

50376
1983
171

50376
1983
171

N° d'ordre : 1037

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE 3^e CYCLE

par

Pierre DEVAUX

**HAPLOIDES DOUBLÉS, ISSUS D'ORGES D'HIVER,
PAR LA METHODE BULBOSUM.
ANALYSE CYTOGENETIQUE ET RECHERCHE DE
MEILLEURES SOUCHES *D'HORDEUM BULBOSUM***



Soutenue le 20 mai 1983 devant la Commission d'Examen :

M. R. BOURIQUET
Mme Y. CAUDERON
M. M. DESPREZ
M. R. JEAN
M. P. VERNET

A mon épouse

en témoignage de toute ma reconnaissance.

AVANT-PROPOS.

Ce travail s'inscrit dans le programme de recherches des Etablissements Florimond DESPREZ à Cappelle en Pévèle (Nord), pour lesquels la création de variétés nationales et internationales d'espèces végétales cultivées est l'objectif principal depuis plus d'un siècle. Il a été réalisé conjointement aux Ets. DESPREZ et au laboratoire de Génétique de l'Université de LILLE.

Monsieur Michel DESPREZ, Ingénieur agronome, Directeur des Ets. DESPREZ m'a introduit dans le domaine de la génétique végétale par les nombreux enseignements qu'il m'a toujours prodigués. Ses vastes connaissances, son esprit scientifique et précis sont pour moi autant de facteurs d'admiration. Je lui adresse ici mon profond respect et mes très sincères remerciements.

Je tiens à honorer la mémoire de Monsieur le Professeur LINDER qui m'avait accueilli dans son laboratoire il y a maintenant plus de quatre ans.

Monsieur le Professeur JEAN, Directeur du laboratoire de Génétique, m'a initié à la cytogénétique et à la statistique ; il m'a apporté sans relâches tout son appui dans ces recherches et la présentation de ce travail me permet de lui exprimer ma très profonde gratitude.

Madame CAUDERON, Directeur de Recherches au Centre National de la Recherche Agronomique et mondialement connue par ses travaux sur les croisements interspécifiques et intergénétiques m'a toujours fourni de précieux conseils. Elle me fait le grand honneur, malgré ses très lourdes charges, de participer à ce jury ; je l'en remercie très sincèrement.

Monsieur le Professeur BOURIQUET, Directeur du laboratoire de Physiologie végétale de l'Université de LILLE m'a introduit dans le monde passionnant de la culture *in vitro*. Je le remercie vivement de l'intérêt qu'il porte à ce travail.

Je suis profondément reconnaissant à Monsieur le Professeur VERNET, Directeur du laboratoire de Génétique Ecologique, qui, dès son arrivée à LILLE, s'est intéressé à nos recherches.

C'est avec un grand plaisir qu'il nous faut évoquer la très étroite et amicale collaboration entretenue avec le Docteur R. PICKERING du Welsh Plant Breeding Station à ABERYSTWYTH (Pays de Galle). Qu'il trouve ici l'expression de nos très chaleureux remerciements.

La mise en évidence et l'étude des bandes C sur les chromosomes d'orge ont été réalisées au laboratoire du Docteur LINDE LAURSEN (Risø National Laboratory, Roskilde, Danemark). C'est avec une grande admiration pour ses nombreux travaux que je lui adresse mes remerciements.

Sans le concours de Monsieur MASSON (Département de Mathématiques appliquées, E.N.S.A. de Rennes) une grande partie des calculs statistiques n'auraient pu voir le jour. Je lui exprime ici mes vifs remerciements.

Je suis reconnaissant envers toutes celles et ceux qui m'ont aidé et tout particulièrement Monsieur J. LEFEBVRE, responsable du programme de sélection de l'orge aux Ets. DESPREZ qui a toujours suivi avec beaucoup d'intérêt ce travail ainsi que mon fidèle ami R. RACCA qui n'a ménagé ni son temps ni sa peine pour m'apporter un soutien permanent. J'y associe Monsieur et Madame J. DUBOTS pour la réalisation des travaux photographiques et Madame ROELANTS pour sa très aimable collaboration technique.

RESUME : La méthode de production d'haploïdes doublés d'orge, par croisement interspécifique entre *Hordeum vulgare* et *H. bulbosum* a été adaptée dans le cadre d'un schéma de sélection d'orges d'hiver 2 rangs et 6 rangs.

L'amélioration de la technique est passée :

- par la recherche de meilleures souches d'*H. bulbosum* pour leur aptitude à induire des haploïdes
- par la mise en évidence de conditions optimales d'expérimentation.

En règle générale, les orges d'hiver à 6 rangs sont plus difficiles à haploïdiser que les orges d'hiver à 2 rangs. Cette difficulté voit son origine dans une incompatibilité plus marquée en croisement avec *H. bulbosum*.

Pour la production à grande échelle d'haploïdes doublés d'orge, nous montrons l'intérêt du mélange de pollen d'*Hordeum bulbosum*, des complémentarités entre souches ayant été mises en évidence.

Le matériel végétal utilisé et produit, est étudié par des techniques cytologiques.

Mots clefs : Caryotype, C.banding, aptitude au croisement, nouaison, analyse factorielle des correspondances.

SUMMARY : The barley doubled haploid technique using the interspecific hybridisation between *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum* has been successfully used in a breeding program of 2 rowed and 6 rowed winter barley.

The improvement of the technique was obtained :

- by using better clones of *H. bulbosum* in their ability to produce haploids
- by specifying optimum conditions for experimentation.

It is often more difficult to produce haploids from 6 rowed winter barleys rather than 2 rowed winter barleys. This difficulty is due to a higher incompatibility with *H. bulbosum*.

To produce a large number of doubled haploid barley, we think that it is better to use a mixture of pollen from our better clones of *H. bulbosum*; we have found complementary clones.

Cytological studies have been done on our used and produced material.

Index words : Caryotype, C.banding, crossability, seed set, multifactoriel analysis.

T A B L E D E S M A T I E R E S

	page
INTRODUCTION	1
<u>CHAPITRE 1 : SITUATION ACTUELLE ET DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	
<u>SUR L'HAPLOIDIE DANS LA SELECTION</u>	2
I. Les objectifs présents de l'amélioration de l'orge.....	2
II. Intérêts de l'haploïdie	4
II.1. Définitions	4
a) la plante haploïde	4
b) la plante haploïde doublée	5
c) Comparaison entre l'homozygotie de l'haploïde doublé et l'homozygotie obtenue dans la des- cendance d'un hybride autofécondé.....	5
II.2. Haploïdie et amélioration des plantes.....	5
a) Intérêts de l'haploïdie.....	5
b) les limites théoriques de l'haploïdie en amé- lioration des plantes.....	8
II.3. Haploïdie et recherche fondamentale.....	9
III. Les différentes origines possibles des plantes haploïdes.....	10
III.1. Les haploïdes spontanés	10
a) la polyembryonie	10
b) la sémigamie	11
c) Gynogénèse et androgénèse	11
III.2. Les haploïdes induits in vitro à partir de la culture des gamétophytes.....	12
a) Culture in vitro des gamétophytes mâles.....	12
b) Culture in vitro des gamétophytes femelles...	12

III.3. Les haploïdes induits in situ.....	13
a) les traitements physiques.....	13
b) les traitements chimiques.....	13
c) Intéraction cytoplasme-noyau.....	13
d) la voie génétique	14
e) la réduction somatique.....	14
f) l'hybridation interspécifique ou intergéné- rique.....	15
IV. L'haploïdisation de l'orge par croisement interspécifique avec <i>Hordeum bulbosum</i>	16
IV.1 Historique.....	16
IV.2. Contrôle de l'élimination chromosomique.....	17
IV.3 Les facteurs génétiques limitatifs de la technique	21
a) l'incompatibilité de fécondation.....	21
b) la qualité des caryopses issus du croisement interspécifique.....	21
c) la différenciation des embryons.....	22
d) l'obtention in vitro des plantes.....	22
e) le doublement des chromosomes.....	22
IV.4. L'incorporation de la méthode <i>bulbosum</i> dans les schémas de sélection.....	23
IV.5. Etat actuel de l'utilisation de la méthode dans la sélection.....	25
V. L'haploïdisation du blé par croisement intergénérique avec <i>Hordeum bulbosum</i>	26
VI. Conclusions : les buts de notre travail.....	27
 <u>CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES</u>	29
I. Le matériel végétal.....	29
I.1. Les orges.....	29
a) les orges utilisées pendant la saison 1980....	30
b) les orges utilisées pendant la saison 1981....	30
c) les orges utilisées pendant la saison 1982....	31
I.2. Les blés.....	31
I.3. <i>Hordeum bulbosum</i>	31

II. Les techniques utilisées.....	32
II.1. L'haplodiploïdisation de l'orge.....	32
II.1.1. L'élevage des plantes parentales....	32
II.1.2. La castration des épis d'orge.....	35
II.1.3. La pollinisation.....	36
II.1.4. Le traitement à l'acide gibberel- lique.....	36
II.1.5. La culture in vitro des embryons....	37
a) la récolte et la stérilisation des caryopses.....	37
b) le prélèvement des embryons des caryopses.....	38
c) les milieux de culture.....	38
d) la culture des embryons.....	39
II.1.6. Le transfert en terre.....	40
II.1.7. Le doublement chromosomique.....	40
II.1.8. L'élevage des plantes traitées.....	41
II.2. Haplodiploïdisation du blé	42
II.3. Le traitement mutagène.....	42
II.4. Les techniques cytologiques.....	43
II.4.1. Les comptages chromosomiques sur méristèmes racinaires.....	43
II.4.2. La coloration différentielle des chro- mosomes par la méthode du Giemsa.C. banding.....	43
a) la matériel.....	44
b) le prétraitement.....	44
c) la fixation.....	44
d) la macération.....	44
e) l'étalement.....	44
f) la deshydratation.....	45
g) la maturation.....	45
h) la dénaturation.....	45
i) le lavage.....	45
j) la renaturation.....	45
k) la coloration.....	46

11.4.3. Les observations méiotiques	46
11.4.4. Les observations des populations polli- niques.....	47
11.4.5. Les analyses cytologiques des embryons et de l'albumen issus du croisement interspé- cique orge variété Emin x <i>Hordeum bulbosum</i> ...	47
11.4.6. Les calculs statistiques.....	48
<u>CHAPITRE III : ANALYSE MORPHOLOGIQUE ET CYTOLOGIQUE DU MATERIEL</u>	49
I. Les parents du croisement : <i>Hordeum vulgare</i> et <i>Hordeum bulbosum</i>	50
I.1. Morphologie	50
I.2. Caractères cytologiques	52
a) <i>Hordeum vulgare</i>	52
b) <i>Hordeum bulbosum</i>	55
II. Morphologie des caryopses.....	55
III. Les embryons.....	57
III.1. La morphologie des embryons au moment de la mise en culture in vitro.....	57
III.2. Mise en évidence du phénomène d'élimination chromosomique au niveau de l'embryon et de l'al- bumen.....	58
IV. Les plantes obtenues après la culture des embryons....	61
IV.1. La plante au moment du repiquage.....	61
IV.2. La plante haploïde.....	61
a) le caryotype.....	61
b) la méiose et le pollen.....	63
IV.3. La plante hybride.....	64
a) morphologie.....	64
b) caryotype.....	64
c) la méiose et le pollen.....	66
IV.4. La plante haploïde doublée.....	68
a) la morphologie.....	68
b) le caryotype.....	68
c) la méiose et le pollen.....	70
IV.5. L'amphidiploïde VVBB.....	70
V. Conclusion	71

<u>CHAPITRE IV : ANALYSE DES DONNEES</u>	72
I. Tableau général des données par année.....	72
I.1. Description du tableau avec présentation des pour- centages.....	72
I.2. Amélioration générale des résultats.....	73
I.3. Enseignement des essais préliminaires de 1980.....	74
II. Recherche de souches d' <i>Hordeum bulbosum</i>	76
II.1. Remarques préliminaires.....	76
a) Sur le caractère génétique des souches d' <i>Hordeum</i> <i>vulgare</i> et d' <i>Hordeum bulbosum</i>	76
b) Sur le point de vue du sélectionneur dans l'analyse des données.....	77
II.2. Les tableaux de données.....	77
II.3. Comparaison entre les souches d' <i>Hordeum bulbosum</i> dans les différents stades de la méthode.....	79
a) Mise en évidence du taux de nouaison comme facteur limitant principal de la méthode.....	79
b) Hiérarchie des souches d' <i>Hordeum bulbosum</i> pour le rendement en plantes haploïdes.....	80
II.4. Effet du facteur <i>Hordeum vulgare</i> 2 rangs - 6 rangs dans les différentes étapes de la méthode expérimen- tale (tableau V).....	81
II.5. Effets conjugués du facteur <i>H. bulbosum</i> et du facteur <i>H. vulgare</i> sur le taux de nouaison.....	82
a) Analyse de variance.....	82
b) Analyse factorielle des correspondances.....	84
c) Méthode graphique.....	86
III. Rendement de la combinaison pollinique d' <i>H. bulbosum</i>	88
III.1. Présentation de la méthode expérimentale.....	88
III.2. Comparaison mélange pollinique/pollen entre souches.....	89
a) par rapport aux résultats globaux obtenus avec les 8 souches d' <i>Hordeum bulbosum</i>	89
b) par rapport aux résultats globaux obtenus avec la souche B5:.....	90
c) Conclusion sur l'utilisation de la combinaison pollinique.....	92

IV. Etude des facteurs du milieu.....	93
IV.1. Effet saison et méthode de castration sur le taux de nouaison.....	93
a) Présentation des résultats.....	93
b) Analyse de variance non orthogonale à trois facteurs.....	96
c) Interprétation des résultats.....	97
IV.2. Effet saison sur la différenciation des embryons.	99
IV.3. Comparaison de 2 milieux de culture pour l'obten- tion des plantes in vitro.....	100
V. Les croisements Blé X <i>Hordeum bulbosum</i>	101
CONCLUSION.....	104
BIBLIOGRAPHIE.....	107

INTRODUCTION

Au moment où la recherche et le développement technologique deviennent priorité nationale dans plusieurs domaines scientifiques comme l'Agro alimentaire;

"Intégrer les biotechnologies (protoplastes, haploïdes, vitro méthodes, clonage de gènes...) dans la stratégie de création variétale et de multiplication des espèces végétales". Point 4.

Extrait du programme mobilisateur. Essor des biotechnologies.

Juillet 1982. Ministère de la Recherche et de l'Industrie,

il paraît intéressant de se demander quelles sont, à plus ou moins court terme, les retombées possibles dans le domaine appliqué. Ce travail en donne un exemple dans la sélection végétale : celui de la production d'haploïdes doublés d'orge pour l'amélioration génétique plus rapide de cette espèce.

La technique utilisée depuis une décennie dans trois pays, essentiellement : le Canada, La Grande Bretagne et le Danemark, a été appliquée aux orges de printemps. Nous l'avons adaptée aux orges d'hiver 2 rangs et 6 rangs, dans un organisme de sélection, à partir de 1980.

CHAPITRE I : SITUATION ACTUELLE ET DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR L'HAPLOIDIE DANS LA SELECTION

I. LES OBJECTIFS PRESENTS DE L'AMELIORATION DE L'ORGE

L'orge (*Hordeum vulgare* L., *sensu lato*) représente de nos jours, la quatrième céréale produite au monde après le blé, le riz et le maïs (HARLAN, 1976). Cette importance, indubitablement liée aux nombreux travaux de sélection qu'elle a suscitée ainsi qu'à sa facilité d'adaptation aux conditions les plus variées, a été récemment soulignée au quatrième congrès de génétique des orges qui s'est tenu à Edimbourg en Grande Bretagne en 1981.

Sans vouloir pour autant dresser un bilan exhaustif des différents objectifs de l'amélioration de cette espèce, nous pensons qu'il est toutefois intéressant d'en préciser les axes directeurs :

- l'amélioration de la productivité : Elle représente l'un des principaux facteurs des prix de revient des denrées agricoles et de ce fait, elle constitue le cheval de bataille de tous les sélectionneurs.

- l'amélioration de la régularité de rendement : Elle contribue à l'expression des potentialités de productivité. Elle peut être obtenue :

. par l'adaptation au milieu physique : Sous nos conditions, les résistances au froid et à la verse physiologique sont recherchées. La sélection peut s'orienter également vers des caractères tels que la précocité et le rythme de développement.

. par adaptation au milieu chimique : dans certaines régions où les sols sont riches en un composé chimique donné (chlorure de sodium, aluminium, par exemple), des résistances sont recherchées. La résistance à un produit phytosanitaire particulier peut être également une voie d'étude.

. par adaptation au milieu biologique : Le milieu comporte, en effet, de nombreux prédateurs, fongiques (oïdium, rouilles, charbon, helminthosporioses, septorioses, rhynchosporiose), viraux (jaunisse nanisante, mosaïque) ou animaux (nématodes, aphidiens). La recherche de variétés résistantes ou tolérantes à ces prédateurs, est développée. L'importance relative de ces maladies étant variable en fonction du temps, il n'est pas rare de constater une recrudescence de certaines d'entre elles qui étaient considérées comme secondaires depuis longtemps. Ce fut le cas, en 1981, pour un type d'helminthosporiose provoquée par *Helminthosporium teres*, et pour la jaunisse nanisante, provoquée par le virus YBDV (Yellow Barley Dwarf Virus).

- l'amélioration de la valeur d'utilisation : Les variétés produites doivent bien entendu tenir compte des exigences de l'utilisateur et des industries de transformation à qui le produit est destiné.

Pour essayer de répondre à tous ces impératifs, la méthode couramment utilisée est l'hybridation intraspécifique entre plantes

possédant des phénotypes recherchés suivie d'une sélection sur les descendances des croisements réalisés : méthode longue, onéreuse et partiellement aléatoire, car elle dépend de la manière dont les gènes vont se recombinaer. Après dix à douze cycles d'autofécondations successives, l'obtention d'individus homozygotes sélectionnés font l'objet d'essais officiels en vue d'une commercialisation ultérieure. Toute méthode permettant une approche plus rapide de cette homozygotie contribuera à accélérer le progrès génétique de l'espèce. L'haplométhode en est une.

II. INTERETS DE L'HAPLOIDIE

II.1. Définitions

a) la plante haploïde

Chez la plante supérieure, un haploïde est un sporophyte qui possède le nombre chromosomique du gamétophyte de la même espèce (KIMBER G. et R. RILEY, 1963).

