

Une comparaison entre 2 méthodes d'haplodiploïdisation chez le blé tendre : l'androgenèse *in vitro* et le croisement interspécifique avec le maïs

FX Oury*, M Pichon, M Rousset

avec la collaboration technique de J Gourdon et F Lagoutte

INRA, station d'amélioration des plantes, domaine de Crouelle, 63039 Clermont-Ferrand Cedex, France

(Reçu le 13 juillet 1992; accepté le 30 novembre 1992)

Résumé — Deux méthodes d'haplodiploïdisation, l'androgenèse *in vitro* et le croisement interspécifique avec le maïs, ont été appliquées à 60 plantes F₁ correspondant à 5 croisements, et 109 plantes F₃ correspondant à 6 croisements. Les productions de plantes vertes (PV) par épi travaillé sont du même ordre de grandeur pour les 2 méthodes : 0,71 pour l'androgenèse et 1,21 pour le croisement entre blé et maïs. Cependant, les 2 processus d'haplodiploïdisation apparaissent très différents : l'androgenèse se caractérise par une production élevée d'embryons par épi, mais une mauvaise régénération de ces embryons, alors que le croisement entre blé et maïs produit peu d'embryons par épi, mais avec un bon développement de ceux-ci en plantes. L'effet du génotype apparaît marqué pour les 2 méthodes, mais avec une certaine complémentarité : les résultats obtenus en androgenèse et en croisement interspécifique avec le maïs ne sont pas corrélés, et des génotypes répondant mal avec une des méthodes peuvent donner de bons résultats avec l'autre, ce qui présente un intérêt pour l'utilisation de l'haplodiploïdisation en sélection. Par ailleurs, les temps de travail nécessaires à la production d'un haploïde doublé (HD) apparaissent équivalents pour les 2 méthodes.

androgenèse / croisement interspécifique / haploïde-doublé

Summary — A comparison of 2 haplodiploidization methods in bread wheat: anther culture and interspecific hybridization in maize. The production in green plants per ear, from 60 F₁ plants corresponding to 5 crosses and 109 F₃ plants corresponding to 6 crosses (table I), appeared similar for *in vitro* androgenesis and hybridization between wheat and maize. However, these 2 haplodiploidization processes were rather different: the production of embryos per ear was higher with androgenesis, but the regeneration was better with interspecific hybridization (fig 1, table I). There was a marked genotypic effect for the 2 methods, but the results obtained with androgenesis and crosses between wheat and maize were not correlated: some genotypes which had poor results with one of the methods provided good results with the other method, which is of interest for the introduction of haplodiploidization in breeding schemes. The work required to obtain a doubled-haploid line was equivalent for the 2 methods.

androgenesis / interspecific hybridization / doubled haploid line

* Correspondance et tirés à part

INTRODUCTION

L'introduction de l'haplodiploïdisation en sélection présente de nombreux avantages (Foroughi-Wehr et Wenzel, 1990), particulièrement dans le cas de la sélection récurrente, où l'obtention d'haploïdes doublés (HD) à partir de la population n permet de travailler sur du matériel fixé, et ainsi de sélectionner plus efficacement les génotypes à intercroiser pour produire la population $n + 1$. Cependant, pour que l'utilisation de l'haplodiploïdisation n'introduise pas de biais en sélection, il faut que tous les génotypes puissent donner une descendance HD, afin de garantir une bonne exploitation de la variabilité génétique. Par exemple, dans le cas de la sélection récurrente, Gallais (1988 et 1989) a montré qu'un schéma particulièrement intéressant consisterait à produire un HD par plante de la population, puis à intercroiser les meilleurs HD pour constituer la population du cycle suivant.

L'androgenèse est depuis longtemps la méthode la plus utilisée pour obtenir des HD chez le blé tendre. En effet, les gènes *Kr1* et *Kr2* sont très fréquents chez les blés européens (Stefanowska et Cauderon, 1983; Zeven, 1987), et les incompatibilités de fécondation qu'ils induisent empêchent d'utiliser le croisement interspécifique avec *Hordeum bulbosum* pour produire des HD (Snape *et al*, 1979). De plus, l'amélioration progressive des techniques, aussi bien au niveau de la culture des plantes donneuses qu'au niveau des étapes d'embryogenèse et de régénération (Chuang *et al*, 1978; Zhuang et Xu, 1983; Zhang *et al*, 1987), a permis d'augmenter de manière importante le nombre d'haploïdes produits par culture d'anthers *in vitro*. Cependant, malgré les progrès réalisés en androgenèse, il n'a pas été possible de s'affranchir complètement du problème des génotypes répondant mal à la méthode (Yuan *et al*, 1990; Pauk *et al*, 1991), ce qui rend toujours délicate l'utilisation de cette technique d'haplodiploïdisation en sélection.

