogénétiques (3,4%) et de plantes haploïdes (2,4%) avec des rendements particulièrement élevés. À partir de 0,15 kGy, le développement parthénocarpique des fruits est observé. Mais, contrairement à ce qui est fréquemment constaté chez la majorité des espèces végétales, l'irradiation du

pollen de melon ne semble pas induire l'apparition d'hybrides à phénotypes anormaux ou stériles (mutation, aneuploïdie). La réponse à l'irradiation est relativement semblable, quelle que soit la dose appliquée au pollen (entre 0,15 et 2,5 kGy). Seules les fortes doses (supérieures à 1,6 kGy) semblent affecter la nouaison des fleurs pollinisées avec du pollen irradié. Le niveau de ploïdie des plantules est déterminé à partir d'une part de l'observation de la stérilité-fertilité des plantes, et d'autre part des résultats de la cytométrie en flux. Vu que, dès la mise en terre de plants, le niveau de ploïdie du système foliaire évolue rapidement, toute analyse en cytométrie en flux nécessite un choix judicieux et réfléchi de l'organe végétal à analyser : de préférence une très jeune feuille.

REMERCIEMENT

Les auteurs remercient M Grotte de son aide pour l'analyse des résultats.

RÉFÉRENCES

- Brewbaker JL, Emery GC (1962) Pollen radiobotany. *Radiat Bot* 1, 101-154
- Brown SC, Devaux P, Marie D, Bergounioux C, Petit PX (1991) Analyse de la ploïdie par cytométrie en flux. *Biofutur* 105, 5-16
- Brun P (1990) Étude de l'effet génotype sur l'obtention d'haploïdes par parthénogenèse induite par du pollen irradié chez le melon *Cucumis melo* L et recherche préliminaire d'une alternative à l'irradiation. Mémoire DEA Nancy, 29 p
- Cuny F, Roudot AC (1991) Germination et croissance pollinique *in vitro* du pollen de melon (*Cucumis melo* L) après irradiations gamma. *Environ Exp Bot* 31, 277-283
- Daskalov S (1984) Pollen irradiation and gene transfer in *Capsicum*. *Theor Appl Genet* 68, 135-138
- Dumas de Vaulx R (1970) Mise au point d'une méthode de dénombrement des chromosomes chez le melon (*Cucumis melo* L). *Ann Amélior Plant* 20, 375-378
- De Laat AMM, Göhde W, Vogelzang MJDC (1987) Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. *Plant Breed* 99, 303-307
- Doré C (1989) Obtention de plantes haploïdes de chou cabus (*Brassica oleracea* L ssp *capitata*) après culture *in vitro* d'ovules pollinisés par du pollen irradié. *C R Acad Sci Paris* 309, 729-734
- Engvild KC (1985) Pollen irradiation and possible gene transfer in *Nicotiana* species. *Theor Appl Genet* 69, 457-461
- Fahleson J, Dixelius J, Sundberg E, Glimelius K (1988) Correlation between flow cytometric determination of nuclear DNA content and chromosome number in somatic hybrids within Brassicaceae. *Plant Cell Rep* 7, 74-77
- Ivanov MA (1938) Experimental production of haploids in *Nicotiana rustica* L. *Genetica* 20, 295-386
- Pandey KK, Phung M (1982) "Hertwig effect" in plants: induced parthenogenesis through the use of irradiated pollen. *Theor Appl Genet* 62, 295-300
- Pandey KK, Przywara L, Sanders PM (1990) Induced parthenogenesis in kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*) through the use of lethally irradiated pollen. *Euphytica* 51, 1-9
- Powell W, Caligari PDS, Hayter AM (1983) The use of pollen irradiation in barley breeding. *Theor Appl Genet* 65, 73-76
- Raquin C (1985) Étude des conditions d'obtention de pétunias haploïdes gynogénétiques par culture *in vitro* d'ovaires de plantes pollinisées par du pollen irradié. In: *Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement*. IAEA, Vienne (IAEA-SM 282/13), 207-211
- Rode JC, Dumas de Vaulx R (1987) Obtention de plantes haploïdes de carotte (*Daucus carota* L) issues de parthénogenèse induite *in situ* par du pollen irradié et culture *in vitro* de graines immatures. *C R Acad Sci Paris* 305, 225-229
- Sanford JC, Chyi YS, Reisch B (1984) Attempted "egg transformation" in *Zea mays* L, using irradiated pollen. *Theor Appl Genet* 68, 269-275
- Sari Gorla M, Villa M, Ottaviano E (1987) Pollen irradiation and gene transfer in maize. *Maydica* 32, 239-248
- Sauton A, Dumas de Vaulx R (1987) Obtention de plantes haploïdes chez le melon (*Cucumis melo* L) par gynogénèse induite par pollen irradié. *Agronomie* 7, 141-148
- Shintaku Y, Yamamoto K, Nakajima T (1988) Interspecific hybridization between *Nicotiana repanda* Willd and *N tabacum* L through the pollen irradiation technique and the egg cell irradiation technique. *Theor Appl Genet* 76, 293-298
- Snape JW, Parker BB, Simpson E, Ainsworth CC, Law CN (1983) The use of irradiated pollen for differential gene transfer in wheat (*Triticum aestivum*). *Theor Appl Genet* 65, 103-111
- Zamir D (1983) Pollen irradiation in tomato: minor effects on enzymic gene transfer. *Theor Appl Genet* 66, 147-151
- Zhang YX, Lespinasse Y (1991) Pollination with gamma-irradiated pollen and development of fruits, seeds and parthenogenetic plants in apple. *Euphytica* 54, 101-109