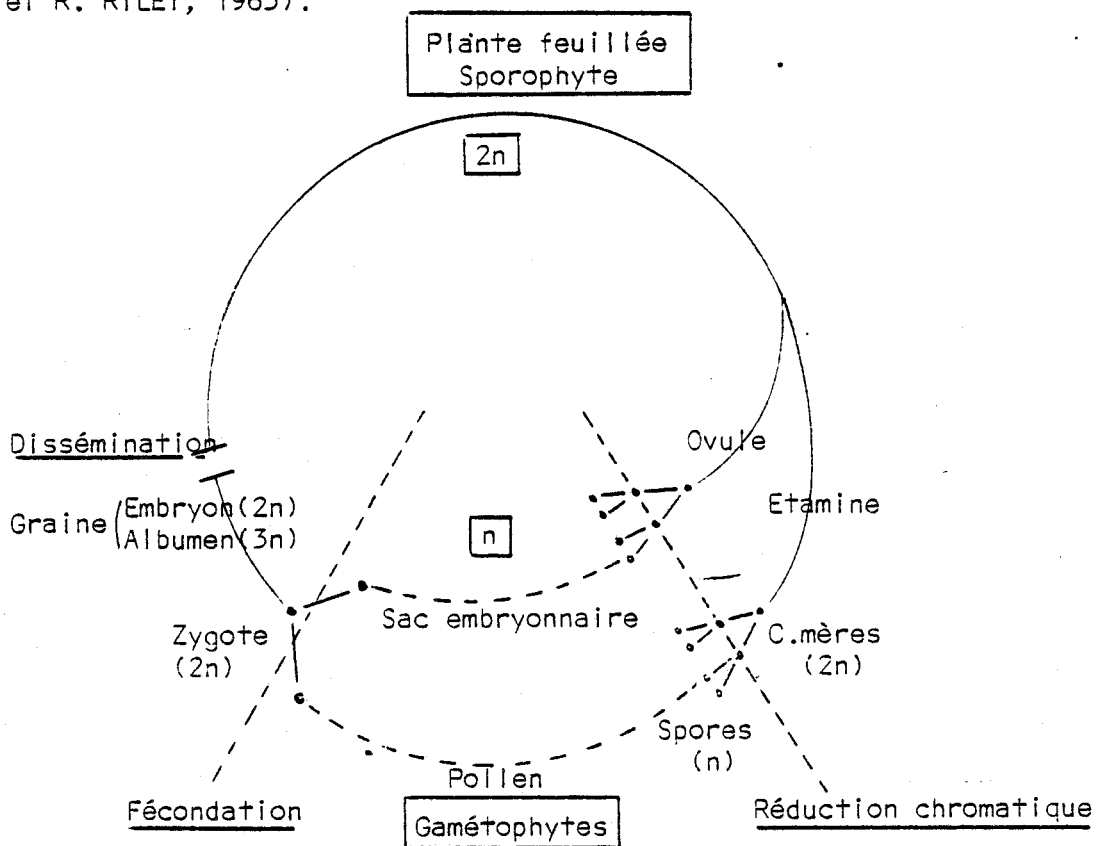


Figure 1 : Cycle de développement d'une Angiosperme hermaphrodite (d'après CAMEFORT, 1969).

Chez les végétaux supérieurs, et en particulier chez les Angiospermes, la phase haploïde est très brève et le gamétophyte se réduit à quelques cellules, comme le schématise la figure 1.

b) la plante haploïde doublée

L'haploïde doublé est un individu issu d'un grain de plante haploïde autofécondée et préalablement soumise à un traitement de doublement du stock chromosomique.

c) Comparaison entre l'homozycotie de l'haploïde doublé et l'homozycotie obtenue dans la descendance d'un hybride autofécondé

Le génotype de l'haploïde doublé, obtenu à partir de lignées très hétérozygotes, est constitué par la juxtaposition de segments chromosomiques relativement longs des deux parents dont il dérive. Par contre, l'homozygote obtenu par autofécondations successives, correspond à la pulvérisation de petits fragments des structures parentales. Ainsi, l'haploïde doublé est un matériel original impossible à obtenir par une autre voie (Y. DATTEE, comm. pers., 1983).

11.2. Haploïdie et amélioration des plantes

a) Intérêts de l'haploïdie

Un des principaux intérêts de l'haploïdie a été rapidement perçu après l'obtention d'un haploïde chez *Datura stramonium* L. par BLAKESLEE et al. en 1922, qui indiquaient le passage rapide de l'état hétérozygote à l'état homozygote. CHASE en 1949 pense qu'il est possible d'utiliser l'haploïdie en amélioration des plantes à condition de pouvoir en obtenir un nombre suffisant. Avant les travaux de GUHA et MAHESHWARI en 1964 et de BOURGIN et NITSCH, en 1967, qui signalaient l'obtention in vitro de plantes à partir du gamétophyte mâle, plusieurs auteurs avaient souligné l'importance de l'haploïdie (BURNHAM, 1962; KIMBER et RILEY, 1963; MAGOON et KHANNA, 1963; BLANCHET, 1967; THEVENIN, 1969).

Les intérêts d'utilisation des haploïdes en amélioration des plantes sont nombreux, en voici les principaux :

1°) Obtention rapide de lignées homozygotes par doublement des haploïdes ce qui permet de les analyser et de les sélectionner pour leur valeur intrinsèque ou leur valeur en combinaison d'où possibilité de création directe de variétés chez les plantes autogames et d'hybrides synthétiques chez les allogames. Ceci présente deux avantages : le premier est un gain de temps pour parvenir à des lignées pures, le second est que la sélection sur ces lignées est simplifiée du fait que les gènes sont à l'état homozygote.

2°) Les haploïdes peuvent permettre une recherche plus facile des gènes récessifs et d'une manière générale simplifient l'analyse génétique. Par exemple, chez les autopolyloïdes, la réduction du nombre de chromosomes au nombre gamétique facilite l'étude des disjonctions.

3°) Les haploïdes sont un matériel de choix pour la mutagenèse puisque toute mutation peut s'exprimer au niveau haploïde (KASHA, 1976), sauf si elle est réprimée par épistasie (Y. CAUDERON, Comm. pers., 1983).

4°) Les haploïdes sont des produits directs de la méiose. Pour un couple d'allèles, la ségrégation est du type 1:1. La probabilité de la combinaison génique homozygote est de 1/4 en F2. Il en découle théoriquement un gain de temps pour un programme de sélection. Admettons par exemple, qu'un caractère sélectionné est déterminé par 7 couples d'allèles indépendants. La probabilité de la combinaison génique est de $(1/2)^7 = 1/16384$ dans la génération F2. Si nous voulons avoir 95% de chances de tirer au moins une fois la combinaison génique recherchée, il faut analyser 385 plantes haploïdes ou une population F2 de 49082⁺ plantes. Cet avantage diminue quand on compare la ségrégation de la génération haploïde à la ségrégation d'une population de plantes en génération plus avancée.

⁺ Ce calcul se fait en utilisant la courbe cumulée de la loi de Poisson et en posant que $1-Pr(0)=0,95$ et $Pr(0) = e^{-np}$ d'où on tire n .

Evidemment, cette situation est très théorique, car elle suppose que dans la ségrégation de la génération haploïde, chaque combinaison génique donne une plante ce qui n'est pas du tout réalisé. NEI (1963) a tenu compte de la perte des combinaisons géniques par la méthode des plantes haploïdes et a montré les limites de l'haploïdie en sélection. Nous développerons plus loin son raisonnement.

5°) Des lignées homozygotes peuvent être produites sans qu'elles aient subi l'influence d'une pression de sélection due à l'environnement local. En d'autres termes, il est possible d'obtenir de nouvelles lignées en un lieu donné pour les tester à n'importe quel endroit du monde (JONES cité par KASHA et REINBERGS, 1976).

6°) Par simulation sur ordinateur, FEYT et PELLETIER, en 1976, proposent l'utilisation des haploïdes pour mesurer le progrès accompli par la sélection au niveau diploïde, celle-ci devant se poursuivre tant que la valeur moyenne des haploïdes augmente.

7°) Enfin, les niveaux d'intervention peuvent être plus spécifiques tels que :

- augmentation de la durée de floraison chez certaines plantes ornementales à l'état haploïde (KOSTOFF, 1941),
- création de monosomiques par croisement haploïde x diploïde (SEARS, 1939),
- fusion somatique de cellules haploïdes pour l'obtention d'hybrides diploïdes vigoureux par effet d'hétérosis (MELCHERS et LABIB, 1974),
- stabilisation de croisements interspécifiques
- obtention de l'homozygotie des gènes pour lesquels cet état est difficile à obtenir, tels que des allèles d'auto-incompatibilité,
- obtention de variants par suite du passage à l'état haploïde qui a pour effet de modifier les situations épigéniques et donc d'influer sur l'expression du génome (Y. DEMARLY, Comm. pers., 1983, - SAN NOEUM et AHMADI, 1982).

- utilisation dans des schémas de sélection récurrente pour transformer les arrangements génétiques avant les tests, et pour l'amélioration des populations (GALLAIS, 1978)

Quoiqu'il en soit, la liste des espèces, pour lesquelles il est possible d'induire l'haploïdie, devient importante avec des applications aussi diverses (NITZSCHE et WENZEL, 1977), grâce aux nombreux progrès accomplis dans ce domaine depuis une décennie (WENZEL, 1980)

b) Les limites théoriques de l'haploïdie en amélioration des plantes

Précédemment, nous avons montré la valeur unique de l'haploïde doublé à cause de son état homozygote. Mais, en considérant le génotype de cet haploïde doublé obtenu à partir d'une F1 ou des générations suivantes, des réserves sont à formuler :

- les haploïdes doublés obtenus ne sont pas le reflet de la ségrégation gamétophytique car de nombreuses combinaisons haploïdes ne donnent pas de plantes alors que lors de la fécondation, tous les gamètes ont la même chance. Suivant ce raisonnement, NEI (1963) a introduit la comparaison de la méthode haploïde avec la méthode classique qui utilise l'autofécondation appelée méthode diploïde. Tenant compte de la perte de combinaisons haploïdes, NEI a estimé le rendement de la méthode haploïde en comparaison avec la méthode diploïde. Si P1 est la proportion de plantes haploïdes sur le nombre de fleurs pollinisées, et si P2 est la proportion de plantes haplodiploïdisées obtenues sur le nombre de plantes haploïdes, le rendement de la méthode haploïde peut

être estimé en F2 à :
$$E = \frac{P1 P2 \left(\frac{1}{2}\right)^n}{\left(\frac{1}{4}\right)^n} = P1 P2 2^n$$
, n étant le nombre

d'allèles indépendants de la ségrégation.

Pour que la méthode haploïde soit rentable, il faut que E soit supérieur à 1, en conséquence, il faut que P1P2 soit supérieur à $\left(\frac{1}{2}\right)^n$. On voit que la méthode haploïde est d'autant plus efficace que n est grand. Si le nombre d'allèles en sélection est grand, la méthode haploïde est efficace même avec une valeur faible P1P2.

NEI suggère que l'on peut prendre en considération une valeur critère pour P1P2 qui prend comme base le nombre haploïde de chromosomes. Pour l'orge, $n = 7$, P1P2 doit être supérieur à 0,78%. Pour les générations suivantes F3, F4, .. etc, P1P2 doit être égal ou supérieur à

$\left(\frac{2^{g-1}-1}{2^{g-1}}\right)^n$; g étant la génération. On démontre qu'en F3, P1P2 doit

être supérieur à $\left(\frac{3}{4}\right)^n$, c'est à dire que pour l'orge P1P2 doit être supérieur à 13,35%. En F4, P1P2 $> \left(\frac{7}{8}\right)^n$ soit pour l'orge P1P2 $> 39,27\%$.

Ce raisonnement reste cependant théorique, car nous ignorons le nombre d'allèles en jeu dans un phénotype sélectionné, et de plus, ils ne sont pas tous indépendants.

Par simulation sur ordinateur, WALSH (1974) conclue que la sélection pédigrée fournit des résultats supérieurs à ceux d'une population haploïde issue uniquement de la F1, pour autant que l'héritabilité est élevée ; dans le cas où l'effet dû au milieu est important, les deux types de sélection ont une efficacité équivalente. Cependant, cette analyse n'est pas suffisante au regard du temps gagné par l'utilisation de l'haploïdie (HERMSEN, 1974).

SNAPE (1976) et RIGGS et SNAPE (1977) concluent que la méthode de filiation unipare (du terme anglo-saxon : Single Seed Descent ou SSD), est plus efficace que celle des haploïdes doublés quand il y a présence de linkage, du fait que les possibilités de recombinaison sont plus importantes qu'en une seule génération.

11.3. Haploïdie et recherche fondamentale

Les intérêts de l'haploïdie en recherche fondamentale ne seront abordés que brièvement :

- Etudes des relations entre quantité de DNA et phénotype de la plante (DAVIES, 1979)
- les haploïdes peuvent être utilisés pour déterminer le degré d'homologie dans un génome ou entre génomes
- En culture de cellules ou de protoplastes, les haploïdes fournissent un système idéal pour l'étude des phénomènes de biosynthèse, de transfert de gènes, de réactions hôte-agent pathogène et d'incompatibilités chromosomiques ou cytoplasmiques (JENSEN, 1977)
- les haploïdes peuvent faciliter les études caryologiques (DE JONG et DE BOCK, 1978)

III. LES DIFFERENTES ORIGINES POSSIBLES DES PLANTES

HAPLOIDES

Les plantes haploïdes existent naturellement dans toutes les populations à une fréquence très faible. Les différents mécanismes qui y conduisent sont exposés. L'exploitation expérimentale de ces mécanismes a abouti à deux grands types de méthodes : l'une qui consiste à cultiver la microspore ou l'ovule, isolé ou contenu dans les tissus environnants, sur un milieu de culture et à les dévier de leur développement normal pour obtenir un embryon ; ce sont les haploïdes induits in vitro à partir de la culture des gamétophytes. L'autre qui consiste à dévier le développement normal du gamétophyte dans la plante ; ce sont les haploïdes induits in situ. Nous développerons les différentes techniques de ces deux méthodes. (schéma 1).

III.1 Les haploïdes spontanés

Ce sont des cas courants dans la nature et ils se réalisent avec une fréquence faible caractéristique de l'espèce ou de la lignée.

a) La polyembryonie

Chez de nombreuses espèces lors de la germination des graines, il est possible d'obtenir deux plantes jumelles dont l'une est diploïde,

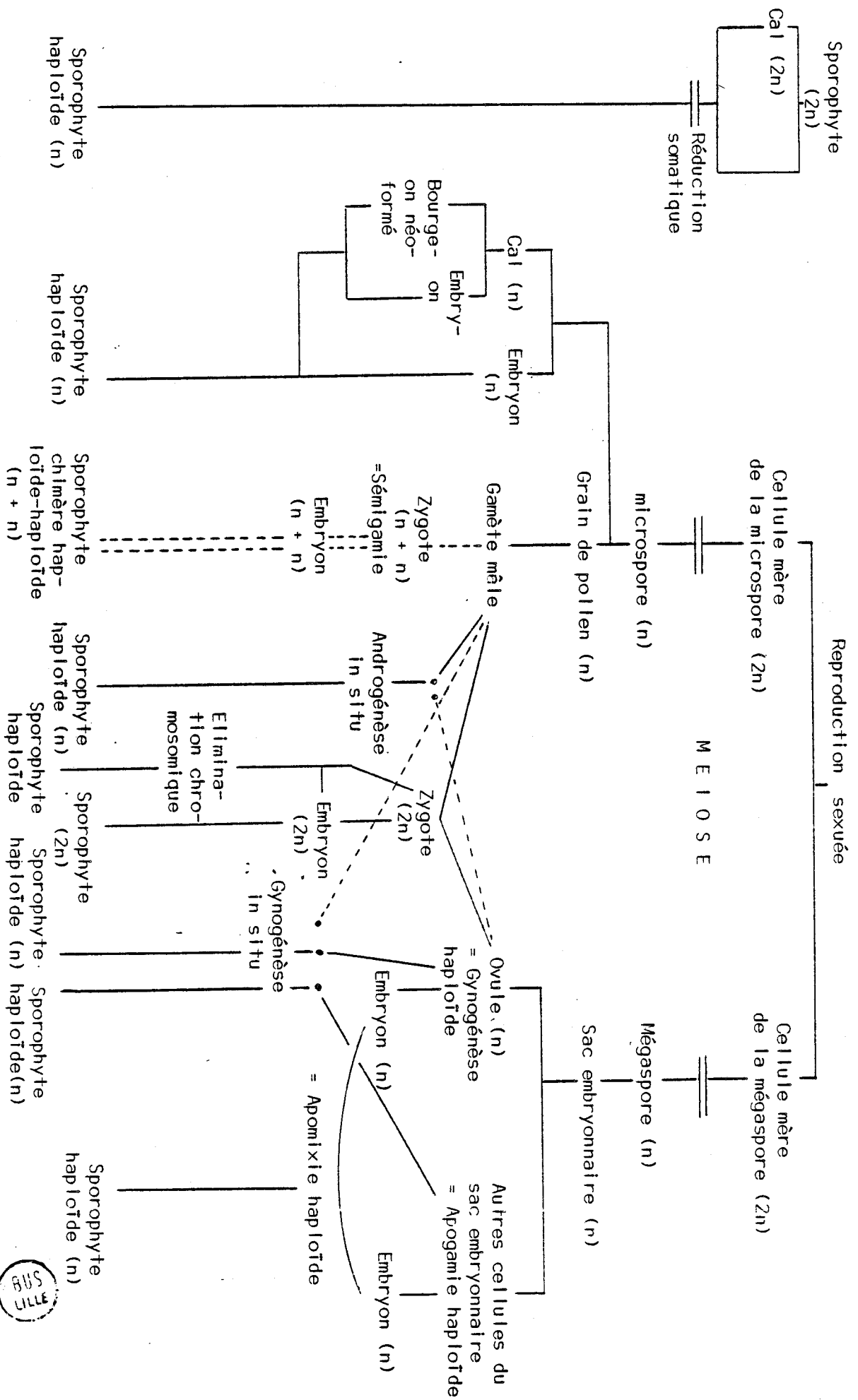


Schéma 1 : Origine de l'haploïdie dans le cycle sexuée et le sporophyte (d'après de FOSSARD, 1974, modifié par nous-même).

BIBLIOTHEQUE

l'autre quelquefois haploïde. Cette dernière proviendrait de la prolifération d'une des synergides ou d'une cellule antipodiale. Des différences assez importantes ont été constatées dans la fréquence d'apparition de ces embryons doubles (KRUSE, 1980). Il est possible d'augmenter leur valeur par sélection (CAMPOS et MORGAN, 1960). Un cas nouveau vient d'être signalé chez *Aegilops squarrosa* L. (DOSBA et al, 1979).

b) La semigamie

Il s'agit d'un type anormal de fécondation car le noyau mâle pénètre dans l'oosphère mais la fusion ne se produit pas de sorte que les deux noyaux se divisent indépendamment ; ainsi l'embryon est une chimère de secteurs haploïdes d'origine maternelle et paternelle. Ce type d'haploïde est particulièrement utilisé chez le coton (*Gossypium barbadense* L.) où il donne des résultats intéressants (TURCOTTE et FEASTER, 1974).

c) Gynogénèse et androgénèse

Juste après pénétration du noyau du gamète mâle dans l'ovule, un seul des deux noyaux, femelle dans le cas de la gynogénèse, mâle dans le cas de l'androgénèse, participe au développement de l'embryon. En général, les taux d'androgénèse sont inférieurs à ceux de la gynogénèse (LACADENA, 1974). De nombreux cas ont été décrits : chez l'orge (TSUCHIYA, 1962), la betterave (FISHER, 1962), le blé (LACADENA et RAMOS, 1968), l'asperge (MARKS, 1973), le chou (THOMPSON, 1969), le piment (NOVAK et BETLACH, 1969), mais c'est chez le maïs que les résultats furent plus intéressants où une sélection pour la gynogénèse a été effectuée (CHASE, 1952), ce qui a permis de faire passer chez certaines lignées le taux de plantes haploïdes de 1 à 18/1000 (CHASE, 1969).