Récemment, les travaux de Laurie et Bennett (1988) ont fait apparaître une autre manière de produire des HD chez le blé, par croisement interspécifique avec le maïs. Contrairement à ce qui se passe avec *Hordeum bulbosum*, les résultats obtenus par cette méthode ne sont pas influencés par la présence des gènes *Kr1* et *Kr2* (Laurie et Bennett, 1987; Inagaki et Tahir, 1990). De plus, des résultats récents (Laurie et Snape, 1990) ont déjà montré que, de même que pour l'androgenèse (De Buyser *et al*, 1985; Baenziger

et al, 1989), les variations gamétoclonales et les problèmes d'aneuploïdie introduits par le croisement entre blé et maïs ne présentent pas un caractère rédhibitoire pour une utilisation de cette méthode en sélection. Il était alors intéressant de voir si l'utilisation conjointe de l'androgenèse *in vitro* et de ce type de croisement interspécifique pouvait faciliter l'introduction de l'haplodiploïdisation dans les schémas de sélection, en réduisant les biais au niveau des productions d'HD par les différents génotypes.

Dans cet article, nous comparons la production d'HD par androgenèse *in vitro* et par croisement interspécifique avec le maïs, sur un échantillon de plantes donneuses représentant une large gamme de variabilité génétique. Notre but était d'une part de voir s'il existait un effet du génotype de blé sur l'obtention d'HD par croisement avec le maïs; et d'autre part de voir si les génotypes récalcitrants à l'androgenèse pouvaient donner des réponses favorables par croisement interspécifique avec le maïs.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Les expérimentations ont été réalisées en 1990 et 1991, sur des plantes donneuses correspondant à des F1 ou des F3 issues de différents croisements (l'haplodiploïdisation a donc porté soit sur des gamètes F2, soit sur des gamètes F4). Les génotypes impliqués dans ces croisements ont tous été choisis pour leur bonne valeur agronomique et technologique, et correspondaient soit à des lignées obtenues dans différents laboratoires d'amélioration des plantes de l'INRA (Clermont-Ferrand, Dijon, Le Moulon et Montpellier) ou à l'Université Californienne de Davis, soit à des variétés inscrites au catalogue (tableau I). Compte tenu de leur origine diversifiée, ces génotypes représentaient une gamme de variabilité génétique importante.

Les plantes donneuses ont d'abord été semées au champ début novembre, puis repiquées en pleine terre dans une serre climatisée, après vernalisation naturelle. À l'intérieur de cette serre, la température était de $19\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$, l'hygrométrie fluctuait entre 40 et 80%, et un éclairage d'appoint réalisé avec des lampes de 400 W à vapeur de sodium haute pression (puissance installée : 165 W/m^2) permettait d'assurer une photopériode de 16 h. Les repiquages ont été étalés dans le temps (du 15 janvier au 15 mars), afin d'éviter de trop fortes pointes de travail au niveau des différentes opérations d'haplodiploïdisation. Les plantes donneuses ont reçu une protection efficace contre l'oïdium (un traitement tous les 15 j) et les insectes (en particulier les pucerons, contre lesquels un

Tableau I. Origine des plantes donneuses (le niveau de génération des parents impliqués dans les différents croisements est donné entre parenthèses), et résultats moyens obtenus pour l'androgénèse (A) et pour le croisement interspécifique (CI). PV : plantes vertes.

Origine des plantes donneuses	Nombre d'épis travaillés		Embryons/épi		PV/embryon		PV/épi		Plantes donnant au moins 1 PV (%)	
	A	CI ^a	A	CI	A	CI	A	CI	A	CI
F1 C9659/C8188 (F5) (F7)	39	13	23,5	4,8	0,09	0,43	2,03	2,08	92	85
F1 C9660/DI9801 (F5) (F9)	48	17	8,5	4,8	0,14	0,48	1,19	2,29	69	87
F1 C9669/C5108 (F5) (F10)	30	10	11,1	0,4	0,07	0,5	0,73	0,20	60	20
F1 C9669/C7128 (F5) (F6)	33	11	20,5	2,2	0,13	0,62	2,70	1,36	91	54
F3 C3668/Aristide (F8) (>F12)	39	17	1,4	1,1	0	0,21	0	0,23	0	23
F3 C2414/Tarasque //C3175/Hermes (F9) (>F12) // (F8) (>F12)	34	14	7,9	2,1	0,02	0,67	0,15	1,43	7	50
F3 D36288/C4188 (F10) (F8)	56	20	2,9	0,4	0,02	0,37	0,07	0,15	20	15
F3 D36288/C1065 (F10) (F10)	47	17	3,9	0,8	0,15	0,21	0,6	0,18	35	12
F3 M16/Martial (F7) (>F12)	75	26	7,6	3,1	0,04	0,91	0,32	2,81	48	64
F3 M209/M47 // Récital (F9) (F7) // (>F12)	48	16	4,8	1,1	0,09	0,56	0,42	0,62	44	44
F1 C7348/GM812 (F5) (F8)	30	10	14,5	1,2	0,02	0,92	0,33	1,10	50	60
Total	479	171	8,8	2,1	0,08	0,59	0,71	1,21	44	46
χ^2 a			86,3***	58,4***	49,5***	23,9**	66,8***	54,5***		
(ddl)			(11)	(11)	(11)	(10)	(11)	(11)		

* Ces valeurs correspondent aussi au nombre de plantes donneuses (sauf pour C9660/DI9801 et M16/Martial, pour lesquels une des plantes donneuses a eu 2 épis travaillés par croisement interspécifique); ** significatif au seuil de 1%; *** significatif au seuil de 1%; ^a résultats du test de Kruskal-Wallis pour l'effet du croisement.

traitement était réalisé chaque semaine), et ont bénéficié d'une fertilisation N-P-K appropriée.