Bien que beaucoup de cas de phénomènes spontanés aient été cités dans la littérature, les applications directes en amélioration des plantes sont restées très sporadiques du fait de la faible fréquence d'apparition de ce type d'haploïdes.

III.2. Les haploïdes induits in vitro à partir de la culture des gamétophytes

a) Culture in vitro des gamétophytes mâles

Beaucoup de travaux ont été réalisés dans ce domaine et ont permis la production d'haploïdes pour un nombre important d'espèces (DEMARLY, 1975 - CLAPHAM, 1977 - NITZSCHE et WENZEL, 1977 - SUNDERLAND, 1979 - MAHESHWARI et al., 1982 - HU et al., 1983).

En général, les taux d'obtention d'haploïdes sont faibles mais chez certaines espèces, cette méthode est utilisée pour leur amélioration : le blé (de BUYSER et al, 1981 - HU HAN, 1978 - SCHAEFFER et al, 1979 - SHIMADA, 1981), le maïs (MIAO et al, 1978 - BRETFEL et al, 1981), le seigle (WENZEL et al, 1977), le riz (HAI-MAN, 1978 - KINOSHITA, 1983 - ZAPATA et al., 1983), l'asperge (DORE, 1978), le piment (DUMAS de VAULX et al., 1981 - SIBI et al., 1980), le colza (KELLER et ARMSTRONG, 1978) la pomme de terre (WENZEL et UHRIG, 1981 - MIX, 1983) le tabac (COLLINS et LEGG, 1979).

Chez l'orge, les premiers travaux ont débuté avec CLAPHAM (1971 et 1973) puis ont été continués par FOROUGHI-WEHR et al., (1976) et par XU et al., 1982). Trois obstacles ont freiné le développement de cette méthode dans les programmes de sélection de l'orge :

- le faible taux de plantes haploïdes produites par rapport au nombre d'anthères mises en culture
- l'obtention de plantes albina dans des proportions élevées (MIX et al., 1978)
- les différences importantes entre génotypes de plantes pour l'aptitude à l'androgénèse avec la mise en évidence d'un facteur génétique héritable (FOROUGHI - WEHR et al., 1982).

b) culture in vitro des gamétophytes femelles

Des tissus haploïdes à partir de gamètes femelles de

Gingko biloba L. ont été décrits par TULECKE en 1964 puis des divisions de cellules haploïdes d'ovules de *Solanum melongena* et des cals d'ovaires de *Zea mays* ont été obtenus par UCHIMIYA et al., 1971. Très récemment, des plantes haploïdes gynogénétiques ont été produites chez l'orge (SAN NOEUM, 1976) par culture in vitro d'ovaires non fécondés mais aussi chez le riz (ASSELIN de BEAUVILLE, 1980 - CHANG et HONG-YUAN, 1981 - CHUNG-SHEN, 1982) le blé et le tabac (ZHONGEHUN et HAISHAN, 1979), le gerbera (SITBON, 1981), la betterave (D. BOUSSOUTROT, Comm. pers., 1982).

III.3. Les haploïdes induits in situ

Divers traitements ont permis d'augmenter sensiblement chez certaines espèces le taux d'haploïdes in situ ; en général ; le noyau du gamétophyte mâle subit un traitement physique ou chimique destiné à empêcher la formation des deux noyaux spermatiques (RAQUIN, 1980).

a) les traitements physiques

- la pollinisation retardée de plusieurs jours après castration, les chocs thermiques permettent d'augmenter le taux d'haploïdes spontanés (KIHARA, 1940 - SEANEY, 1955 - MUNTZING, 1937 - NORDENSKIOLD, 1939).

- l'irradiation du pollen par rayons X ou radioisotopes pour induire des haploïdes, a été appliquée à plusieurs reprises : sur *Nicotiana tabacum* (BADENHUIZEN, 1941), *Triticum persicum* et *T. dicoccum* (YEFEIKIN et VASILEV, 1936), *T. monococcum* (KATAYAMA, 1934).

b) les traitements chimiques

Des produits divers ont été utilisés (YASUDA, 1940 - DEANON, 1957) mais les résultats les plus intéressants ont été obtenus par certains produits antimitotiques tels que le protoxyde d'azote (DUMAS de VAULX et POCHARD, 1974).

c) Interaction cytoplasme-noyau

MAZOTI et MUALENBERG (1958) ont observé une augmentation

du taux d'haploïdes lorsque le maïs est utilisé comme parent mâle en croisement avec la *Téosinte*.

Des résultats similaires ont été décrits par KIHARA et TSUNEWAKI (1962) chez le blé à partir du croisement *Aegilops caudata* x *Triticum aestivum*. D'autres cytoplasmes ont été plus récemment décrits, pour avoir les mêmes effets (TSUNEWAKI et al., 1974).

d) La voie génétique

Par suite de traitements mutagènes, un gène "initiateur d'haploïdie" nommé gène "hap" a été récemment décrit chez l'orge (A. HAGBERG et G. HAGBERG, 1980). L'origine possible des haploïdes pourrait être de nature gemellaire et/ou résultant d'une fragmentation et élimination totale ou partielle d'un génome (TSUCHIYA et SHAHLA, 1982). Dans la descendance de l'homozygote hap/hap, des taux de 30 à 40% d'haploïdes ont été observés, mais chez l'hétérozygote hap/+, ces taux sont nettement plus faibles, de l'ordre de 3 à 6% ce qui rend difficile, pour le moment, l'application de cette voie dans un programme de sélection (G. HAGBERG, et A. HAGBERG, 1982).

e) La réduction somatique

La réduction somatique représente une étape unique, préanaphasique de séparation de génomes ou de groupes de chromosomes en deux ou plusieurs groupes pendant la mitose ou même la méiose (KASHA, 1974).

Des cellules somatiques à nombre réduit de chromosomes avaient été signalées par HUSKINS (1948) dans les méristèmes racinaires d'oignon, cité par KASHA (1974). Des traitements physiques ou chimiques peuvent augmenter les fréquences de ces réductions somatiques : ainsi NIFZSCHE (1973) note l'action de la 3 fluorophénylalanine appliquée sur deux clones d'hybrides intergénériques *Festuca pratensis* x *Lolium*

multiflorum ($2n = 4x = 28$) et il constate que 80% des cellules contiennent un nombre euploïde réduit de chromosomes, et YOSHIDA et YAMAGUCHI (1973) signalent que le chloramphénicol peut faire passer de $2n$ à n , le nombre de chromosomes dans les cellules méristématiques racinaires d'orge. Dans des cellules hybrides d'origine animale, il est même possible d'induire spécifiquement la perte d'un lot de chromosomes de l'un des parents par traitement aux rayons X ou γ des cellules avant fusion (PONTECORVO, 1971).

Toutefois, l'action de ces traitements semblent dépendre de l'espèce et/ou de l'état de ploïdie (FUKUI et NIIZEKI, 1983).

f) L'hybridation interspécifique ou intergénérique

L'hybridation d'une espèce par une autre espèce peut induire la formation d'haploïdes. Toutefois, les origines de ces haploïdes peuvent être différentes. C'est ainsi que dans le croisement *Solanum* ($2n = 4x = 48$) x *S. phureja* ($2n = 2x = 24$), les haploïdes parthénogénétiques seraient la conséquence de la deuxième mitose pollinique qui se déroule dans le tube pollinique de *S. phureja*. Cette mitose donne un unique noyau spermatique de restitution qui féconde les deux noyaux polaires ; l'albumen est ainsi haxaploïde et la double fécondation n'ayant pas lieu, l'oosphère peut donner un embryon haploïde (HOUGLAS, 1964 cité par PERENNEC, 1982).

Les plantes haploïdes apparaissent aussi dans les croisements interspécifiques à l'intérieur du genre *Hordeum* mais dans ce cas, l'haploïdie a son origine dans l'élimination des chromosomes de l'un des parents lors des premières mitoses du zygote : le croisement est le suivant, *Hordeum vulgare* x *Hordeum bulbosum* (H.v. x H.b.). L'excellent rendement en plantes haploïdes en comparaison en particulier, avec les haploïdes issus de l'androgénèse (cf III.2.a) a conduit KASHA et KAO (1970) à introduire ce croisement dans les schémas de sélection de l'orge. Tout notre travail consiste dans l'amélioration de cette technique et son adaptation aux orges d'hiver. Nous développons plus loin, l'historique de la technique et les mécanismes cytologiques qu'elle met en jeu.

Nous voulons ici insister sur le fait que l'élimination d'un génome haploïde n'est pas la propriété du seul croisement H.v. x H.b. . CAUDERON Y. et CAUDERON A. (1956) ont signalé un cas d'haploïdie à partir du croisement *Hordeum bulbosum* x *Hordeum secalinum*; et plus récemment, KASHA (1974) et SUBRAHMANYAN (1977, 1979, 1980) ont signalé près d'une vingtaine de combinaisons interspécifiques montrant le phénomène d'élimination chromosomique. Par croisement intergénérique de l'orge avec le seigle (*Secale cereale* L.), KRUSÉ (1967) et FEDAK (1977a et b) ont obtenu des haploïdes d'orge mais à des taux cependant faibles.

D'autres cas d'élimination chromosomique ont été signalés dans les genres *Nicotiana* (GUPTA et GUPTA, 1973), *Triticum* (BARCLAY, 1976 - FINCH et BENNETT, 1982) *Aegilops* (CHAPMAN et MILLER, 1977) *Cucumis* (DUMAS de VAULX, 1979).

IV. L'HAPLOÏDISATION DE L'ORGE PAR CROISEMENT INTERSPECIFIQUE AVEC HORDEUM BULBOSUM

IV.1. Historique

Depuis longtemps, les sélectionneurs se sont intéressés à l'espèce *Hordeum bulbosum* dans le but de transférer certains caractères chez l'orge cultivée, mais ce n'est qu'en 1951 que KONZAK et al. obtinrent onze hybrides entre l'orge diploïde et *Hordeum bulbosum* tétraploïde, par le biais de la culture d'embryon ; ces auteurs avaient en effet noté une dégénérescence précoce des caryopses issus du croisement interspécifique.

En essayant d'améliorer le rendement de ce croisement interspécifique, DAVIES (1958) croise *Hordeum bulbosum* 4x x *H. vulgare* 4x et il isole trois plantes 2x (dihaploïdes) de morphologie *H. vulgare*. Il en déduit que ces plantes ont été obtenues par androgénèse. RAJHATHY (1967) constate que la F1 de ce même croisement est composée de plantes dont le nombre chromosomique varie entre 2x et 4x et conclue à l'élimination de chromosomes lors de la formation de ces plantes.

LANGÉ (1968 et 1969) et SYMKO (1969) montrent que l'élimination des chromosomes se fait préférentiellement pour les chromosomes d'*Hordeum bulbosum*. Mais KAO et KASHA (1969) et KASHA et KAO (1970) précisent que

L'élimination se fait uniquement pour les chromosomes d'*Hordeum bulbosum* pendant les premières divisions somatiques du zygote et ces auteurs utilisent le croisement comme une méthode d'obtention d'haploïdes.

Le principe de la méthode est ainsi le suivant : *Hordeum bulbosum* est utilisé comme parent mâle dans le croisement avec l'orge cultivée. La double fécondation se produit mais dans les premiers jours suivants, les chromosomes de l'espèce sauvage sont éliminés de sorte que les cellules du zygote ne possèdent qu'un seul génome : celui du parent femelle en l'occurrence l'orge cultivée. Toutefois, il est nécessaire de cultiver cet embryon stérilement sur un milieu de culture avant qu'il n'avorte (LANGE, 1971 a) pour obtenir une plante haploïde qu'il sera nécessaire de diploïdiser pour restaurer la fertilité.

En fait, le parent mâle n'intervient que pour induire la formation d'un embryon duquel seront éliminés les chromosomes de l'espèce sauvage.

IV. 2 Contrôle de l'élimination chromosomique

Dans les embryons issus du croisement entre les deux espèces diploïdes VV x BB, (où V et B représentent respectivement le génome d'*Hordeum vulgare* et d'*H. bulbosum*), SUBRAHMANYAM et KASHA (1973) en notant le nombre de cellules haploïdes et aneuploïdes concluent que l'élimination des chromosomes d'*Hordeum bulbosum* a lieu d'une manière progressive. C'est ainsi que 3 à 5 jours après pollinisation, 40% des cellules en division sont haploïdes mais onze jours après, ce pourcentage monte à 94%. Le croisement réciproque BB x VV est possible et le génome d'*Hordeum bulbosum* est éliminé, ce qui permet d'obtenir le transfert du génome d'*Hordeum vulgare* dans le cytoplasme d'*Hordeum bulbosum* et d'en étudier les effets (SADASIVAIAH et KASHA, 1973 - JOHNS et HARVEY, 1974).

Les auteurs ont étendu leurs investigations à toutes les combinaisons possibles entre *Hordeum vulgare* 2x ou 4x et *Hordeum bulbosum* 2x ou 4x. Les résultats de ces croisements sont donnés dans le tableau I et montrent que, si au niveau du zygote, le nombre de génomes d'*Hordeum vulgare* est supérieur ou égal à ceux d'*H. bulbosum*, les chromosomes d'*H. bulbosum* sont éliminés. Par contre, si le nombre de génomes d'*H. bulbosum* est supérieur à celui d'*Hordeum vulgare*, cette élimination ne

se produit pas. Ces observations ont permis à SUBRAHMANYAM et KASHA (1973) d'introduire la notion de "balance génomique" entre les deux espèces: pour l'élimination des chromosomes des cellules du jeune embryon.

Constitutions génomiques du			Effets au niveau des divisions ultérieures du zygote
parent femelle	parent mâle	zygote	
VV	BB	VB	B est éliminé (KASHA et KAO, 1970) (SUBRAHMANYAM et KASHA, 1973)
BB	VV	BV	
VV	BBBB	VBB	Stable (LANGE, 1971 a et b)
BBBB	VV	BBV	
VVVV	BB	VVB	B est éliminé (KAO et KASHA, 1969 SUBRAHMANYAM et KASHA, 1973)
BB	VVVV	BVV	
VVVV	BBBB	VVBB	BB est éliminé (FUKUYAMA et TAKAHASHI, 1976 FUKUYAMA et HASOYA, 1981)
BBBB	VVVV	BBVV	

Tableau 1 : Effets des combinaisons génomiques entre *H. vulgare* (2x ou 4x) et *H. bulbosum* (2x ou 4x) sur l'élimination des chromosomes d'*H. bulbosum* dans les premières divisions du zygote.

Il convient toutefois, de souligner que des études plus récentes modifient les données du tableau 1 :

- sous certaines conditions que nous décrivons ultérieurement, il est possible d'obtenir en proportion importante des plantes hybrides VB. Chez ces plantes hybrides, l'instabilité chromosomique demeure cependant, et elle dépend : du tissu considéré (NODA et KASHA, 1981 b), de facteurs physiques tels que la température (HUMPHREYS, 1978) ou chimiques tels que l'application du cycloheximide, substance inhibitrice de la synthèse

protéique, dont l'action se situerait en fin de prophase du cycle de division mitotique de la cellule hybride (WHEATLEY et KASHA, 1982 a et b).

- NODA et KASHA (1981 a) montrent que le phénomène d'élimination chromosomique peut se produire, à des taux plus faibles certes, dans les cellules méristématiques de plantes triploïdes de constitution génomique VBB.

- des hybrides relativement stables de constitution génomique BBVV sont rapportés jusqu'à des cycles successifs d'autofécondation élevés (SZIGAT et WUSTRACK, 1976 et 1979). Alors que PICKERING (1979 a) signale que même chez l'amphiploïde VVBB, l'élimination des deux génomes BB se produit.

Au niveau de l'albumen, SUBRAHMANYAM et KASHA (1973) ont classé la stabilité des cellules de l'albumen dans l'ordre suivant :

BBBBV > BBV, BBBBV > VVBB > VVB ; la combinaison BBBBV étant la plus stable. Ces observations seraient en accord avec l'hypothèse d'une "balance génomique" intervenant sur l'élimination chromosomique.

Les travaux de BARCLAY et al. (1972) puis de HO et KASHA (1975) ont montré qu'au moins trois gènes situés sur les chromosomes 2 et 3 de l'orge étaient impliqués, dans le contrôle de l'élimination chromosomique. En fait, comme de nombreux auteurs l'ont signalé, les génotypes des deux espèces influencent cette élimination (JENSEN, 1976 et 1982 - PICKERING et HAYES, 1976 - SIMPSON et al., 1980), et il apparaît nécessaire de sélectionner des souches d'*Hordeum bulbosum* afin d'augmenter la production d'haploïdes (KASHA et REINBERGS, 1979 - SIMPSON et al., 1980). En dépit du fait que cette élimination soit contrôlée génétiquement au moins par trois gènes, la nature même du mécanisme est tout à fait spéculative. Les observations cytologiques faites essentiellement dans les tissus à intense division mitotique : embryons, albumen, régions méristématiques, révèlent l'existence d'anomalies tels que des chromosomes non groupés en plaque métaphasique (BENNETT et al., 1976); des chromosomes retardataires et ponts anaphasiques (LANGE, 1971 b - BENNETT et al., 1976), des fragments de chromosomes, chromatine dégradée et micronoyaux (SUBRAHMANYAM et KASHA, 1973) ou des fuseaux multipolaires (LANGE, 1971 b - BENNETT et al., 1976 - ORTON et TAI, 1977).

Les hypothèses relatives au mécanisme d'élimination chromosomique sont les suivantes :

- les chromosomes non groupés en plaque métaphasique deviendraient chromosomes retardataires en anaphase, puis donneraient des micronoyaux à l'interphase. C'est ainsi que l'absence de groupement de quelques chromosomes en prométaphase apparaît comme la principale cause de l'élimination chromosomique en mitose (NODA et KASHA, 1981 b). Cette hypothèse est compatible avec celle de ORTON et TAI (1977), relatant des anomalies au niveau du fonctionnement du fuseau.

- la perte de chromosomes pourrait être liée à des durées de cycle mitotique différentes entre les deux espèces provoquant des divisions asynchrones des deux génomes dans la cellule hybride (GUPTA, 1969 - LANGE, 1971 b - SUBRAHMANYAM et KASHA, 1973).

- la troisième hypothèse proposée par DAVIES en 1974 a été élaborée à partir d'observations faites sur les microorganismes (SAGER et RAMANIS, 1973). L'élimination d'un génome d'une espèce pourrait être contrôlée par les chromosomes de l'autre espèce, c'est à dire que les produits du génome d'*Hordeum vulgare* auraient à reconnaître et à assurer la dégradation des chromosomes d'*Hordeum bulbosum*.

Le contrôle génétique de l'élimination chromosomique interfère avec des facteurs de l'environnement ; c'est ainsi que le taux de plantes hybrides VB obtenues est significativement plus important lorsque les croisements sont réalisés en serre en hiver (PICKERING et MORGAN, 1978), ou en été en conditions naturelles (PICKERING et MORGAN, 1979a).

L'élimination chromosomique apparaît donc comme une étape primordiale pour la production d'haploïdes et il convient de se placer dans les conditions optimales pour ce facteur clef ; toutefois, d'autres facteurs peuvent limiter cette production et nous allons en préciser leur nature.

IV.3 Les facteurs génétiques limitatifs de la technique

a) L'incompatibilité de fécondation

Plusieurs cas d'incompatibilité se traduisant par des réductions importantes des taux de nouaison ont été signalés (PICKERING et HAYES, 1976 - PICKERING, 1979 a, b et 1980a - SIMPSON et al., 1980 - LUK'YANYUK et al., 1980 - JENSEN, 1982).

Des études cytologiques récentes révèlent l'existence de deux types d'anomalies chez ces croisements incompatibles : en général, le tube pollinique s'élargit puis éclate dans les tissus du style avant de parvenir au micropyle, mais dans un autre cas, celui du croisement *Hordeum vulgare* cv *Tyra* x *H. bulbosum*, la progression du tube pollinique est simplement bloquée (PICKERING, 1982a).

Toutefois, il est possible de surmonter partiellement ce problème en utilisant différentes souches d'*Hordeum bulbosum* (PICKERING et MORGAN, 1979b); des méthodes physiques ou chimiques utilisées avec succès dans d'autres cas et citées par Y. CAUDERON (1981) n'ont pas permis de diminuer les taux d'incompatibilité (PICKERING, 1979 a).

b) la qualité des caryopses issus du croisement interspécifique

Recentment, PICKERING (1983a) a montré que le génotype de l'orge utilisée comme parent femelle avait une influence sur la qualité des caryopses formés. Les variétés *Dissa* et *Sultan* présentent, en effet, des taux de caryopses dégénérés plus élevés que d'autres variétés. Qui plus est, une influence saisonnière contribue à diminuer la production annuelle d'haploïdes (HO et al., 1978a, - PICKERING, 1980b

c) la différenciation des embryons

La difficulté du développement constatée chez les embryons de taille très petite (NORSTOG, 1967 - MONNIER, 1973 - KRUSE, 1974), et/ou ne présentant pas ou peu de différenciation (ISLAM et SPARROW, 1973 - PICKERING et MORGAN, 1979a) font qu'il est nécessaire d'obtenir les conditions optimales pour la différenciation des embryons.

Cette différenciation est sous l'influence du génotype des deux parents (NOVAK et al., 1977 - PICKERING, 1980b) ; très récemment, une souche d'*Hordeum bulbosum* induisant une grande proportion d'embryons indifférenciés a été identifiée (PICKERING, 1983b).

d) L'obtention in vitro des plantes

Plusieurs auteurs signalent l'influence du génotype de l'orge sur la faculté de développement de l'embryon haploïde en jeune plante (NOVAK et al., 1977 - SIMPSON et al., 1980 - FOROUGH, WEHR et al., 1981). D'autre part, il semble peu probable que le génotype d'*Hordeum bulbosum* intervienne, car au moment où les embryons sont cultivés, les chromosomes d'*Hordeum bulbosum* ont déjà été éliminés et de ce fait, leur effet ne peut être que faible ou nul sur le développement ultérieur de la plante (PICKERING et MORGAN, 1983 - SIMPSON et al., 1980). D'autres auteurs ont toutefois observé l'inverse (NOVAK et al., 1977).

e) le doublement des chromosomes

ADAMSKI (1979 a), dans son étude statistique, note des différences entre génotypes d'orge sur leur aptitude au doublement de leur génome. Une interaction génotype x traitement chimique est même signalée. Des résultats similaires ont été récemment décrits chez des hybrides blé - seigle (OETTLER, 1982).

IV.4. L'incorporation de la méthode *bulbosum* dans les schémas de sélection

Pour être applicable en sélection, la méthode de production de lignées homozygotes via l'haploïdie telle que la méthode *bulbosum*, doit répondre à un certain nombre de critères définis par SNAPE (1982) et qui ont été analysés par différents auteurs ; ces critères sont les suivants :

- facilité d'obtention d'un grand nombre d'haploïdes doublés de tous les génotypes

Cette condition apparaît comme primordiale car il est essentiel de produire un nombre suffisant d'haploïdes doublés pour apprécier la valeur d'un croisement sur des lignées représentant une variabilité large. Le nombre d'haploïdes doublés doit dépendre du degré d'avancement en sélection des lignées que l'on désire fixer : par exemple, si l'on utilise un hybride F1, chaque haploïde doublé issu de cet hybride représente un génotype unique de sorte qu'il sera nécessaire d'en tester un grand nombre. Par contre, s'il s'agit d'un matériel plus avancé, en F3 ou F4, le nombre d'haploïdes doublés requis, sera moins important du fait qu'ils seront plus proches génétiquement les uns des autres car moins de gènes sont en ségrégation. Il semble d'après plusieurs auteurs que des lignées en F2 soient à ce propos le matériel le plus intéressant pour produire des haploïdes doublés dans un programme de sélection au regard du temps gagné et des résultats obtenus (SNAPE et SIMPSON, 1981 - CHOO et REINBERGS, 1982).

La relative facilité d'obtention d'haploïdes d'orge par la méthode *bulbosum* décrite par KASHA et KAO en 1970 peut être également utilisée pour un programme de sélection annuel selon REINBERGS et al., (1976). En effet, ces auteurs ont montré qu'un minimum de vingt haploïdes doublés par croisement, est suffisant pour détecter les croisements à haut potentiel de rendement. Il sera donc avantageux de constituer un grand nombre d'hybrides intraspécifiques d'orge d'où seront extraits une vingtaine de plantes haploïdes doublées plutôt que de constituer un petit nombre de combinaisons hybrides intraspécifiques avec un grand nombre de plantes haploïdes doublées.

- Les haploïdes doublés doivent être stables cytologiquement et phénotypiquement normaux

En effet, des anomalies telles que la formation d'aneuploïdes et de déficiences chlorophylliennes, assez fréquemment rencontrées en androgénèse, diminuent la crédibilité de la méthode.

Des variants phénotypiques ont été signalés dans les descendances des haploïdes doublés d'orge, portant sur des caractères morphologiques et physiologiques (ADAMSKI, 1979 b; - JOHNS et REINBERGS, 1973) probablement dus aux effets mutagènes du traitement d'haplodiploïdisation, bien qu'aux doses habituelles d'emploi, ce traitement n'ait pas d'effet sur la méiose des plantes traitées (FINCH et BENNETT, 1979). Ces variants restent, tout au moins pour la méthode *bulbosum*, dans des limites faibles (PICKERING, 1980b).

D'autre part, l'homozygotie complète obtenue par doublement des haploïdes ne diminue pas les qualités agronomiques des haploïdes doublés, quand on les compare aux cultivars issus des mêmes croisements et obtenus par des méthodes classiques de sélection (REINBERGS et al., 1976 - PARK et al., 1976 - REINBERGS et al., 1978 - FEDAK, 1976). Toutefois, chez le tabac, certains auteurs ont constaté le contraire (BROWN et WERNSMAN, 1982), mais on peut se demander si cette hétérozygotie "résiduelle" n'apporterait pas une plus grande souplesse d'adaptabilité aux conditions variables de l'environnement et comme le prétend VINCENT (Comm.pers., 1983) le gain de temps que pourraient offrir les haploïdes doublés se fait au détriment d'une sélection bénéfique soumise à ces conditions variables de l'environnement que l'on a plus de chances de rencontrer sur une dizaine d'années dans le cas de la méthode classique.

- Les haploïdes doublés doivent représenter un échantillonnage aléatoire des gamètes

C'est à dire qu'aucune sélection ne doit se faire dans l'obtention de ces haploïdes doublés. Ce critère est bien entendu difficile à observer en pratique, mais il est toutefois possible d'étudier les ségrégations de quelques caractères dans les haploïdes doublés tirés d'un même croisement.

Dans ce cas, JOHNS et REINBERGS (1973) ont pu montrer que l'éventail phénotypique des plantes haploïdes doublés, reproduit assez bien l'éventail de la ségrégation gamétique. Une variabilité importante peut être maintenue par cette méthode de production d'haploïdes doublés (SONG et al., 1978 - CHOO et al., 1982).

Cependant, TURCOTTE et al., (1980), comparant les haploïdes doublés obtenus par rapport aux plantes obtenues par sélection classique, montrent que ces haploïdes doublés sont supérieurs pour des caractères quantitatifs, tels que le rendement. Ces auteurs pensent que cette supériorité est liée à une sélection sur la vigueur des haploïdes obtenus par culture in vitro d'embryons.

IV.5 Etat actuel de l'utilisation de la méthode dans la sélection

Actuellement, la méthode *bulbosum* est utilisée dans des programmes de sélection d'orge de printemps essentiellement, (KASHA et REINBERGS, 1982) et dans certains organismes, toute la sélection est basée sur cette méthode (HO et al., 1978 a). En 1977, CIBA GEIGY produisait jusqu'à 38 haploïdes par semaine et par technicien (HO et al., 1978c), ce qui permet d'évaluer les potentialités d'un grand nombre de croisements par année puisque 20 à 30 haploïdes doublés sont produits sur chaque croisement (CHOO et REINBERGS, 1982). De 1973 à 1979, plus de 6000 haploïdes doublés ont été obtenus au Welsh Plant Breeding Station (PICKERING, 1980b). Jusqu'à maintenant, deux variétés ont été inscrites au catalogue officiel et sont commercialisées au Canada (HO et JONES, 1980) et en Nouvelle Zélande (KASHA, 1982), sous les noms de Mingo et Gwylan.

Comme nous l'avons vu, la méthode *bulbosum* est essentiellement appliquée dans des programmes d'amélioration d'orge de printemps, dans divers pays où ce type de culture tient une place importante. Par contre, en France, l'orge de printemps a perdu de son importance au profit de l'orge d'hiver 2 rangs ou 6 rangs, qui a vu sa sélection fortement augmenter.

L'objet de notre travail a été d'incorporer la méthode *bulbosum* dans un schéma de sélection d'orge essentiellement d'hiver, pour qui les premiers résultats nous sont apparus faibles, d'optimiser la méthode par la recherche de meilleurs clones d'*Hordeum bulbosum* et de meilleures conditions expérimentales. Nous avons, dans un second temps, débuté le même travail chez le blé tendre, que nous allons voir plus en détail maintenant.

V. L'HAPLOÏDISATION DU BLE PAR CROISEMENT INTERGÉNÉRIQUE AVEC *HORDEUM BULBOSUM*

Nous voulons ici introduire les premiers résultats obtenus dans ce domaine sur lesquels nous nous sommes basé pour débiter un programme d'haploïdisation du blé tendre par croisement intergénérique avec *Hordeum bulbosum*.

BARCLAY (1975) a transposé avec succès la méthode *bulbosum*, développée sur l'orge, au blé tendre, *Triticum aestivum* L. cultivar *Chinese Spring* ; d'autres auteurs ont constaté toutefois, qu'elle restait limitée à quelques cultivars uniquement, les autres génotypes étant incompatibles avec *Hordeum bulbosum* (SNAPE et al., 1979 - THOMAS et al., 1980 - FALK et KASHA, 1981). D'autre part, CHAPMAN et al (1976) ont montré que les gènes Kr_1 et Kr_2 portés respectivement par les chromosomes 5B et 5A du blé qui, à l'état dominant, provoquent l'incompatibilité dans le croisement blé x seigle, seraient impliqués dans le contrôle d'incompatibilité avec *Hordeum bulbosum*. L'effet du gène Kr_1 serait d'ailleurs plus important que celui du gène Kr_2 (FALK et KASHA, 1983). ZENTKELLER et STRAUB (1979) indiquent que cette incompatibilité se déroule après fécondation par un retard ou un manque de divisions cellulaires dans le zygote. D'autres auteurs, pensent au contraire, qu'il n'y a pas de fécondation du fait de l'impossibilité des tubes polliniques à pénétrer dans le sac embryonnaire (SNAPE et al., 1980), ce qui serait à rapprocher des travaux de JALANI et MOSS (1980, 1981) sur les croisements blé x seigle.

Récemment, ALJANABI et PICARD (1981) ont réussi à transférer les deux allèles kr_1 et kr_2 à l'état récessif de la variété Chinese Spring dans une multi F1 de blé tendre et à les obtenir à l'état homozygote par androgénèse suivi d'un doublement. Il semblerait intéressant de créer une grande série de géniteurs compatibles comportant les deux couples d'allèles à l'état récessif pour utiliser ce système rapidement en sélection (ALJANABI, 1981). Une autre voie d'étude est celle entreprise par SNAPE (Comm. pers. 1983) qui consiste à rechercher des clones d'*Hordeum bulbosum* pour leur aptitude du croisement avec le blé.

Toutefois, deux critères semblent importants à respecter pour améliorer cette technique chez le blé tendre : d'une part, utiliser des souches d'*Hordeum bulbosum* tétraploïdes ce qui se traduit par une augmentation significative du taux de nouaison (BARCLAY, 1975), et d'autre part, contrôler un certain nombre de paramètres de l'environnement ainsi que des techniques de travail (ALJANABI, 1981).

VI. CONCLUSION : LES BUTS DE NOTRE TRAVAIL

Les orges sur lesquelles nous avons travaillé sont imposées dans un schéma de sélection, nous ne pouvons donc pas éliminer tous les inconvénients introduits par elles. Par contre, nous pouvons rechercher des *Hordeum bulbosum* à haut rendement d'haploïdes, ces souches possédant les allèles compatibles avec les *Hordeum vulgare* de la sélection.

Toutes les données apportées par les auteurs ont été obtenues sur les orges de printemps. Notre expérimentation a l'originalité de s'appliquer à l'orge d'hiver et nous avons cherché à optimiser la méthode.

Ayant acquis la pratique de la méthode, nous étions aptes à l'appliquer au blé dont nous donnons en dernière partie nos premiers résultats.

Nous présentons nos résultats dans les trois chapitres suivants : nous développons d'abord notre méthode expérimentale ; nous analysons ensuite notre matériel sur le plan cytogénétique, et nous faisons enfin l'analyse statistique des résultats de notre expérimentation.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

Comme nous l'avons signalé dans l'introduction, ce travail s'est déroulé durant trois années consécutives et il devait répondre à un double impératif:

1°) Obtenir un nombre maximum de plantes haploïdes doublées sur orges d'hiver, matériel peu utilisé jusqu'à maintenant, en vue d'un programme de sélection. Sur le plan gain de temps, cette méthode semble en effet plus intéressante pour les orges de type hiver que celles de type printemps pour lesquelles d'autres méthodes en cycle accéléré sont plus faciles à utiliser (KASHA, 1976).

2°) Trouver les conditions optimales d'environnement et d'expérimentation pour la méthode et en particulier rechercher des souches d'*Hordeum bulbosum* à bon rendement pour l'haploïdisation.

Ce double impératif nous a amené à utiliser le matériel ci-dessous décrit.

I LE MATERIEL VEGETAL

Notre matériel se compose de lignées d'orge en cours de sélection et de quelques variétés, de plusieurs souches d'*Hordeum bulbosum* et de variétés de blé.

1.1 Les orges

Du fait que nous travaillons sur des lignées d'orge en voie de sélection, il est généralement difficile de donner leur généalogie avec précision car le sélectionneur attend rarement un état homozygote élevé avant de recroiser des plantes agronomiquement intéressantes.

Les lignées vont de la F1 à la F5 ; nous en indiquerons les caractères suivants :

- l'état d'avancement en sélection
- le type : 2 rangs ou 6 rangs, hiver ou printemps
- le nombre d'hybrides F1 ou de descendants d'hybrides F1 différents.

a) les orges utilisées pendant la saison 1980

Les orges d'hiver sur lesquelles ont été effectués les croisements avec *Hordeum bulbosum* sont en F3 et F4, celles de printemps uniquement en F4. Les deux types printemps et hiver sont à deux rangs issus du croisement entre parents deux rangs.

b) Les orges utilisées pendant la saison 1981

Elles sont constituées d'hybrides de parents 2 rangs et d'hybrides de parents 6 rangs, tous les deux orges d'hiver, et de leurs descendants à un stade plus ou moins avancé en sélection :

- des F1 2 rangs au nombre de 8 : V1 à V8
- des F4 2 rangs issues de six croisements différents :
 - . le croisement 1 : une descendance, V9
 - . le croisement 2 : une descendance, V10
 - . le croisement 3 : dix huit descendances, V11 à V28
 - . le croisement 4 : trois descendances , V29 à V31
 - . le croisement 5 : deux descendances, V32 à V33
 - . le croisement 6 : dix descendances, V34 à V43.

Les différents V à l'intérieur d'un même croisement correspondent à des descendances de lignes différentes en F3.

- des F5 6 rangs provenant de six croisements différents : V44 à V49
- une F5 2 rangs : V50.

c) Les orges utilisées pendant la saison 1982

Plusieurs hybrides ou descendance d'hybrides ont été utilisés, mais le choix a porté essentiellement sur la descendance en F3 d'un croisement entre orges d'hiver à 6 rangs. En effet, 35 épis ont été prélevés sur 35 plantes F2 issues de ce croisement et ils ont été notés de V'1 à V'35.

Nous ajoutons enfin dans nos résultats globaux, les données des croisements suivants :

- des plantes issues de graines traitées par une substance mutagène dont nous décrivons le processus ultérieurement, ont également été croisées avec *Hordeum bulbosum*. Ces graines proviennent de la descendance en F10 de deux croisements entre orges à 6 rangs.

- des descendance issues d'un croisement 2 rangs x 6 rangs dont la F1 est recroisée avec le parent 6 rangs. Le déterminisme génétique de ce caractère a été analysé antérieurement (DEVAUX et al., 1981). Les graines issues de ce back-cross fournissent les plantes qui sont croisées avec *Hordeum bulbosum*.

- 7 F1 provenant de parents 2 rangs de printemps.