Androgénèse

Les épis ont été prélevés, à raison de 3 par plante donneuse, lorsqu'ils occupaient entre deux tiers et

trois quarts de leur gaine foliaire. Ce stade phénologique sert de référence, en l'absence de vérification cytologique, car il correspond grossièrement au stade «uninucléé intermédiaire» pour les microspores. Les épis ont ensuite été placés à 4 °C pendant 5 à 10 j.

Les anthères des 3 épis ont été mises en culture sur le milieu embryogène à base d'extrait de pomme de terre décrit par Chuang *et al* (1978). Les embryons

obtenus entre la 3^e et la 6^e semaine d'incubation à 27 °C et à l'obscurité, ont été repiqués sur milieu de régénération 190-2 (Zhuang et Xu, 1983). La composition de ces milieux embryogène et de régénération était strictement la même que celle donnée dans les publications de référence. Les boîtes de Pétri contenant les embryons ont été placées dans une chambre d'incubation à 22 °C, d'abord à l'obscurité pendant 3 j, et ensuite en lumière forte (éclairage fourni par des tubes de type *cool white* donnant une radiation photosynthétiquement active – PAR – de 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, avec une photopériode de 12 h). Après 3–8 semaines, les jeunes plantes vertes obtenues ont été transférées dans des tubes contenant du milieu B5 (Gamborg *et al*, 1968) sans substance de croissance. Lorsque ces plantes vertes atteignaient un développement suffisant (bon enracinement et extrémités des feuilles atteignant le bouchon du tube), elles ont été repiquées en serre, dans des pots individuels contenant du terreau. Le traitement à la colchicine a été effectué 2–3 semaines plus tard et pour toutes les plantes, car aucune détermination du niveau de ploïdie n'a été faite. Ce traitement a été réalisé par immersion des racines jusqu'au plateau de tallage, pendant 5 h, dans une solution à 1 g/l. Enfin, après 10 j de récupération, les plantes ont été vernalisées.

Croisement interspécifique

Sur chacune des plantes donneuses utilisées pour l'androgenèse, un épi a été castré approximativement 3 j avant l'anthèse, et recouvert par un sac en plastique permettant le maintien d'une hygrométrie de 100% autour de l'épi. La pollinisation a été réalisée 3 j après la castration, avec un mélange de pollen recueilli sur plusieurs pieds de maïs présents à ce moment-là dans les serres de la station (ces différents génotypes de maïs comprenaient aussi bien des lignées que des hybrides). Il faut noter que pour les plantes donneuses d'un même croisement, les pollinisations ont été effectuées le même jour, donc avec le même mélange de pollen. Les résultats intracroisements ne sont donc pas biaisés par un effet du génotype de maïs.

Les techniques appliquées ensuite ont été celles proposées par Suenaga et Nakajima (1989): une injection de 2-4D (solution à 100 mg/l) permettant de remplir la cavité de la tige située au-dessus du dernier entre-nœud (dose injectée: 0,3 à 0,5 ml), juste après la pollinisation; et une pulvérisation d'acide gibbérellique (solution à 75 mg/l) sur l'épi le lendemain. Après cette pulvérisation, le sac en plastique entourant l'épi était remplacé par un sac en papier sulfurisé, pour éviter que le maintien trop prolongé de l'épi en situation d'humidité saturante ne provoque le développement de maladies (en particulier la fusariose).

Les épis ont été prélevés et les embryons ont été isolés des caryopses sous la loupe binoculaire, 21 j après la pollinisation. Les embryons ont été placés sur milieu 190-2 (Zhuang et Xu, 1983), les étapes étant à partir de ce moment-là identiques à celles utilisées pour l'androgenèse.

Pour les 2 méthodes (androgenèse et croisement interspécifique), les plantes vertes (PV) ayant franchi toutes les étapes jusqu'à la vernalisation ont été comptabilisées en tant que produit du processus d'haplodiploïdisation. Les nombres obtenus reflètent bien le résultat de la culture *in vitro*, car les taux de mortalité au niveau du repiquage des plantes en serre et du traitement à la colchicine sont négligeables. Cependant, ils surestiment la production finale d'HD, car s'il n'y a pas de problème de survie des plantes pendant la vernalisation, en revanche certaines plantes ne donnent pas de grains. Pour expliquer cette absence de descendance, on peut évoquer:

- un échec du doublement à la colchicine;
- une stérilité due à des problèmes d'aneuploïdie;
- le fait que ces plantes sont cultivées en période de jours décroissants, donc dans des conditions défavorables qui rendraient stériles certaines plantes fragilisées par les étapes antérieures (en particulier le traitement à la colchicine et la vernalisation).

Par ailleurs, différents temps de travail ont été comptabilisés, afin de pouvoir comparer les exigences en main-d'œuvre des 2 processus d'haplodiploïdisation. Ils concernaient les opérations caractéristiques de chacune des méthodes (prélèvement des épis, mise en culture des anthères et repiquage des embryons pour l'androgenèse; castration, pollinisation, injection de 2-4 D et dissection des épis pour le croisement interspécifique). Ces temps ne correspondent donc pas à la totalité du travail nécessaire pour produire un HD.