1.2 Les blés

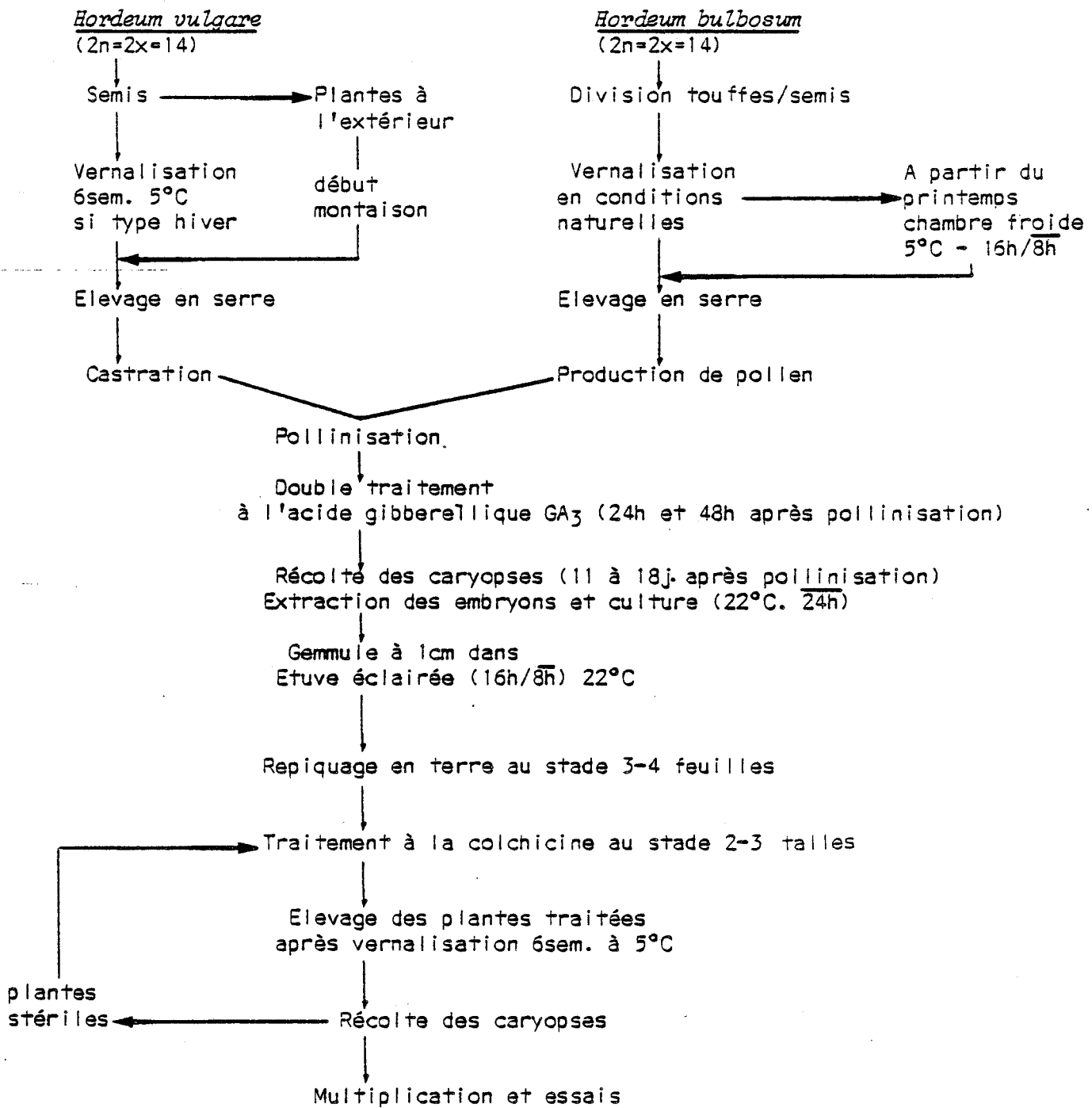
Les premiers croisements débutés en 1982 sont réalisés uniquement sur les variétés hexaploïdes suivantes : Chinese Spring, Timgalen, Gammut, Timmo, Roazon, Iéna et tétraploïde : Cocorit 71.

1.3 Hordeum bulbosum

Hordeum bulbosum est une espèce sauvage, perenne, allogame et autostérile (LUNDQUIST, 1962) que l'on trouve dans les régions montagneuses de la plupart des pays méditerranéens (KATZNELSON et ZOHARY, 1967). La vernalisation est nécessaire pour induire la floraison (KOLLER et HIGHKIN, 1960).

La multiplication végétative est facilitée à la faveur de la présence de bulbilles à la base des chaumes. (photo 1 planche I).

Schéma II : Le système *bulbosum*



Neuf souches d'*Hordeum bulbosum* diploïde provenant de différents centres de sélection européens et américains ont été utilisées dans le programme de croisement avec les orges :

- B0 pendant la saison 1980
- B1 à B8 pendant la saison 1981
- B1, B5, B6, B7 pendant la saison 1982, choisies sur des critères que nous développerons dans notre travail.

Ces différentes souches ont été multipliées de deux manières :

- soit à partir de la division d'une touffe unique, c'est à dire par voie végétative pour B0, B1 à B5, et B8,
- soit à partir de la germination de grains issus d'une même plante et de deux populations pour B6 et B7.

Deux souches d'*Hordeum bulbosum* tétraploïde ont été croisées avec les variétés de blé ; ces deux souches ont été multipliées par la division de touffes uniques.

II LES TECHNIQUES UTILISEES

II.1 L'haplodiploïdisation de l'orge

L'haplodiploïdisation se fait en sept étapes : d'abord, les plantes parentales sont cultivées, *Hordeum vulgare* et *H. bulbosum* ; ensuite les épis sont castrés et pollinisés pour effectuer le croisement ; les fleurs pollinisées sont traitées à l'acide gibberellique. Onze à dix huit jours après pollinisation, les embryons sont extraits des caryopses et placés sur milieu de culture ; au stade trois feuilles, la jeune plante est repiquée et, enfin, après tallage, la plante haploïde est traitée à la colchicine pour diploïdisation. L'ensemble de ces opérations s'étend sur 6 à 7 mois et nous les avons répétées sur trois saisons (schéma 2).

II.1.1 L'élevage des plantes parentales

Au cours de la saison 1980, les croisements avec *Hordeum bulbosum* ont été réalisés en grande partie sur des plantes situées en plein champ .

Quelques plantes d'orge d'hiver provenant de la pépinière ont toutefois été rentrées dans la serre au début du printemps.

A partir de 1981, les orges d'hiver à haploïdiser sont semées en Giffy pots de 5cm x 5cm dans du terreau de qualité commerciale (Universel RHP - De Baat), placées dans un local frais pour éviter les phénomènes de dormance tégumentaire (CORBINEAU et COME, 1980). Elles sont ensuite mises à vernaliser six semaines à 5°C en chambre froide dès germination sous des conditions d'éclairement relativement faibles (1500 lux) obtenues par des tubes fluorescents type Sylvania GROLUX F40T12 ; la photopériode est de 8heures d'éclairage pour 16heures de phase sombre par 24heures (8H/16H).

A la fin de la vernalisation, les plantes transitent huit à dix jours dans une serre non chauffée ; puis elles sont repiquées dans des pots de 30 cm de diamètre, à raison de trois plantes par pot, et contenant de la terre franche prélevée dans un champ où la même espèce est cultivée. Cette dernière précaution permet d'éviter les phénomènes de toxicité, dus à la rémanence de produits phytosanitaires employés pour d'autres espèces. Les orges de printemps sont semées directement dans des pots de 30 cm. Les pots sont placés dans une serre dans les conditions suivantes :

- la photopériode est de 16h/8h, obtenue si nécessaire par un éclairage artificiel de 5000 lux (lampes à décharge MAZDA MMF 250 RV à raison de 250 watts/m²)

- la température varie de 10-15°C en phase sombre et de 12-35°C en phase éclairée (hiver-été)

- les arrosages sont effectués à la main, journallement

- la fertilisation est apportée en deux fois à des stades différents du développement végétatif des plantes :

- . au stade 3-4 feuilles : avec un engrais complet NPK Phosano 14; 12. 16.

- . au stade fin de montaison : avec de l'Ammonitrate 33,5

- les produits phytosanitaires employés sont les suivants :

- . RIPCORDER 5 (Agrishell) contre les aleurodes. Dose d'emploi : 6ml/litre

- . CALIXINE (BASF) contre l'oïdium. Dose d'emploi: 1,5ml/litre
- . PELTAR (Procida) contre l'oïdium. Dose d'emploi : 3g/litre
- . BAYLETON (Bayer) contre les rouilles. Dose d'emploi :
2g/litre
- . META SYSTEMOX (Bayer) contre les pucerons des céréales
à la dose de 1,5ml/litre
- . PENTAC WP (Quinoleine) contre les acariens à la dose
de 1,5g/litre.

Il convient toutefois, d'utiliser ces produits phytosanitaires avec précautions surtout sur du matériel élevé en serre. Des anomalies méiotiques ont été signalées suite à des traitements de ce type (AMER et FARAH, 1980 - SINGH et al., 1978).

L'emploi de la calixine est à proscrire lorsque des plantes en floraison sont dans la serre car elle induit en plus des anomalies au niveau des embryons (PICKERING, 1982:b).

Pour le parent mâle, les plantes d'*Hordeum bulbosum* sont repiquées à l'automne (JENSEN, 1977) en pots de 30 cm dans de la terre franche et vernalisées en conditions naturelles dans des chassis, pourvus à cet effet, et comportant une double protection contre les risques de gelées. Cependant, pour assurer une production de pollen pendant les mois d'été, il est nécessaire de placer ces plantes en chambre froide (5°C) dès la reprise en végétation au sortir de l'hiver.

Chaque semaine, une série de plantes d'*Hordeum bulbosum* est rentrée dans la serre qui abrite également les orges à haploïdiser. Les mêmes types de traitements phytosanitaires sont, au besoin, utilisés.

Après floraison, les plantes sont coupées à 10-15cm de la base des chaumes et laissées à l'extérieur jusqu'à l'automne suivant, pour le repiquage.

Dans tous les cas, il est nécessaire de surveiller de façon permanente l'état physiologique et sanitaire de toutes les plantes élevées en serre, ce qui est essentiel pour la réussite du programme (JENSEN, 1974 - KASHA, 1974).

11.1.2. La castration des épis d'orge

Chaque talle qui arrivé à son complet développement, porte une inflorescence en épi. Le dernier entre-noeud de la tige se prolonge par le rachis qui se subdivise en articles ; chacun de ceux-ci représente un entre-noeud avec son noeud correspondant sur lequel s'insèrent directement trois épillets uniflores, fertiles chez l'orge à 6 rangs, les deux latéraux étant stériles chez l'orge à 2 rangs. Les épillets sont en position alterne sur deux rangées opposées. Chaque épillet comporte la structure suivante :

- deux glumes linéaires se terminant généralement par une très fine arête,
- deux glumelles, l'une inférieure, prolongée par une barbe, l'autre supérieure, inerme et s'emboitant dans la glumelle inférieure,
- deux lodicules plumeux,
- les organes reproducteurs constitués par trois étamines, un pistil comprenant un ovaire prolongé par deux stigmates plumeux et contenant un seul ovule (photo 1, planche VII).

Pour éviter des autofécondations indésirables, chaque fleur de l'épi d'orge est préalablement castrée avant la déhiscence des anthères. Pour les plantes en serre, la castration est réalisée juste avant que l'épi ne sorte de la gaine. Pour les plantes cultivées en plein champ, la castration est faite lorsque le tiers supérieur de l'épi sort de la gaine. Dans les deux cas, plantes en serre ou en champs, les fleurs seraient à l'anthèse, 24 à 48 heures plus tard.

Deux méthodes de castration ont été utilisées : la première consiste à couper le tiers supérieur des glumelles à l'aide de fins ciseaux et d'extraire avec une pince à échardes de Dumont, les anthères, et la seconde de réaliser une légère incision latérale dans la glumelle

inférieure, à l'aide d'une même pince et d'ôter par l'intermédiaire de cette incision, les anthères (POPE, 1944). Chez l'orge à 6 rangs, il est toutefois plus commode d'enlever les fleurs latérales avant de réaliser la castration surtout lorsque l'on utilise la seconde méthode. Un soin extrême est à apporter à l'opération de castration afin de ne pas endommager les stigmates et l'ovaire qui doivent rester fonctionnels. Après castration, l'épi est enveloppé dans un sachet de cellophane dont l'extrémité inférieure est fermée à l'aide d'un petit ruban plastique.

11.1.3. La pollinisation

La collecte du pollen d'*Hordeum bulbosum* est réalisée en début de journée juste après la déhiscence des anthères. Une boîte de Pétri est maintenue sous l'épi que l'on secoue de haut en bas pour y faire tomber le pollen. Ce pollen est aussitôt déposé sur les stigmates bien développées des fleurs d'orge préalablement castrées depuis 2 à 4 jours, à l'aide d'un pinceau ou d'une microspatule, selon la méthode de castration réalisée. L'épi est ensuite coiffé d'un sachet en papier brun de 10 cm x 2,5 cm. Cette protection contre la lumière a pour effet d'augmenter significativement la taille des caryopses et le taux d'embryons différenciés (PICKERING, 1975, 1977 et 1982c).

11.1.4. Le traitement à l'acide gibberellique

Un double traitement d'une solution d'acide gibberellique (GA₃) à 75mg/litre et d'agent mouillant (Tween 20) à 0,05% est pulvérisé sur l'épi 24 et 48 heures après pollinisation (PICKERING, 1980 a).

En réalisant ce traitement, nous appliquons les indications données par les auteurs : LARTER et ENNS (1960) démontrent l'action stimulatrice de l'acide gibberellique sur le développement d'embryons triploïdes d'orge et KRUSE (1973) obtient les premiers hybrides intergénériques blé-orge, grâce au traitement des épis par cette hormone végétale. Enfin, SUBRAHMANYAM et KASHA (1971) et KASHA

et al., (1978) constatent que le traitement à l'acide gibberellique des épis d'orge pollinisés avec *Hordeum bulbosum* augmente le taux de nouaison, l'état de différenciation des embryons, le taux de développement de ces embryons ainsi que le taux de polyembryonie haploïde.

En solution, l'acide gibberellique se dégrade rapidement (DEYMIE, 1983) et il conviendra donc d'en préparer souvent.

11.1.5. La culture in vitro des embryons

a) la récolte et la stérilisation des caryopses

Comme nous l'avons signalé dans le chapitre 1, il est nécessaire de repiquer stérilement l'embryon issu du croisement interspécifique sur un milieu de culture approprié, avant qu'il n'avorte. Pour ce faire, lorsque les premiers caryopses commencent à virer à la couleur jaune, les épis sont récoltés (JENSEN, 1974 a) ce qui correspond à une période de 11 à 18 jours après pollinisation, période qui est fonction de plusieurs facteurs dont essentiellement les conditions de culture (JENSEN, 1977). Chaque épillet est détaché soigneusement du rachis de l'épi, les glumelles inférieures et supérieures sont ôtées et les caryopses placés dans un erlenmeyer de 100ml.

La stérilisation est réalisée par une solution d'hypochlorite de calcium à 5% en solution aqueuse plus une goutte de Tween 20 pendant cinq minutes, suivie de trois lavages successifs avec de l'eau stérile.

Lorsque pour des raisons matérielles, les embryons ne peuvent être extraits juste après récolte, il est possible de différer cette manipulation de quelques jours, en stockant les caryopses en chambre froide (5°C) sans compromettre la viabilité des embryons (JENSEN, 1977).

b) Le prélèvement des embryons des caryopses

La dissection des caryopses préalablement stérilisés se fait sous une loupe binoculaire (x 15 à 30) placée sous une hotte à flux laminaire.

Les caryopses sont déposés dans le couvercle d'une boîte de pétri stérile, une légère incision est réalisée sur la face dorsale du caryopse et l'embryon, contenu généralement dans une goutte de liquide incolore, est prélevé à l'aide d'une aiguille montée. Les embryons sont cultivés dans des flacons SOVIREL de 50ml contenant, approximativement 15ml de milieu stérile à raison de cinq par flacon.

Il est important de ne pas endommager les embryons et de les placer correctement de sorte qu'il soit au contact avec le milieu, par leur scutellum (NORSTOG, 1965). Repiqués en position inverse, des anomalies morphologiques apparaissent souvent (JENSEN, 1977 - CHUECA et al., 1977 - DUNWELL, 1981).

c) les milieux de culture

Beaucoup de milieux de culture ont été utilisés par différents auteurs :

- le milieu MORRISON (MORRISON et al., 1959a) par SYMKO, (1969) au Canada
- le milieu NORSTOG II (NORSTOG, 1973) par ADAMSKI (1979 a) en Pologne
- le milieu liquide C17 (JENSEN, 1976) par JENSEN au Danemark
- le milieu Orchid agar de DIFCO par SIMPSON et SNAPE, (1981) en Grande Bretagne
- le milieu GAMBORG B5, modifié par l'addition de 7g/litre de Bacto Agar et sans 2,4-D, (GAMBORG et al., 1968) par KASHA et KAO (1970) au Canada et par PICKERING (1980 b) en Grande Bretagne.

Nous avons essentiellement utilisé deux milieux les plus couramment employés en l'occurrence, le GAMBORG B5 modifié par l'addition de 7g/litre de BactoAgar et sans 2,4-D et l'Orchid Agar, à la concentration de 29 grammes /litre et additionné de 4,33g de saccharose (SIMPSON, Comm. pers.). Le milieu liquide C17 décrit par JENSEN a été rapidement abandonné du fait de sa moins bonne facilité de manutention. Les détails de préparation des milieux sont bien indiqués par différents auteurs auxquels nous nous sommes référés (GAUTHERET, 1959- GAMBORG et al., 1976, 1982 - CONGER et al., 1981).

d) La culture des embryons

Lors du prélèvement, quatre types d'embryons sont possibles :

- des embryons globulaires de petite taille (inférieurs à 0,5mm)
- des embryons cuneiformes sans gemmule
- des embryons différenciés, c'est à dire possédant une gemmule
- des embryons différenciés possédant un axe de symétrie longitudinal. Une telle morphologie traduit l'état hybride VB de l'embryon (PICKERING, 1980 b).

Dans un premier temps, tous les embryons ont été repiqués mais devant le peu de résultats obtenus par les deux premières catégories d'embryons (PICKERING et MORGAN, 1979_a) seuls les embryons différenciés ont été gardés.

Après repiquage, les flacons sont placés dans une enceinte non éclairée, maintenue à 22°C jusqu'à ce que la gemmule des embryons atteigne une longueur de 5mm environ, (NORSTOG, 1973) ce qui correspond généralement à 5 à 7 jours. Ils sont ensuite transférés dans une chambre de culture sous les conditions suivantes :

- Température : 22°C \pm 1°C en continu
- Photopériode : 16h/8h
- Conditions d'éclairage : par tubes fluorescents cool-white de luxe (Général électrique F40T12) ou GroLux (Sylvania F40T12) donnant respectivement 5000 et 3000 lux (COSTES, 1967).

11.1.6. Le transfert en terre

Les jeunes plantes, au stade 20 sur l'échelle de ZADOKS (ZADOKS et al., 1974) c'est à dire au stade 3 feuilles, sont repiquées dans des pots de 12 cm de diamètre contenant du terreau universel, et sont ensuite placées dans la serre dans les conditions précisées antérieurement.

11.1.7. Le doublement chromosomique

Les techniques permettant le doublement du stock chromosomique chez les plantes sont nombreuses (JENSEN, 1974 b). Pour les haploïdes d'orge, trois d'entre elles sont couramment utilisées, faisant toutes intervenir la colchicine, ce sont :

- l'addition d'une solution de colchicine directement dans le tube de culture juste avant le repiquage de la plante en terre (SUBRAHMANYAM et KASHA, 1975),
- la méthode du tube rempli de la solution et retourné sur les talles de la plante (ISLAM et SPARROW, 1973)
- le trempage des plantes au stade 2-3 talles (stade 22 sur l'échelle de ZADOKS) dans la solution (JENSEN, 1976 - Ho et al., 1978 b) que nous avons préférentiellement utilisée devant les résultats élevés obtenus et sa facilité d'emploi dans un système de production (PICKERING, 1980b - WINKLE et KIMBER, 1976). Pour effectuer cette opération, les plantes sont retirées des pots, soigneusement lavées à l'eau et les racines sont coupées à 1cm de longueur. Une incision de 1 à 1,5cm est réalisée à l'aide d'une lame de rasoir à la base de chaque talle (MORGAN, 1976), et les plantes sont ensuite plongées sur une hauteur de 5cm dans une solution de 0,05% de colchicine et de 2% de Diméthyle-Sulfoxide (DMSO), composé qui en augmentant la perméabilité des membranes (KAUL et ZUTSHI, 1971) accroît significativement le taux de doublement (JENSEN, 1974 b). L'ensemble est placé dans une enceinte éclairée maintenue à 25°C et saturée en humidité. Cinq heures plus tard, les plantes sont lavées pendant quelques minutes à l'eau courante et repiquées immédiatement dans les mêmes pots. Ces pots sont placés en serre.