La gestion des données et les différents traitements graphiques et statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel «S» (Becker *et al*, 1988), sur un serveur SUN4-330 sous système d'exploitation UNIX.

Au niveau des graphiques, nous avons réalisé des *boxplots* (ou «boîtes à pattes»), qui permettent une représentation des données par rapport aux quartiles de la distribution et à l'écart inter-quartile (écart entre les valeurs des 1^{er} et 3^e quartiles). La base et le sommet de la «boîte» correspondent aux 1^{er} et 3^e quartiles (la largeur de la «boîte» est, elle, proportionnelle à l'effectif étudié), et le trait intermédiaire correspond à la valeur de la médiane. Les «pattes» sont tracées en reportant 1,5 fois l'écart inter-quartile de part et d'autre de la base et du sommet de la boîte, et en ramenant l'extrémité de chaque «patte» au point de la distribution le plus proche inclu dans l'intervalle. Les points qui sortent de l'intervalle sont figurés individuellement par des étoiles.

Les données ayant en général des distributions éloignées d'une distribution Gaussienne (fig 1), nous avons utilisé des tests non paramétriques.

RÉSULTATS

Cette expérimentation a conduit, à partir d'un travail sur 169 plantes donneuses (479 épis pour

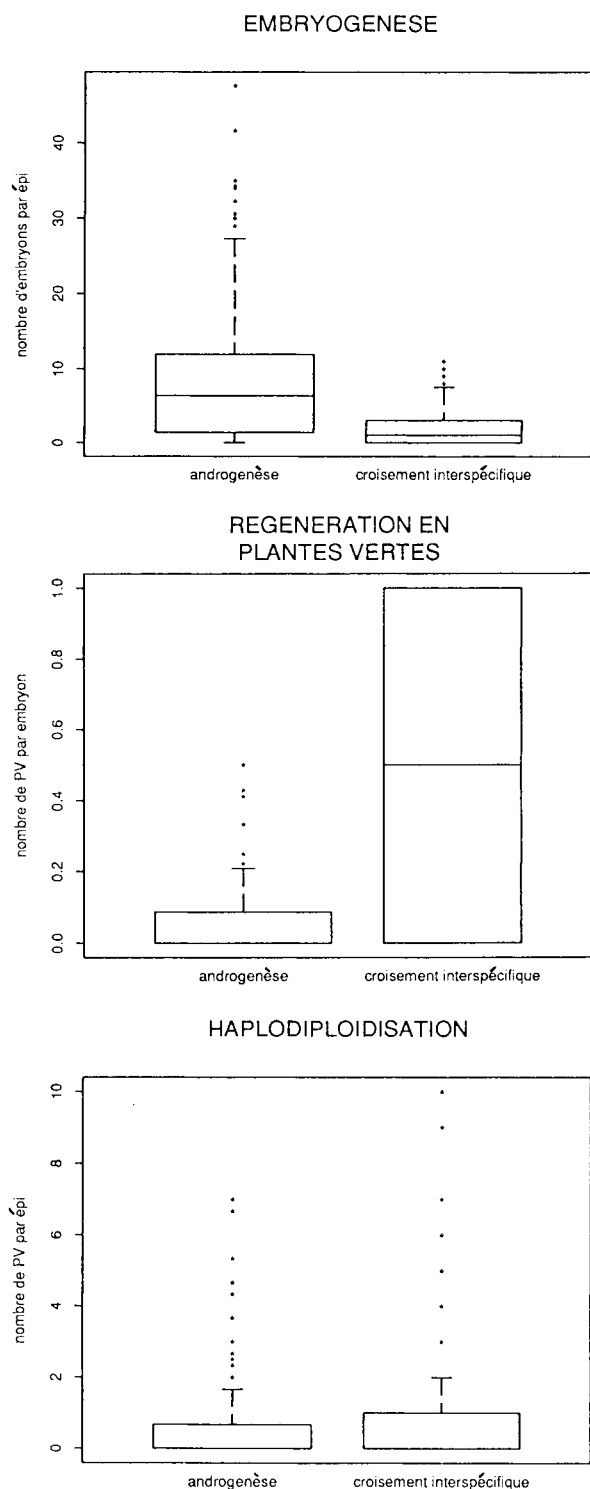


Fig 1. Distributions des différentes variables caractérisant les 2 processus d'haplodiploïdisation (représentation, sous forme de *box-plots*, des valeurs obtenues sur les 169 plantes donneuses). PV : plantes vertes.

l'androgénèse, 171 épis pour le croisement interspécifique), à l'obtention de 545 PV. Seulement 427 de ces 545 PV ont donné une descendance, dont 264 (78%) des 338 PV obtenues par culture

d'anthères, et 163 (79%) des 207 PV obtenues par croisement entre blé et maïs.

Bien qu'aucun contrôle cytologique n'ait été effectué, ces 427 plantes avaient bien un comportement d'HD : d'une part elles présentaient à la fois des talles stériles (correspondant à des secteurs de la plante restés haploïdes) et des talles fertiles (pour lesquelles le doublement avait réussi); d'autre part, les descendances des PV produites en 1990 (180 par androgénèse et 49 par croisement interspécifique) ont été évaluées en pépinière pendant la campagne 1991-92, et elles correspondaient bien à du matériel fixé. Dans la suite de l'article, nous conserverons néanmoins le terme PV (au lieu de HD), car en l'absence de contrôle du niveau de ploïdie, nous ne pouvons totalement exclure le cas de plantes vertes obtenues à partir de cellules diploïdes (par exemple des gamètes non réduits).

Pour les 2 méthodes d'haplodiploïdisation, le rapport PV/épi apparaît très variable pour les plantes donneuses d'un même croisement (fig 2). Cette variabilité intracroisement existe aussi bien pour les plantes donneuses en F3 que pour celles en F1. Pour ces dernières, on ne peut pas expliquer la différence de réponse par un effet du génotype : en effet, si chaque gamète F2 a des potentialités différentes, par contre le nombre de ces gamètes est suffisamment important (surtout dans le cas de l'androgénèse) pour que les résultats obtenus à partir de chaque plante donneuse F1 aient la même espérance mathématique. On peut noter (tableau I) que les 5 croisements à l'origine des plantes donneuses F1 font intervenir un parent F5, fixé donc à 96,87%. Bien que l'hétérozygotie résiduelle puisse jouer un rôle dans les fluctuations du nombre de PV obtenues par épi, elle nous paraît cependant trop faible pour les expliquer à elle seule. On doit donc admettre que ces fluctuations sont dues, pour une part importante, aux techniques mises en œuvre. On peut par exemple évoquer des différences de vigueur des plantes donneuses (en relation avec une fluctuation des conditions micro-environnementales); ou une hétérogénéité, aussi bien au niveau des stades de prélèvement des épis pour l'androgénèse (ces prélèvements ont été réalisés sans contrôle cytologique), qu'au niveau des stades auxquels ont été effectuées les castrations et pollinisations pour le croisement interspécifique.

Compte tenu de cette variabilité des résultats pour les plantes donneuses F1, nous avons préféré travailler sur les valeurs moyennes obtenues