La solution de colchicine peut être utilisée jusqu'à cinq fois, sans perte de son activité (PICKERING, 1980b) mais il convient toutefois, de signaler que des différences importantes de toxicité sont présentes selon l'origine de la colchicine (ESSAD et CACHON, 1965). Nous avons utilisé de la colchicine SIGMA qui s'est révélée efficace dans ce type de programme (R. PICKERING, comm. pers., 1980).

Signalons que certains auteurs préconisent l'addition d'hormones végétales dans la solution de colchicine : l'acide gibberellique pour accélérer le taux de division cellulaire (LYER et RANDHANA, 1965 - THIEBAUT et KASHA, 1977) et la N-6 Benzyladénine qui augmente le taux de nouaison chez la plante traitée (THIEBAUT et al., 1979). L'addition d'un agent mouillant tel que le Tween 20 est également recommandée par ces auteurs (THIEBAUT et KASHA, 1978).

L'utilisation de composés autres que la colchicine, c'est à dire le protoxyde d'azote (SUBRAHMANYAM et KASHA, 1975) et la caféine (PICKERING, 1977) s'est montrée moins efficace.

11.1.8. L'élevage des plantes traitées

Le traitement à la colchicine est éprouvant pour la plante : la partie terminale des limbes foliaires se dessèche et est coupée avant les opérations ultérieures. Une quinzaine de jours après le traitement à la colchicine, les orges d'hiver sont mises à vernaliser en chambre froide à 5°C pendant six semaines. Elles sont ensuite repiquées en serre. Toutefois, des attaques importantes de jaunisse nanisante au cours de l'été 1981, maladie virale comme nous l'avons vu, nous ont contraint à laisser la grande majorité des plantes traitées à la colchicine en chassis à l'extérieur. Une partie de ces mêmes plantes, survivantes et présentant un meilleur état sanitaire, au printemps 1982 ont été repiquées en plein champs.

Les orges de printemps sont, après traitement à la colchicine, repiquées directement en serre.

A maturité, les graines sont récoltées et remises au sélectionneur pour la multiplication et la sélection.

Les plantes stériles sont coupées à dix centimètres de la base ; lorsque de nouvelles tiges sont formées, elles sont traitées à la colchicine de la même manière que celle décrite précédemment.

11.2. Haplodiploïdisation du blé

La technique décrite chez l'orge, est approximativement identique pour le blé. Les seules modifications apportées sont les suivantes :

- l'épillet de l'inflorescence du blé, est multiflore. Au cours de la castration, les fleurs centrales sont éliminées pour ne laisser que les deux fleurs situées à la base de l'épillet.

- la pollinisation est réalisée avec des souches d'*Hordeum bulbosum* tétraploïdes, qui existent dans les populations naturelles (JØRGENSEN, 1982),

- un triple traitement à l'acide gibberellique est réalisé 24, 48 et 72 heures après pollinisation.

11.3. Le traitement mutagène

Certaines orges parentes ont été soumises à un traitement mutagène dans le but de sélectionner des mutants d'intérêts agronomiques dans les plantes haploïdes (KASHA, 1976). La technique utilisée est celle décrite par ROBBELEN et al., (1977), elle consiste en :

- un pré-trempage des caryopses durant 14 heures à 20°C dans de l'eau du robinet

- un trempage dans une solution à 0,25% d'Ethylméthane sulfonate ajustée à pH = 7 pendant 6 heures à la température du laboratoire. Il est nécessaire d'assurer une agitation constante pendant la durée de ce traitement pour obtenir une pénétration uniforme de l'agent mutagène (VARGHESE, Comm. pers. 1982).

- un lavage de 4 heures à l'eau courante.

Après ce traitement, les grains sont semés directement en giffy pots.

11.4. Les techniques cytologiques

11.4.1. Les comptages chromosomiques sur méristèmes racinaires

Ils sont effectués sur les plantes d'*Hordeum bulbosum* et les plantes issues des embryons en culture in vitro, pour vérifier leur niveau de ploïdie. Les méristèmes racinaires sont prélevés, soit sur germinations de grains pour les haploïdes doublés, soit à la sortie des plantes en tube, pour les haploïdes et hybrides VB, soit sur des plantes entières pour les souches d'*Hordeum bulbosum*.

Les pointes de racine sont immergées dans une solution à 0,002M de 8 hydroxyquinoline, pendant trois heures ou dans une solution à 1⁰/000 d' α bromonaphtalène pendant deux heures à la température du laboratoire, suivi d'une fixation de vingt quatre heures dans un mélange de trois volumes d'éthanol absolu pour un volume d'acide acétique glacial à 5°C. Les racines sont ensuite conservées à 5°C dans de l'éthanol à 70%. La coloration est obtenue par la réaction de Feulgen. Ces différentes étapes sont bien décrites par GAGNIEU (1949) et DYER (1979).

Toutes les souches d'*Hordeum bulbosum* ont été contrôlées cytologiquement ainsi que toutes les plantes issues de la culture in vitro en 1980, et les cent premières obtenues en 1981, jusqu'à ce que nous ayons pu visualiser de manière certaine l'hybride de l'haploïde au moment du transfert en terre : l'hybride présente une pilosité de gaine importante du type de celle d'*Hordeum bulbosum* alors que l'haploïde est généralement glabre ou à peine velu. Ces observations nous ont amené à réduire le nombre de contrôles cytologiques en 1982, ce qui présente un gain de temps appréciable pour un système de production.

11.4.2. La coloration différentielle des chromosomes par la méthode du Giemsa.C.banding

Ce travail a été réalisé en collaboration et au laboratoire du Dr LINDE-LAURSEN (Danish Atomic Energy Commission - Research

Establishment Risø - Roskilde - Danemark), sur la variété d'orge "Emir" et sur les haplotypes doublés correspondants ainsi que sur un amphidiploïde VVBB. La technique décrite par LINDE-LAURSEN (1975), est la suivante :

a) le matériel

Les caryopses d'orge sont mis à germer sur du papier filtre humide placé dans une boîte en plastique et maintenue à 24°C dans une étuve.

Des racines de 0,5 à 1,5cm de long sont prélevées.

b) le prétraitement

Une solution à 0,002M de 8 hydroxyquinoline est utilisée. Les racines, détachées de la plantule, sont immergées dans cette solution pendant 3 heures à la température de 18°C.

c) la fixation

Elle a lieu dans un mélange 3/1 (Ethanol absolu - acide acétique glacial) préalablement refroidi à 5°C au réfrigérateur. Le mélange est changé au bout d'une heure. Les racines sont ensuite placées à 5°C pendant toute la nuit.

d) la macération

Au sortir du mélange 3/1, les racines sont rincées deux fois à l'eau distillée et mises à macérer ensuite dans une solution 0,2N d'HCl pendant 1 minute 40 secondes à 50°C. Les racines sont ensuite rincées 2 fois dans de l'eau distillée.

e) l'étalement

La partie méristématique de la racine est coupée et déposée dans une petite goutte d'acide acétique à 45% sur une lame propre.

A l'aide d'une pince de Dumont, et d'une pointe montée, une suspension de cellule est réalisée à partir de la zone médullaire de cette pointe de racine. Tous les amas de cellules sont retirés de la lame. Une lamelle (24 x 24mm) est ensuite déposée sur la goutte d'acide acétique. L'étalement se fait en réalisant une pression uniforme sur la lamelle avec le pouce. La préparation est ensuite observée au microscope à contraste de phase pour évaluer la qualité et le nombre de métaphases.

f) la déshydratation

Les lamelles sont décollées des lames avec du CO₂ liquide appliqué sur la face inférieure de ces lames qui sont ensuite plongées pendant 1 heure dans de l'éthanol absolu et séchées sous le flux d'un séchoir à la température du laboratoire.

g) la maturation

Après déshydratation, les lames sont placées dans un dessiccateur à gel de silice, pendant une semaine à la température de 18°C.

h) la dénaturation

Au sortir du dessiccateur, les lames sont placées dans un portoir à lames et immergées 5 minutes dans une solution d'hydroxyde de Barium à 5% fraîchement préparée et chauffée à 50°C. La température descend aux alentours de 42°C pendant l'immersion.

i) le lavage

L'ensemble, lames - porte lames, est rincé à l'eau déminéralisée courante pendant une heure.

j) la renaturation

Les lames sont ensuite transférées dans une solution de 2 x SSC (0,3M de chlorure de Sodium - 0,03M de trisodium citrate ajustée

à pH = 7 avec de l'HCl 0,2 N) à la température du laboratoire pendant dix minutes puis à 60°C pendant une heure. Les lames sont lavées rapidement dans le tampon Sørensen 1/15 M (pH = 6,81).

k) la coloration

Les lames sont immergées dans une solution de tampon Sørensen 1/15 M et de colorant Giemsa (GURR R66) à 0,9% pendant 21 heures à la température de 18°C.

Après coloration, les lames sont rincées dans le tampon Sørensen puis séchées à température ambiante. Une goutte de DEPEX (GURR) et une lamelle sont déposées sur la préparation avant observation.

11.4.3. Les observations méiotiques

L'analyse méiotique des haploïdes, hybrides VB, des *Hordeum bulbosum*, des lignées d'orge utilisées comme parent femelle en croisement avec *Hordeum bulbosum* et des haploïdes doublés correspondants, a été faite sur les cellules mères de microspores.

Les épis sont prélevés de préférence le matin, 1 à 3 heures après la levée du jour ou l'allumage des lampes. Il convient de définir empiriquement le stade de montaison de l'épi dans la gaine correspondant aux stades méiotiques recherchés, en l'occurrence la métaphase I, avant de prélever les épis. Ce stade correspond approximativement lorsque l'épi est au niveau de l'avant dernière feuille. Les épis récoltés sont plongés dans une solution d'alcool acétique 3:1 pendant 24 heures à 5°C puis stockés dans de l'éthanol à 70° à 5°C.

Les préparations sont effectuées de la manière suivante : une demi-anthère est déposée dans une goutte de carmin acétique ferrique sur une lame ; elle est vidée de son contenu à l'aide d'une pince de Dumont et d'une aiguille montée. Les débris correspondants à la paroi de l'anthère sont retirés et une lamelle est déposée sur la préparation.

Il est quelquefois nécessaire de chauffer légèrement la préparation au dessus de la veilleuse d'un bec Bunsen, pour renforcer la coloration avant l'étalement puis observation au microscope.

11.4.4. Les observations des populations polliniques

Ces observations ont été réalisées sur le même matériel décrit précédemment. Les anthères, juste avant l'anthèse, sont prélevées dans un petit pilulier contenant de l'alcool à 70% et sont stockées à 5°C. La coloration a lieu au carmin acétique ferrique de la même manière que celle utilisée pour l'étude des méioses.

11.4.5. Les analyses cytologiques des embryons et de l'albumen issus du croisement interspécifique orge variété Emir x *Hordeum bulbosum*

Les caryopses issus du croisement entre la variété d'orge Emir par un mélange de pollen des souches 81 - 85 - 86 et 87 d'*Hordeum bulbosum* sont prélevés 3, 4 et 5 jours après pollinisation et plongés dans de l'eau froide (0 - 2°C) pendant 24 heures. La fixation est réalisée dans le mélange de Carnoy : 6/3/1 (Ethanol absolu/chloroforme/Acide acétique glacial) dans une enceinte où l'on fait le vide pendant 15 minutes, puis à pression atmosphérique normale pendant 2 jours. Les caryopses sont lavés deux fois dans de l'éthanol 70% puis stockés dans le réfrigérateur à 5°C toujours dans de l'éthanol à 70%.

L'observation cytologique est réalisée de la manière suivante : l'embryon et albumen sont retirés du caryopse sous une loupe binoculaire (x40) et déposés séparément, chacun sur une lame, dans une goutte de carmin acétique ferrique. L'étalement est alors réalisé, et on renforce la coloration par chauffage à plusieurs reprises au dessus de la veilleuse d'un bec Bunsen en ajoutant à chaque fois, une goutte de carmin acétique ferrique. La recherche des métaphases mitotiques peut alors être réalisée au microscope photonique.

11.4.6. Les calculs statistiques

Pour tester les meilleures combinaisons *Hordeum vulgare* - *Hordeum bulbosum*, nous avons utilisé l'analyse factorielle des correspondances sur la variable taux de nouaison, calcul réalisé au C.I.T.I. (Centre Interuniversitaire du Traitement de l'Information - Cité Scientifique - U.S.T.L. - Villeuneuve d'Ascq), sur ordinateur IRIS 80.

Pour l'analyse d'homogénéité des populations, nous avons utilisé l'analyse de variance pondérée à trois facteurs contrôlés, calcul réalisé au département de Mathématiques appliquées (Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes) sous la direction de Monsieur MASSON.

CHAPITRE III : ANALYSE MORPHOLOGIQUE ET CYTOLOGIQUE DU MATERIEL

L'analyse morphologique consiste à décrire le matériel obtenu aux différentes étapes de la méthode : caryopses issus de croisement, morphologie des embryons, les différences morphologiques des plantes haploïdes, hybrides et haploïdes doublés.

Parallèlement, une analyse cytologique a été entreprise essentiellement sur le matériel produit, analyse réalisée à chaque fois où une variation du degré de ploïdie devait avoir lieu. Cette étude présente un double intérêt :

- vérifier tout d'abord, l'état de ploïdie des plantes obtenues in vitro et la descendance de ces plantes traitées à la colchicine,
- déceler ou non la présence de traces de chromatine d'*Hordeum bulbosum* dans les cellules où le phénomène d'élimination chromosomique s'est produit et d'étudier le degré d'homologie entre les génomes des deux espèces.

Avant de débiter ce travail toutefois, nous avons étudié les deux espèces *Hordeum vulgare* et *H. bulbosum* qui sont utilisées comme parents. Nous présenterons les résultats morphologiques et cytologiques dans l'ordre chronologique de l'expérimentation.

1. LES PARENTS DU CROISEMENT : HORDEUM VULGARE ET H. BULBOSUM

1.1 Morphologie

Pour le croisement et les opérations ultérieures, nous voudrions insister ici sur le fait que la culture en serre n'est pas simple. Cette difficulté est surtout liée au fait que le cycle biologique des prédateurs n'est pas interrompu car des plantes y sont maintenues toute l'année. La serre constitue un lieu de refuge pour tous ces prédateurs qu'il est nécessaire de combattre. Lorsque les attaques sont fortes et fréquentes, l'emploi répété de produits phytosanitaires devient éprouvant pour les plantes ; ceci se traduit à la limite, par des brûlures importantes du feuillage. Pendant les trois saisons de 1980 à 1982, les plus gros dégâts ont été obtenus par l'oïdium, la jaunisse nanisante, les pucerons et les acariens.

Le comportement des plantes d'orge en serre est bien souvent différent de celui des plantes élevées en conditions naturelles. C'est ainsi que le tallage, caractère très important en sélection, peut y être très réduit et même nul. L'anthèse se produit plus tôt, de sorte que pour l'opération de castration, il est nécessaire de prendre des épis encore contenus dans la gaine. D'une manière générale, les plantes sont plus fragiles et il est nécessaire de les tuteurer surtout lorsque les épis sont coiffés d'un sachet.

Les plantes d'*Hordeum bulbosum*, vernalisées à l'extérieur, présentent, en serre, un aspect beaucoup plus robuste. Le tallage est généralement très important et étalé dans le temps ; ceci nous permet de maintenir un nombre limité de plantes en serre pour obtenir une production continue de pollen. La photo 1, planche 1 montre une plante d'*Hordeum bulbosum* en début de montaison sur laquelle on remarquera la présence de bulbes à la base des chaumes.

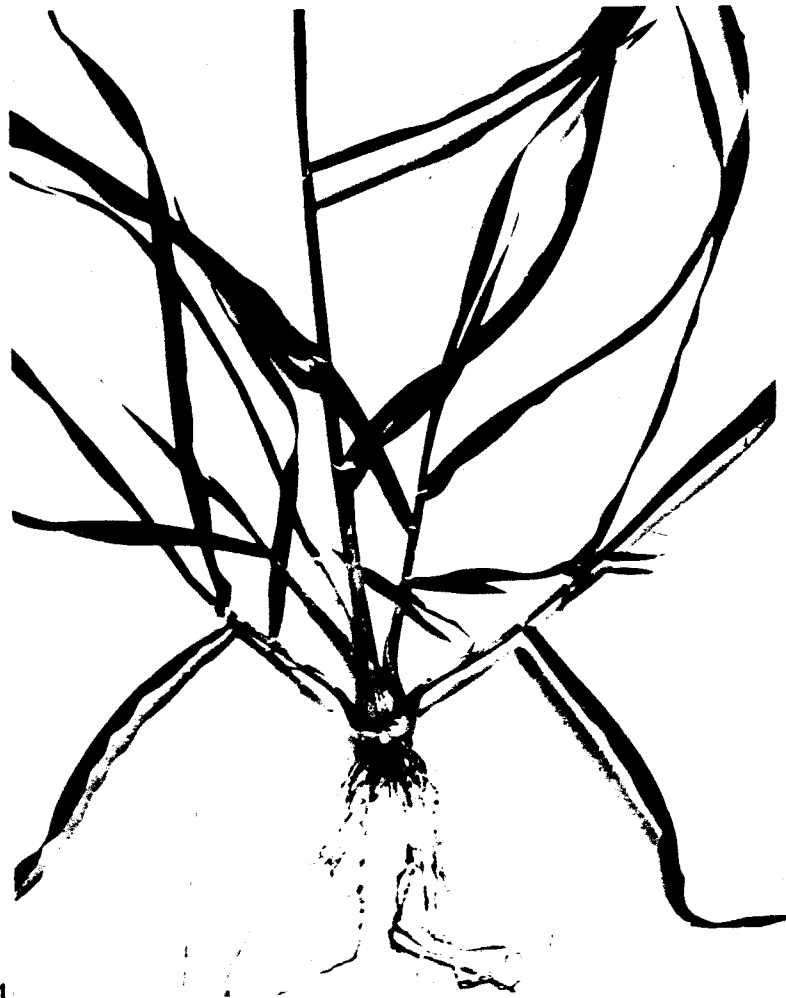
PLANCHE 1

PHOTO 1 : Plante d'*Hordeum bulbosum* en début de montaison.
La base de chaque chaume présente une bubille.

PHOTO 2 : Morphologie des épis d'orge pollinisés par *Hordeum bulbosum*
au moment de leur récolte pour extraire les embryons.

De gauche à droite :

- a) un épi ne présentant que des autofécondations, témoin d'une castration trop tardive. Ces épis résultant d'autofécondations sont bien reconnaissables par la taille des caryopses présents dans tous les épillets.
- b) un épi montrant des caryopses issus du croisement interspécifique. Toutes les fleurs ont été fécondées. Dans ce cas, le taux de nouaison est proche de 100%.
- c) un épi montrant une stérilité partielle suite au croisement interspécifique. Le taux de nouaison est d'environ 50%.
- d) un épi totalement stérile après pollinisation avec *Hordeum bulbosum*. le taux de nouaison est nul.



1



2

BUS
LILLE

1.2 Caractères cytologiques

a) *Hordeum vulgare*

- Analyse des caryotypes par les méthodes cytologiques classiques

Notre matériel d'étude est constitué surtout de variétés commerciales : Emir et Gerbel et plus rarement de lignées en cours de sélection que nous avons essayé de préserver le plus possible du fait de leur valeur et de leur nombre restreint.