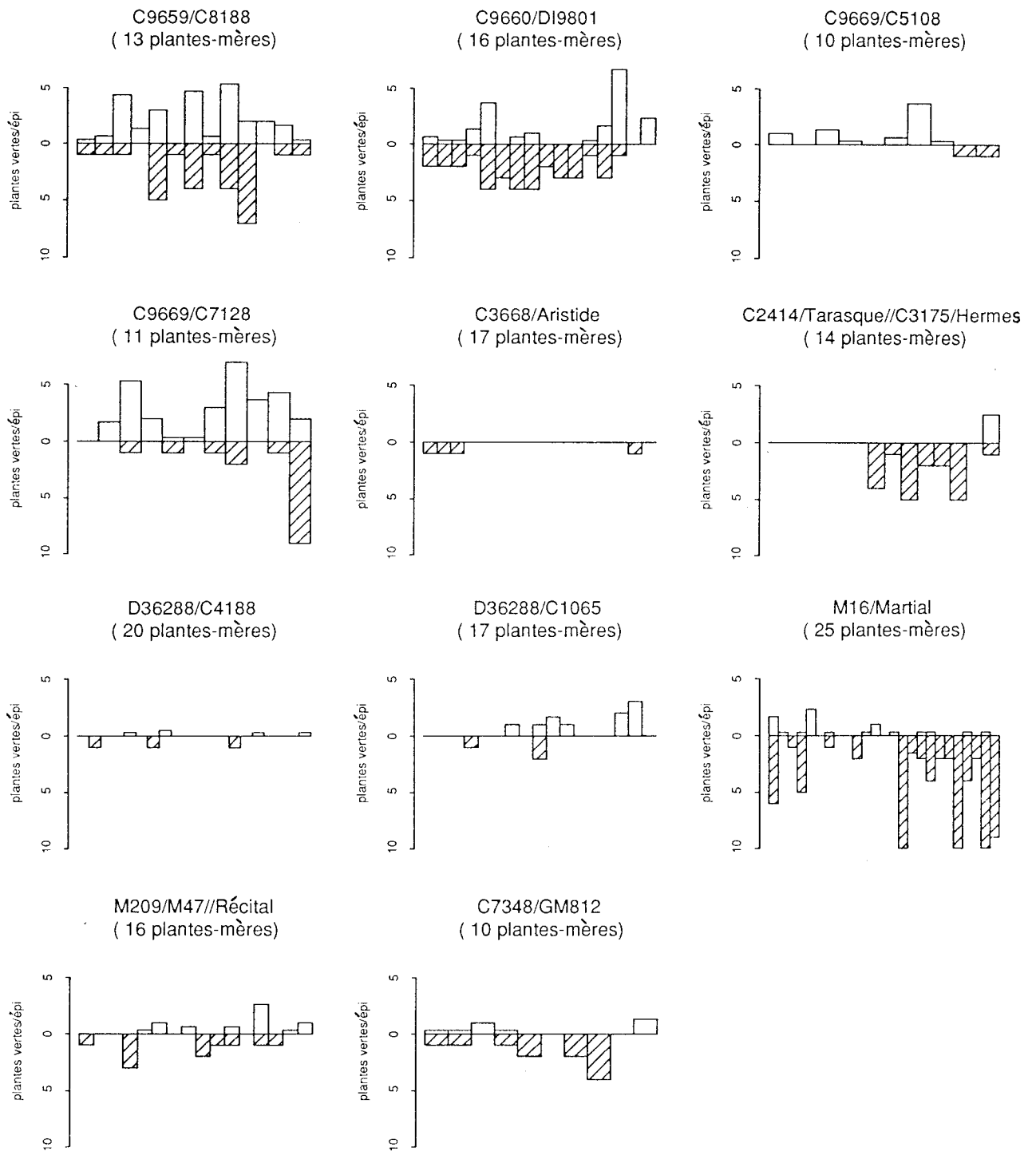


Fig 2. Nombre de plantes vertes (PV) obtenues par épi, pour chacune des plantes donneuses des différents croisements (à chaque plante donneuse sont associées 2 «boîtes», l'une non rayée, située au-dessus de l'origine et correspondant au résultat de l'androgénèse, et l'autre rayée, située en dessous de l'origine et correspondant au résultat pour le croisement interspécifique).

nues pour chacun des croisements par les 2 méthodes d'haplodiploïdisation, afin de tamponner l'effet de l'erreur expérimentale. Le fait de considérer ces valeurs moyennes nous permet également de limiter le biais dû à l'inégalité des

nombre d'épis travaillés (pour le croisement entre blé et maïs, des contraintes de travail ne nous ont permis d'appliquer la méthode qu'à un seul épi par plante donneuse, contre 3 pour l'androgénèse). En effet, les effectifs travaillés par

croisement nous paraissent suffisamment importants pour que les résultats obtenus par les 2 méthodes puissent être comparés, même si les valeurs obtenues en androgenèse sont effectivement évaluées avec plus de précision.

Pour les 2 processus d'haplodiploïdisation, les productions moyennes de PV apparaissent très variables selon le croisement, puisque les rapports PV/épi vont de 0 (pour la F3 C3668/Aristide) à 2,7 (pour la F1 C9669/C7128) pour l'androgenèse, et de 0,15 (pour la F1 D36288/C4188) à 2,81 (pour la F3 M16/Martial) pour le croisement interspécifique (tableau I). Le test de Kruskal-Wallis indique d'ailleurs que l'effet «croisement» est hautement significatif pour la variable PV/épi, que ce soit pour l'androgenèse ou pour le croisement interspécifique (tableau I).

Cette variabilité au niveau des rapports PV/épi, pour une même méthode, se retrouve au niveau de ses 2 composantes, embryons/épi et PV/embryon, caractéristiques des étapes d'embryogenèse et de régénération (tableau I). Là encore le test de Kruskal-Wallis met en évidence un effet «croisement» hautement significatif pour les 2 variables, aussi bien pour l'androgenèse que pour le croisement interspécifique.

Lorsqu'on compare les 2 méthodes, on constate (tableau I) que les rapports PV/épi ne sont pas très différents lorsqu'on considère la totalité des plantes donneuses (le nombre d'HD par épi est de 0,71 pour l'androgenèse, et de 1,21 pour le croisement interspécifique). Cependant ces rapports sont obtenus de manières très différentes (fig 1 et tableau I) : le nombre d'embryons obtenus par épi est plus élevé dans le cas de l'androgenèse (8,8 contre 2,1 pour le croisement entre blé et maïs), mais le taux de régénération est à peu près 7 fois plus faible (la valeur du rapport PV/embryon est de 0,08, contre 0,59 dans le cas du croisement interspécifique).

Lorsqu'on compare, pour chacun des croisements, les rapports PV/épi obtenus par les 2 méthodes (tableau I), on constate que certains croisements répondent de la même manière aux 2 processus d'haplodiploïdisation. Par exemple, les rapports PV/épi pour l'androgenèse et le croisement interspécifique sont respectivement de 2,03 et 2,08 pour la F1 C9659/C8188, ou de 0,07 et 0,15 pour la F3 D36288/C4188. En revanche, d'autres croisements donnent des résultats contrastés selon la méthode employée. Par exemple, les rapports PV/épi pour la culture d'anthers et le croisement entre blé et maïs sont respectivement de 0,32 et 2,81 pour la F3 M16/

Martial, et de 2,7 et 1,36 pour la F1 C9669/C7128. Ceci se traduit par une absence de corrélation entre les valeurs moyennes des rapports PV/épi obtenus par les 2 méthodes (le calcul du coefficient de corrélation de rangs de Spearman donne: $\rho = 0,3$; $P = 0,35$).

On retrouve ce résultat au niveau des 2 étapes de l'haplodiploïdisation : le coefficient de corrélation de Spearman indique que les taux moyens d'embryogenèse obtenus pour les différents croisements par les 2 méthodes ne sont pas corrélés ($\rho = 0,584$; $P = 0,07$), et l'absence de corrélation est encore plus nette dans le cas des taux moyens de régénération ($\rho = -0,164$; $P = 0,59$).

Si on s'intéresse au pourcentage de plantes donneuses ayant produit au moins 1 PV (tableau I), on peut faire à peu près les mêmes constatations que pour le rapport PV/épi. Lorsqu'on considère la totalité des plantes donneuses, ces taux sont quasiment identiques (44% pour l'androgenèse, 46% pour le croisement interspécifique). En revanche, au niveau de chacun des croisements, les 2 méthodes peuvent donner aussi bien des taux similaires (que les valeurs prises soient faibles ou élevés), que des taux contrastés dans un sens ou dans l'autre.

Globalement, lorsqu'on cumule les résultats obtenus par les 2 processus d'haplodiploïdisation, le pourcentage de plantes donneuses ayant produit au moins 1 PV passe à 66%. Il faut noter que cette augmentation importante ne provient pas uniquement des croisements pour lesquels les réponses à l'androgenèse et au croisement interspécifique sont contrastées, mais aussi de croisements qui répondent en moyenne de manière similaire, mais pour lesquels une plante donneuse particulière aura produit une PV par l'une des méthodes et pas par l'autre. On trouve une illustration de cela au niveau de la figure 2, pour un cas de croisement répondant mal aux 2 méthodes (D36288/C4188), comme pour un cas de croisement répondant bien (C9659/C8188). Cela souligne à nouveau, au moins dans le cas des croisements F1, l'importance de l'erreur expérimentale qui entache les résultats de l'androgenèse et du croisement entre blé et maïs.

Par ailleurs les exigences en main d'œuvre des 2 méthodes apparaissent équivalentes, puisque les opérations spécifiques de l'androgenèse nécessitent 0,39 h par PV produite, alors que celles caractéristiques du croisement entre blé et maïs demandent 0,34 h par PV obtenue.

DISCUSSION

Les résultats que nous avons obtenus sur un échantillon de 169 plantes donneuses, issues de 11 croisements représentant une large gamme de variabilité génétique, montrent qu'il n'est pas facile d'obtenir une descendance HD pour chacune des plantes donneuses lorsqu'on utilise une seule méthode d'haplodiploïdisation: en travaillant 3 épis par androgenèse, ou un épi par croisement interspécifique, moins de la moitié des plantes donneuses ont produit au minimum une PV.

En revanche, on constate qu'en cumulant les 2 méthodes, on augmente de manière importante le taux de réponse, puisqu'on a alors deux tiers des plantes donneuses qui produisent au moins une PV. Cependant, ce cumul correspond aussi à une augmentation du temps de travail, et on peut penser qu'en consacrant le même temps global à l'une ou l'autre des méthodes, on améliorerait également les résultats. En effet, nous avons vu qu'il y avait une fluctuation importante du rapport PV/épi pour des plantes donneuses ayant le même génotype, en raison des nombreux paramètres (vigueur des plantes donneuses, stades de prélèvement, etc), qui ne sont pas totalement contrôlables : en augmentant le nombre d'épis travaillés, on augmente donc les chances d'obtenir une PV à partir d'une plante donneuse.

Néanmoins, nos résultats indiquent clairement l'existence d'un effet génotypique pour les 2 méthodes, puisque l'effet «croisement» (évalué à travers des valeurs moyennes qui permettent de tamponner l'erreur expérimentale) est très significatif pour toutes les variables caractéristiques du processus d'haplodiploïdisation. Nos résultats mettent également en évidence l'absence de corrélation entre les réponses obtenues par androgenèse et celles obtenues par croisement interspécifique. On peut donc penser qu'il sera plus facile d'augmenter la proportion des plantes donneuses produisant une descendance HD en utilisant 2 méthodes qui apparaissent en partie complémentaires, qu'en se focalisant sur une seule méthode. D'ailleurs, chez l'orge, une complémentarité du même type a déjà été mise en évidence pour l'androgenèse et le croisement interspécifique avec *Hordeum bulbosum*, par Foroughi-Wehr *et al* (1981), Huang *et al* (1984) et Devaux (1987).

Il faut noter également, lorsqu'on veut comparer les 2 méthodes, que les techniques de croi-

sement interspécifique avec le maïs n'en sont pas au même degré d'optimisation que les techniques de l'androgenèse. On peut donc espérer une augmentation de l'efficacité des croisements entre blé et maïs pour la production d'HD. Des résultats obtenus par Laurie et Reymondie (1991) vont déjà dans ce sens. En effet ces auteurs, en travaillant sur 14 variétés de blé d'hiver et 5 variétés de blé de printemps, ont obtenu par croisement interspécifique avec le maïs, 4,4 PV par épi pour les blés d'hiver, et 5,3 PV par épi pour les blés de printemps (à comparer avec notre production de 1,2 PV par épi). Pour expliquer nos moins bons résultats, on peut évoquer :

- un effet des techniques utilisées: Laurie et Reymondie n'ont pas utilisé le même milieu que nous pour la régénération des embryons, et leur protocole était légèrement différent pour les dates des traitements au 2-4D et à l'acide gibbérellique;

- une régulation insuffisante de la serre dans laquelle se trouvaient nos plantes donneuses : en particulier, le fait que l'hygrométrie puisse descendre en dessous de 60% pendant la période de formation des embryons, constitue sans doute un facteur très défavorable;

- un effet éventuel du génotype de maïs utilisé pour la pollinisation (Laurie et Reymondie n'ont pas employé un mélange de pollens, mais uniquement la variété hybride Seneca 60).

Cependant, nos F1 et F3 ne représentaient sans doute pas la même gamme de variabilité génétique que les 19 variétés testées par Laurie et Reymondie (1991), et l'effet des génotypes travaillés pourrait aussi expliquer une grande part des différences constatées.