L'orge, *Hordeum vulgare*, présente un nombre diploïde de 14 chromosomes, $2n = 2x = 14$, comme le montre la photo 1, planche II. Quatre chromosomes à satellite sont présents et correspondent aux deux paires d'homologues 6 et 7.

Les analyses du comportement méiotique réalisées sur les cellules mères de grains de pollen, aussi bien chez les variétés que chez les hybrides, montrent un appariement normal de type diploïde par la présence de 7 bivalents (photo 3, planche II). Il en résulte un pollen de bonne qualité, abondamment rempli de réserves comme le montre la photo 5, planche II.

- Analyse des caryotypes par la méthode de coloration différentielle au Giemsa.

Chez l'orge, seuls les chromosomes 5, 6 et 7 peuvent être identifiés par des méthodes cytologiques classiques (LINDE LAURSEN, 1976). Cette identification se fait sur la base :

- de la présence de constriction secondaires pour les chromosomes 6 et 7
- de la taille plus petite du chromosome 5.

Nous avons voulu avoir la preuve cytologique de l'élimination totale des chromosomes d'*Hordeum bulbosum* au niveau du matériel produit et c'est la raison pour laquelle nous nous sommes orientés vers une méthode plus fiable d'identification des chromosomes d'orge en l'occurrence

PLANCHE II

PHOTOS 1 - 3 - 5 : *Hordeum vulgare* cultivar Gerbel

Photo 1 : Métaphase mitotique de cellule de méristème radriculaire (X85)

On reconnaît bien les deux paires de chromosomes à satellite

Photo 3 : Métaphase I d'une cellule mère de grains de pollen (X1000)

Photo 5 : Population pollinique homogène (X125).

PHOTOS 2 - 4 - 6 : *Hordeum bulbosum*, souche B5

Photo 2 : Métaphase mitotique de cellule de méristème radriculaire (X85)

On reconnaît bien la seule paire de chromosomes à satellite

Photo 4 : Métaphase I d'une cellule mère de grains de pollen (X900)

Photo 6 : Population pollinique hétérogène par la taille des grains et de leur contenu (X125)

Préparations colorées au Carmin acétique ferrique, pour les méioses et par la réaction de Feulgen pour les mitoses.

PHOTO DU BAS : Idiogramme d'*Hordeum vulgare* cultivar Emir. Coloration différentielle au Giemsa, montrant les bandes "C" (hétérochromatine constitutive).

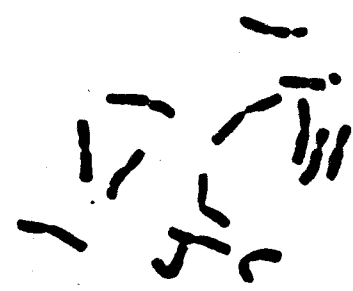
La première ligne représente les chromosomes mitotiques.

Les chromosomes homologues, reconnaissables par le nombre de bandes et leur largeur, sont placés côte à côte.

La deuxième ligne donne le caryogramme et les bandes observées.



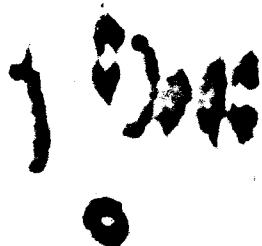
1



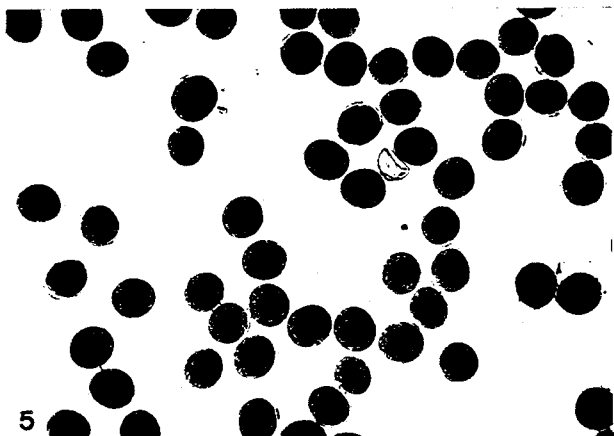
2



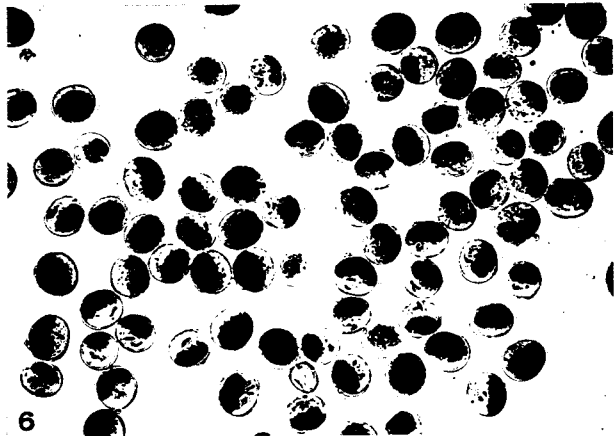
3



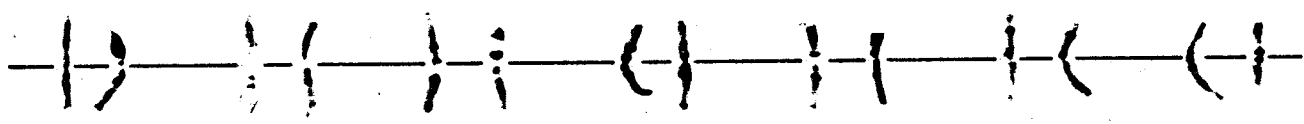
4



5



6



1

2

3

4

5

6

7



BBS
LILLE

la coloration différentielle au Giemsa. Pour ce faire, nous avons dû d'abord mettre la technique au point sur une variété d'orge "Emir" et ce travail a pu être réalisé grâce à la contribution importante du Dr. LINDE LAURSEN.

Le principe de la méthode est le suivant : le colorant Giemsa colore spécifiquement les zones centromériques, régions considérées comme hétérochromatiques et constituées de DNA répétitif. Les zones forment des bandes plus ou moins larges. Leur nombre et leur position caractérisent parfaitement les chromosomes. Une analyse bibliographique de la technique est donnée par AGOUDJIL (1980).

L'idiogramme des chromosomes d'orge Emir colorés au Giemsa est établi en bas de la planche II. (La numérotation des chromosomes a été déterminée par TULEEN (1973) pour les chromosomes 1 à 3, et par TJIO et HAGBERG (1951) pour les chromosomes 4 à 7.)

La présence des bandes, plus visibles sur la préparation elle-même, permet d'identifier chaque paire de chromosomes :

- le chromosome 1 présente, de part et d'autre du centromère, des bandes de taille moyenne. Une très légère bande est visible sur le bras court.
- le chromosome 2 présente, sur le bras court, deux bandes très fines dont une est proche du centromère, plus une télomérique, très peu visible sur la photographie. Au niveau du bras long, deux bandes sont présentes dont la plus importante est située près du centromère.
- le chromosome 3 montre sur le bras court une bande importante, centromérique et une autre plus petite. Le bras long en présente une de taille moyenne près du centromère et une autre plus petite.
- mais c'est sur le chromosome 4, que les bandes sont les plus importantes : au niveau du bras court, une très large bande centromérique est juxtaposée à deux autres, dont une seule est visible ici. Sur le bras long, trois bandes sont présentes dont une est télomérique.
- le bras court du chromosome 5 possède une bande moyenne centromérique ; le bras long, deux bandes, dont une est subterminale.

- le chromosome 6 montre au niveau du bras court, une large bande centromérique et près d'elle une autre plus petite. Au niveau du satellite, on note une bande large. Le bras long présente deux légères bandes, l'une centromérique, l'autre télomérique.

- deux larges bandes centromériques sont présentes au niveau du chromosome 7. Le bras court présente en plus une bande au niveau de la constriction secondaire et une télomérique. Le bras long montre une autre bande relativement importante.

La technique du Giemsa nous permet donc de repérer chaque chromosome d'orge individuellement au cours d'une mitose somatique et cette méthode nous est apparue très intéressante pour les buts que nous nous sommes fixés.

b) *Hordeum bulbosum*

Toutes les souches d'*Hordeum bulbosum* ont été systématiquement contrôlées cytologiquement dès réception, pour vérifier leur état de ploïdie (2x ou 4x). Comme nous l'avons déjà signalé, seuls les types 2x nous intéressent pour les croisements avec les orges.

La photo 2, planche II, nous montre une mitose somatique d'*Hordeum bulbosum* diploïde ($2n = 2x = 14$). Deux chromosomes à satellite sont présents chez cette espèce. L'analyse méiotique (photo 4, planche II) montre un appariement normal de type diploïde avec 7 bivalents. Le pollen (photo 6, planche II) semble beaucoup plus hétérogène que celui d'*Hordeum vulgare*, hétérogénéité sur le plan de la taille des grains mais aussi sur le plan de leur contenu ; des grains de pollen sont en effet plus remplis que d'autres.

II. MORPHOLOGIE DES CARYOPSES

Peu de temps après la pollinisation des fleurs d'*Hordeum vulgare* par le pollen d'*Hordeum bulbosum*, deux différences morphologiques sont visibles : tout d'abord, les jeunes caryopses

PLANCHE III

MORPHOLOGIE DE PISTILS ET DE CARYOPSES

PHOTO 1 : La première ligne représente 3 pistils de fleurs non pollinisées (Echantillon témoin),
La deuxième ligne, 3 pistils provenant du croisement *Hordeum vulgare* x *Hordeum bulbosum*, 72 heures après fécondation. On voit que les ovaires des fleurs non fécondées sont gonflés et stigmates turgescents.

PHOTO 2 : Effet de la protection contre la lumière sur la taille des caryopses autofécondés d'orge (15 jours après fécondation)
A gauche, lot provenant de l'épi coiffé d'un sachet brun,
A droite, le témoin non coiffé du sachet.

PHOTO 3 : A l'extrémité gauche, caryopse d'orge issu d'autofécondation (15 jours après fécondation)
Les quatre caryopses à droite, sont issus du croisement interspécifique (15 jours après fécondation).



1



2



3

PHOTO
LILLE

apparaissent et sont colorés en vert, et les stigmates flétrissent. La photo 1, planche III montre dans la partie du bas, trois pistils d'orge 72 heures après fécondation par rapport aux témoins non fécondés dans la partie supérieure de la photo.

Comme nous l'avons signalé dans le chapitre II, l'épi est coiffé après pollinisation d'un sachet en papier brun. Nous avons vérifié l'effet de cette protection contre la lumière sur des caryopses issus d'autofécondation. La photo 2, planche III montre deux lots de caryopses douze jours après fécondation : à gauche, l'épi avait été coiffé d'un sachet brun et les caryopses obtenus ont une taille significativement plus importante que celle du témoin situé à droite de la photo. L'effet est le même sur les caryopses issus du croisement interspécifique mais en plus, comme l'avait signalé PICKERING (1975, 1977 et 1982c), cette opération augmente le taux d'embryons différenciés.

La récolte des épis intervient onze à dix huit jours après leur pollinisation. Le choix du moment de la récolte est plus ou moins subjectif. Nous l'avons réalisé lorsque les premiers caryopses bien développés commencent à virer à la couleur jaune. A ce moment, il est possible d'éliminer les caryopses moins bien développés, de couleur jaune paille et même blanchâtre, qui présentent souvent un embryon globulaire de très petite taille. Seuls les caryopses bien développés seront stérilisés en vue d'extraire l'embryon et de le cultiver in vitro. Il est possible d'éliminer également les caryopses issus d'autofécondations accidentelles qui présentent une taille beaucoup plus importante que ceux issus du croisement interspécifique (photo 3, planche III et photo 2, planche I).

III. LES EMBRYONS

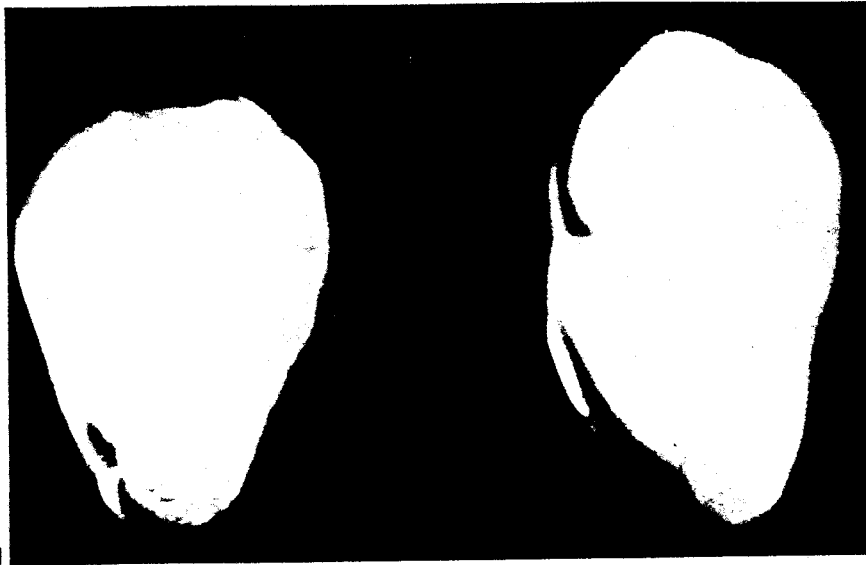
III.1 La morphologie des embryons au moment de la mise en culture in vitro

Au moment de l'extraction de l'embryon du caryopse, quatre types d'embryons sont possibles :

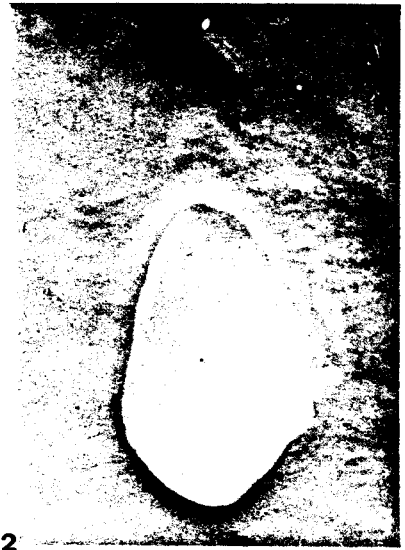
PLANCHE IV

MORPHOLOGIE D'EMBRYONS

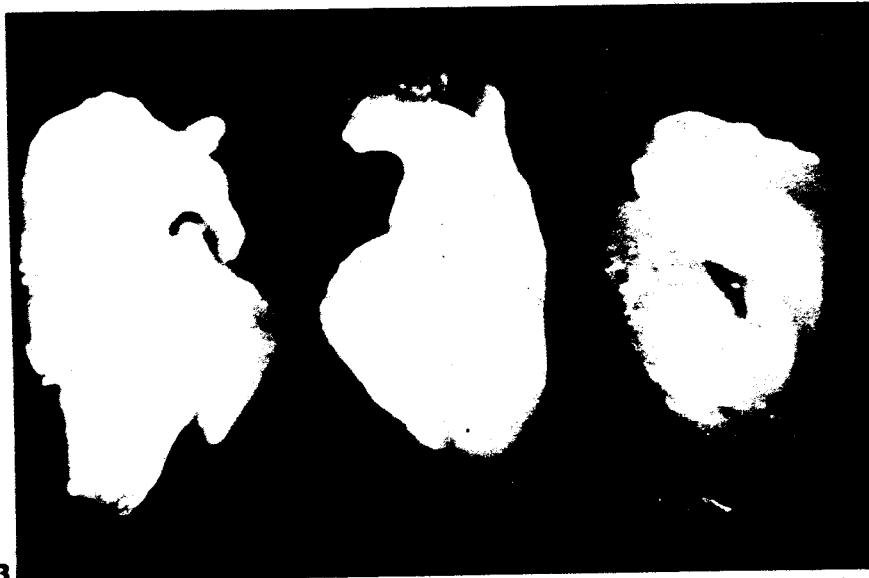
- PHOTO 1 : Embryons issus du croisement interspécifique cultivés sur milieu gélosé (15 jours après pollinisation),
- à gauche : embryon montrant un axe de symétrie longitudinal témoignant de la nature hybride de l'embryon
- à droite : embryon haploïde d'orge.
- PHOTO 2 : Embryon cuneiforme issu du croisement interspécifique (15 jours après pollinisation). Aucune ébauche d'organe n'est visible.
- PHOTO 3 : 3 embryons issus du croisement *Hordeum vulgare* x *Hordeum bulbosum*.
Ces types d'embryons à profils très tourmentés sont obtenus à l'approche de l'été et contenus dans des caryopses très verts et très gonflés.
- PHOTO 4 : A gauche, embryon haploïde (15 jours après fécondation),
A droite, embryon issu d'une autofécondation et de même âge.



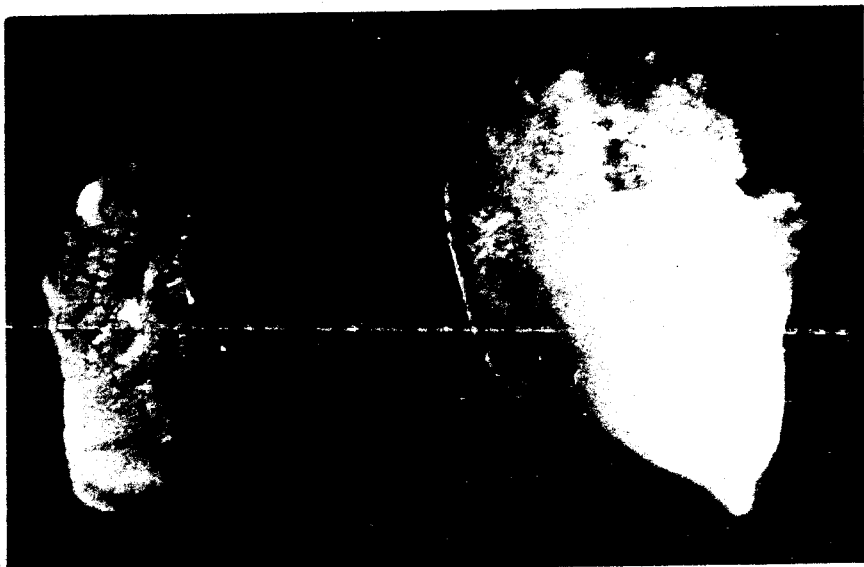
1



2



3



4

BUS
LILLE

1°) Des embryons globulaires de très petite taille, inférieurs à 0,5mm.

2°) Des embryons cunéiformes de taille plus importante qui peuvent atteindre 1,5mm de longueur (photo 2, planche IV).

Comme nous le verrons plus tard, ces deux types d'embryons ne sont plus cultivés du fait de leur faible taux de développement en plantes.

3°) Des embryons différenciés, c'est à dire présentant une gemmule. Leur longueur varie de 0,5 mm à 2,5mm (photo 1 et 4; planche IV).

Quelquefois, ces embryons peuvent prendre des formes très diverses comme le montre la photo 3, planche IV. Nous avons remarqué que ces embryons à forme très tourmentée apparaissent en saison plus chaude et sont contenus dans des caryopses très gonflés et très verts. L'albumen n'étant pas développé, l'embryon ne subit aucune contrainte et peut prendre ainsi des formes libres.

La photo 4, planche IV montre la différence de taille et de forme entre un embryon issu du croisement interspécifique et un embryon issu d'auto-fécondation.