CONCLUSION

Nos résultats montrent qu'une utilisation conjointe de l'androgenèse *in vitro* et du croisement entre blé et maïs, pourrait augmenter la proportion de plantes donneuses produisant une descendance HD, et faciliter ainsi l'utilisation de l'haplodiploïdisation dans les schémas de sélection.

Cependant, une fois cela acquis, il restera à montrer que les HD obtenus représentent bien un échantillon aléatoire des gamètes des plantes donneuses. En effet, si ça n'était pas le cas on serait en présence d'une sélection gamétique, qui pourrait d'ailleurs s'exercer différemment

pour l'androgénèse et le croisement interspécifique. L'utilisation de la variabilité génétique pourrait être alors fortement biaisée dans le cadre de l'application de l'haplodiploïdisation, par rapport à ce qui se passe dans un cadre plus classique de sélection généalogique, SSD ou bulk.

RÉFÉRENCES

- Baenziger PS, Wesenberg DM, Smail VM, Alexander WL, Schaeffer GW (1989) Agronomic performance of wheat doubled-haploid lines derived from cultivars by anther culture. *Plant Breeding* 103, 101-109
- Becker RA, Chambers JM, Wilks AR (1988) The New S Language: a programming environment for data analysis and graphics. Wadsworth & Brooks/Cole, Pacific Grove, 702 p
- Chuang CC, Ouyang TW, Chia H, Chou SM, Ching CK (1978) A set of potato media for wheat anther culture. In: *Proc Symp Plant Tissue Culture*. Science Press, Beijing, 51-56
- De Buyser J, Henry Y, Taleb G (1985) Wheat androgenesis: cytogenetical analysis and agronomic performance of doubled haploids. *Z Pflanzenzüchtg* 95, 23-34
- Devaux P (1987) Comparison of anther culture and *Hordeum bulbosum* method for the production of doubled haploid in winter barley. I. Production of green plants. *Plant Breeding* 98, 215-219
- Foroughi-Wehr B, Pickering R, Friedt W (1981) Related response of barley cultivars to the "*bulbosum*" and anther-culture techniques of haploid production. *Barley Genet News* 11, 54-59
- Foroughi-Wehr B, Wenzel G (1990) Recurrent selection alternating with haploid steps. A rapid breeding procedure for combining agronomic traits in inbreeders. *Theor Appl Genet* 80, 564-568
- Gallais A (1988) A method of line development using doubled haploids: the single double haploid descent recurrent selection. *Theor Appl Genet* 75, 330-332
- Gallais A (1989) Optimization of recurrent selection on the phenotypic value of doubled haploid lines. *Theor Appl Genet* 77, 501-504
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50, 151-158
- Huang B, Dunwell JM, Powell W, Hayter Am, Wood W (1984) The relative efficiency of microspore culture and chromosome elimination as methods of haploid production in *Hordeum vulgare* L. *Z Pflanzenzüchtg* 92, 22-29
- Inagaki M, Tahir M (1990) Comparison of haploid production frequencies in wheat varieties crossed with *Hordeum bulbosum* L. and maize. *Jpn J Breed* 40, 209-216.
- Laurie DA, Bennett MD (1987) The effect of the crossability loci *Kr1* and *Kr2* on fertilization frequency in hexaploid wheat x maize crosses. *Theor Appl Genet* 73, 403-409
- Laurie DA, Bennett MD (1988) The production of haploid wheat plants from wheat x maize crosses. *Theor Appl Genet* 76, 393-397
- Laurie DA, Snape JW (1990) The agronomic performance of wheat doubled-haploid lines derived from wheat x maize crosses. *Theor Appl Genet* 79, 813-816
- Laurie DA, Reymondie S (1991) High frequencies of fertilization and haploid seedling production in crosses between commercial hexaploid wheat varieties and maize. *Plant Breeding* 106, 182-189
- Pauk J, Manninen O, Mattila I, Salo Y, Pulli S (1991) Androgenesis in hexaploid spring wheat F2 populations and their parents using a multiple-step regeneration system. *Plant Breeding* 107, 18-27
- Snape JW, Chapman V, Moss J, Blanchard CE, Miller TE (1979) The crossabilities of wheat varieties with *Hordeum bulbosum*. *Heredity* 42(3), 291-298
- Stefanowska G, Cauderon Y (1983) L'aptitude au croisement avec le seigle (*Secale cereale* L) d'une lignée hexaploïde de *Triticum* (cv Roazon) résultant d'hybridation interspécifique. *Agronomie* 3, 355-358
- Suenaga K, Nakajima K (1989) Efficient production of haploid wheat (*Triticum aestivum*) through crosses between Japanese wheat and maize (*Zea mays*). *Plant Cell Reports* 8, 263-266
- Yuan HM, Keppenne VD, Baenziger PS, Berke T, Liang GH (1990) Effect of genotype and medium on wheat (*Triticum aestivum* L) anther culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 21, 253-258
- Zeven AC (1987) Crossability percentages of some 1400 bread wheat varieties and lines with rye. *Euphytica* 36, 299-319
- Zhang LJ, Anceau C, Lepoivre P, Seilleur P, Semal J (1987) An efficient method for the regeneration of wheat (*Triticum aestivum*) from anther cultures. *Bull Rech Agron Gembloux* 22(4), 301-314
- Zhuang JJ, Xu J (1983) Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: *Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement* (H Hu, MR Vega eds). Science Press, Beijing, 431-432