4°) Des embryons différenciés et présentant un axe de symétrie longitudinal (photo 1, planche IV). Ce type d'embryons est hybride et sa taille est bien souvent supérieure au millimètre.

III.2 Mise en évidence du phénomène d'élimination chromosomique au niveau de l'embryon et de l'albumen

La mise en évidence du phénomène d'élimination chromosomique a été réalisée sur de jeunes embryons prélevés 3 à 5 jours après pollinisation ainsi que sur l'albumen. A ce stade, les mitoses somatiques des cellules de l'embryon présentent un nombre variable de chromosomes de 14 à 7 (photo 1 à 8, planche V). Ce nombre décroît en fonction du temps, montrant que l'élimination est progressive : ainsi le nombre de cellules à 7 chromosomes par rapport au nombre total de cellules en division est plus élevé à 5 jours après fécondation (56%) qu'à 4 ou 3 jours (37% et 17%, respectivement).

PLANCHE V

Mitoses somatiques des cellules de l'embryon et de l'albumen issus du croisement *Hordeum vulgare* cultivar Emir (2x) x *Hordeum bulbosum* souche B5.

PHOTOS 1 à 9 : Cellules de l'embryon 5 jours après fécondation.

Photo 1 : Prométaphase à 14 chromosomes (x1100)

Photo 2 : Métaphase à 13 chromosomes (x1000)

Photo 3 : Métaphase à 12 chromosomes (x1100)

Photo 4 : Métaphase à 11 chromosomes (x900)

Photo 5 : Métaphase à 10 chromosomes (x900)

Photo 6 : Fin de Prophase à 9 chromosomes (x800)

Photo 7 : Métaphase à 8 chromosomes (x1100)

Photo 8 : Métaphase à 7 chromosomes (x900)

Photo 9 : Prométaphase à 6 chromosomes. Il faut supposer dans ce cas qu'un chromosome du génome d'*Hordeum vulgare* a été éliminé. (x1100).

PHOTO 10 : Mitose somatique d'une cellule de l'albumen (3 jours après fécondation). Les 7 chromosomes d'*Hordeum bulbosum* ont été éliminés. (x900).



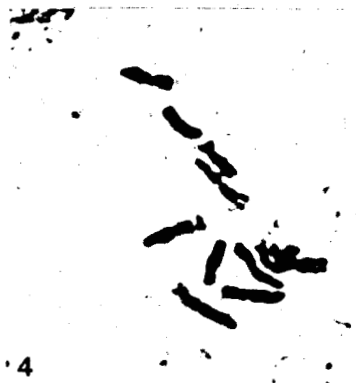
1



2



3



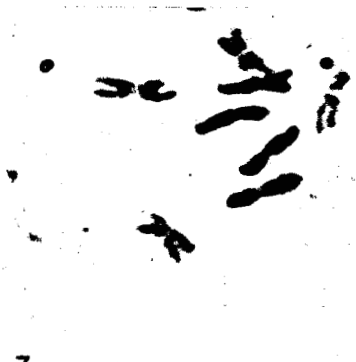
4



5



6



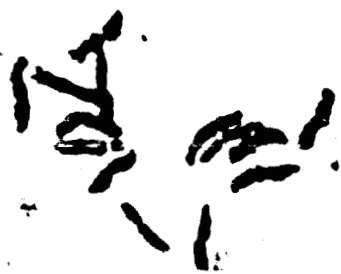
7



8



9



10



Le tableau suivant présente les dénombrements chromosomiques que nous avons réalisés au niveau des mitoses somatiques de jeunes embryons :

Nombre de jours après pollinisation	Nombre d'embryons analysés	Nombre de cellules comptables avec un nombre chromosomique de :							
		7	8	9	10	11	12	13	14
3	2	1	0	1	0	0	1	0	3
4	5	7	3	2	1	1	1	2	2
5	10	18	8	1	1	2	1	0	1

Parmi les nombreuses mitoses somatiques observées au niveau des embryons, une cellule n'a présenté que six chromosomes (photo 9, planche V) Ceci pourrait signifier qu'occasionnellement un chromosome du génome d'*Hordeum vulgare* est éliminé et confirmerait les observations de HUMPHREYS (1978).

L'albumen est très réduit même au niveau de caryopses d'une quinzaine de jours après fécondation. Il semble que son développement soit très vite stoppé dans le temps car aucune différence du point de vue taille n'a été notée entre les albumens de trois et quinze jours. Les observations cytologiques ont permis de montrer que l'élimination chromosomique a lieu puisque les cellules passent de 21 chromosomes à 14 chromosomes (photo 10, planche V).

IV LES PLANTES OBTENUES APRES LA CULTURE DES EMBRYONS

IV.1 La plante au moment du repiquage

Le passage de la plante du tube à la terre se fait au stade 3-4 feuilles. A ce stade, la plante hybride se différencie de la plante haploïde par la présence d'une pilosité de gainé importante, la plante haploïde étant glabre ou à peine velue.

Ce passage est critique pour deux raisons :

- d'une part, la jeune plante passe d'un milieu stérile à un environnement comportant de nombreux prédateurs, comme nous l'avons signalé auparavant.

- d'autre part, comme nous le verrons plus tard, l'effet saison est très marqué pour la réussite du programme. Les meilleurs résultats sont en effet obtenus lorsque les croisements ont lieu à l'approche de l'été ; ainsi les jeunes plantes seront en grande partie sorties des tubes en été, c'est à dire à contre saison. La serre dans laquelle nous avons travaillé jusque mi 82, n'était pas pourvue d'un système de refroidissement et des températures de 40°C ont été atteintes. Dans ces conditions, beaucoup de plantes ont été perdues ou n'ont pas tallé . De plus, plusieurs embryons sont placés dans un tube de culture pour des raisons pratiques ; ces embryons n'ont pas tous la même vitesse de développement, et c'est ainsi qu'au moment du repiquage en terre, les plus petites plantes du tube supportent mal ce transfert, et sont perdues.

IV.2 La plante haploïde

a) le caryotype

Sauf pour l'année 1980, comme nous l'avons vu auparavant, la presque totalité des plantes obtenues après développement des embryons sont haploïdes. La photo 1, planche VI montre une mitose somatique au niveau du méristème racinaire d'une plante haploïde d'orge.

P L A N C H E VI

Observations cytologiques de la plante haploïde d'orge cultivar Emir.

PHOTO 1 : Mitose somatique d'une cellule méristématique racinaire, montrant 7 chromosomes soit un seul génome (x750)

PHOTO 2 à 9 : Méiose de cellules mères de grains de pollen

Photo 2 : Métaphase I montrant 5 univalents et deux chromosomes présentant un appariement secondaire côté par côté (x950).

Photo 3 : Métaphase I avec 7 univalents (x1100)

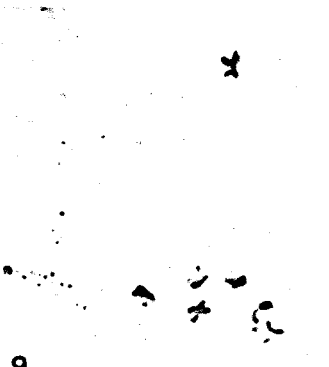
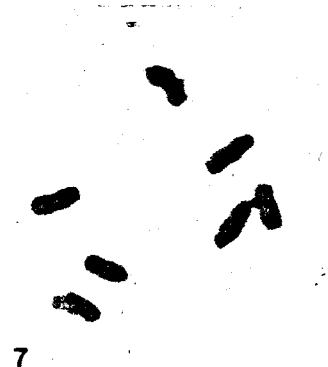
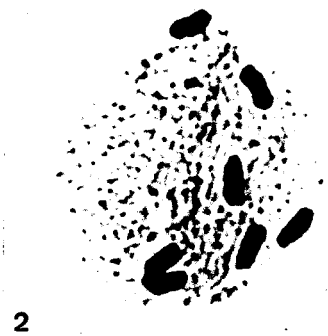
Photo 4 : Métaphase I présentant 3 univalents et 4 chromosomes avec appariements secondaires : 2 côté par côté, 2 extrémité-côté (x950).

Photo 5 et Photo 6 : Métaphase I : 5 univalents et 2 chromosomes avec appariement secondaire côté-côté (x950)

Photo 7 (x950) et Photo 8 (x850) : Métaphase I : 5 univalents et 2 chromosomes présentant un appariement secondaire extrémité-côté.

Photo 9 : Anaphase I montrant une répartition au hasard des chromosomes en deux lots (x850).

PHOTO 10 : Population pollinique de grains vides. Les grains pleins sont très rares (x125).



BUS
LILLE

b) la méiose et le pollen

Le comportement méiotique de quelques plantes haploïdes de la variété d'orge "Emir", a été analysé et montre très souvent, sauf pour la photo 3, planche VI, des appariements secondaires entre chromosomes non homologues. Ils sont de l'ordre de un à deux par cellule et peuvent avoir lieu :

- entre l'extrémité d'un chromosome et le côté d'un autre chromosome : photo 4, 5, 7 et 8, planche VI.
- entre les côtés des chromosomes : photo 2, 4, 6, planche VI.

Ces types d'associations secondaires sont décrits chez les haploïdes d'un grand nombre d'espèces (KIMBER et RILEY, 1963).

Chez les haploïdes, d'espèces allopolyploïdes, telles que le blé tendre, pour lequel de nombreuses études ont été réalisées (PERSON, 1955 - RILEY et CHAPMAN, 1957 - NATARAJAN et SWAMINATHAN, 1958), il semble fort probable pour que les associations entre côtés de chromosomes se produisent entre les homéologues.

Par contre, chez les espèces diploïdes telles que l'orge, ces appariements ont lieu entre chromosomes non homologues. RIEGER (1957) pense que tous les chromosomes ont, en général, tendance à s'apparier en prophase I. Quand il s'agit de chromosomes homologues, l'appariement se fait de préférence entre régions identiques, par contre, lorsqu'il n'y a présence que de chromosomes non homologues, la tendance générale à l'appariement est satisfaite ; il se réalise par des forces autres que l'homologie.

Plus récemment, SADASIVAIAH et KASHA (1971), s'appuyant sur des observations faites en prophase I et en métaphase I d'haploïdes d'orge, pensent que les appariements secondaires en métaphase I seraient des reliquats des nombreux appariements lors de la prophase I. Ils concluent que ce phénomène n'est pas à rattacher directement à l'homologie ou l'homéologie et que le nombre chromosomique de base de l'espèce orge est bien 7.

Ces divers cas de figures conduisent à la répartition au hasard en deux lots de chromosomes en Anaphase I (photo 9, planche VI) et à la production d'un pollen constitué essentiellement de grains vides (photo 10, planche VI), contenu dans des anthères de taille réduite (photo 1, planche VII). A maturité, les plantes sont stériles.

IV.3 La plante hybride

a) morphologie

L'hybride VB résulte du développement normal du zygote sans élimination des chromosomes d'*Hordeum bulbosum*. Il présente un ensemble de caractères phénotypiques permettant de le différencier de l'individu haploïde. Ces caractères s'expriment à tous les stades du développement :

- d'abord au stade embryon : l'embryon hybride présente un axe de symétrie longitudinal alors que l'embryon haploïde n'en présente pas.

- puis au stade végétatif, la plante hybride présente :

. une pilosité de gaine et de limbe très prononcée (photo 2, planche VII)

. un tallage très puissant, un feuillage vert foncé à limbes étroites

. un besoin en vernalisation très marqué.

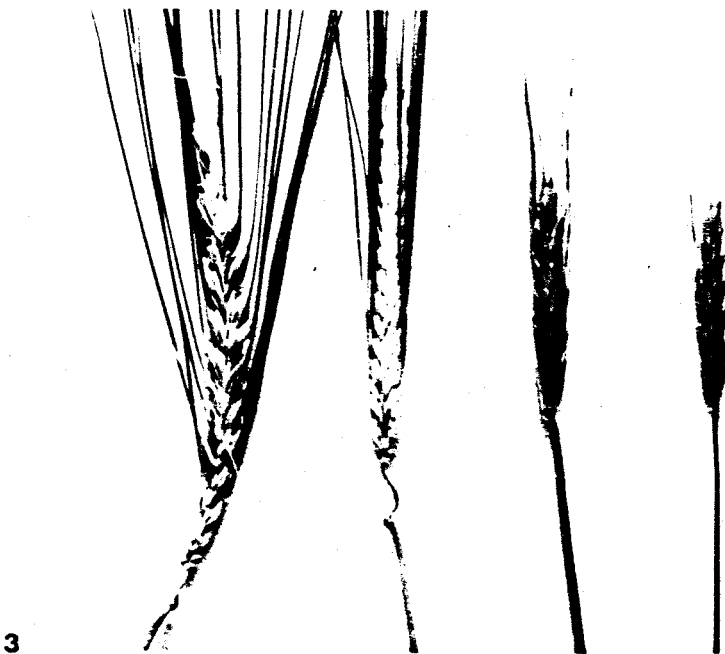
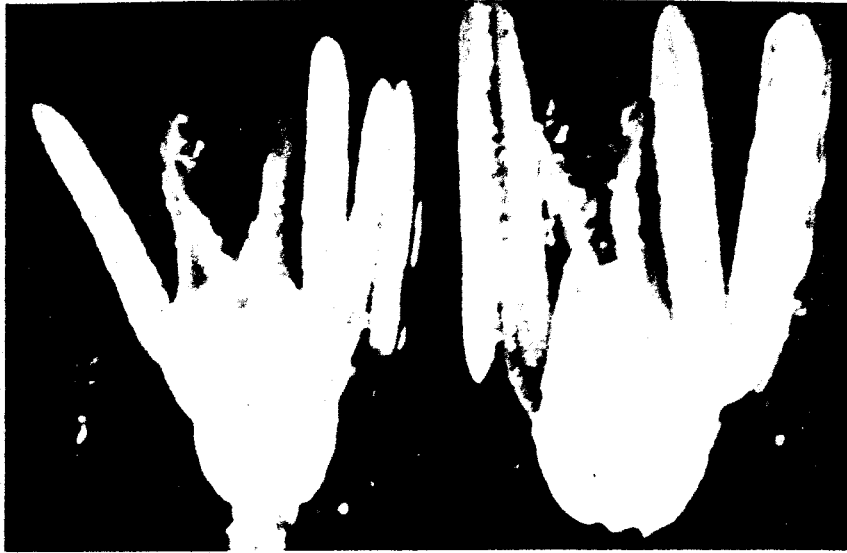
- au stade reproducteur, la morphologie de l'épi est proche de celle du parent *Hordeum bulbosum* (photo 3, planche VII), L'épi est stérile après autofécondation ou après recroisement avec *Hordeum vulgare* (LANGE et JOCHEMSEN, 1976a). L'aptitude à la perennité est également marquée.

b) caryotype

Les comptages chromosomiques réalisés au niveau des méristèmes racinaires montrent des cellules à 14 chromosomes (photo 1, planche VIII).

P L A N C H E VII

- PHOTO 1 : Androcée et gynécée de plantes haploïde et diploïde
à gauche : plante haploïde
à droite : plante diploïde
L'état haploïde se traduit par une diminution de la taille des organes de reproduction.
- PHOTO 2 : Reconnaissance morphologique de la plante hybride et de la plante haploïde
L'observation morphologique des plantes obtenues par développement de l'embryon issu du croisement interspécifique permet de limiter les contrôles cytologiques :
- à gauche : chaume d'*Hordeum bulbosum* présentant une pilosité très importante
- à droite : chaume d'un haploïde d'*Hordeum vulgare* glabre
- au centre : chaume de l'hybride interspécifique montrant une pilosité importante.
- PHOTO 3 : Morphologie des épis, de la gauche vers la droite :
- épi d'un haploïde traité à la colchicine, Co, montrant une bonne fertilité. L'opération de doublement des chromosomes a réussi puisque la plante est fertile.
- épi d'un haploïde traité à la colchicine totalement stérile. L'opération de doublement n'a pas réussi.
- épi de l'hybride interspécifique très proche phénotypiquement de celui d'*Hordeum bulbosum* à l'extrémité droite
- épi d'*Hordeum bulbosum*, on voit que celui-ci est très proche de l'épi hybride.



PHS
LIFE

Ces mitoses somatiques ont la particularité de ne présenter que deux chromosomes à satellite au lieu des trois attendus (2 d'*Hordeum vulgare* + 1 d'*Hordeum bulbosum*).

Cette anomalie a été décrite par LANGE et JOCHEMSEN (1976b) comme de l'amphiplastie différentielle, phénomène qui consiste dans la transformation d'un chromosome par passage dans un caryotype de plante hybride. Ce serait le chromosome 6 d'*Hordeum bulbosum* qui perdrait la constriction secondaire. Remarquons que ce phénomène n'est pas limité à ce cas précis (Y. CAUDERON, comm. pers., 1982).

c) la méiose et le pollen

La méiose de l'hybride a été analysée. Le pachytène ne montre pas de structures anormales (photo 2, planche VIII). Par contre, en diacinèse ou en métaphase I, on observe des figures d'appariements variés :

- la photo 3, planche VIII présente 12 univalents dont un en anneau et 1 bivalent
- la photo 4, 6 univalents, un bivalent et trois cas d'appariements secondaires
- la photo 5, 10 univalents et deux bivalents
- et la photo 6 montre un seul univalent, quatre cas d'appariements secondaires dont 2 avec la présence de 4 et 5 chromosomes.

Dans leur étude KASHA et SADASIVAIAH (1971) avaient montré un fort rapport d'homéologie ou d'homologie entre les génomes des deux espèces ; ils obtenaient en moyenne, 5 bivalents par cellule. Dans notre cas, il semble que les bivalents sont moins nombreux mais comme le font remarquer MORRISON et RAJHATHY (1959b) l'appariement est sous l'influence de facteurs de l'environnement et génétiques. Nos conditions expérimentales ne sont pas les mêmes que celles de KASHA et SADASIVAIAH.

P L A N C H E VIII

Observations cytologiques de la plante hybride : *Hordeum vulgare* cultivar Emir x *Hordeum bulbosum* souche B5.

PHOTO 1 : Mitose somatique d'une cellule méristématique racinaire montrant 14 chromosomes (x850)

PHOTO 2 à 8 : Méiose de cellules mères de grains de pollen

Photo 2 : Pachytène montrant un appariement entre chromosomes (x700)

Photo 3 : Métaphase I montrant 12 univalents dont un en anneau et un bivalent (x700)

Photo 4 : Métaphase I montrant 6 univalents, un bivalent et trois cas d'appariements secondaires. (x700)

Photo 5 : Métaphase I avec 10 univalents et 2 bivalents (x700)

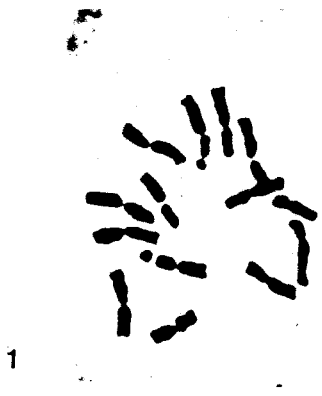
Photo 6 : Métaphase I présentant 1 seul bivalent et 4 cas d'appariements secondaires dont deux avec la présence de 4 et 5 chromosomes (x700)

Photo 7 : Anaphase I montrant la répartition au hasard des chromosomes et la présence d'un pont anaphasique (x700)

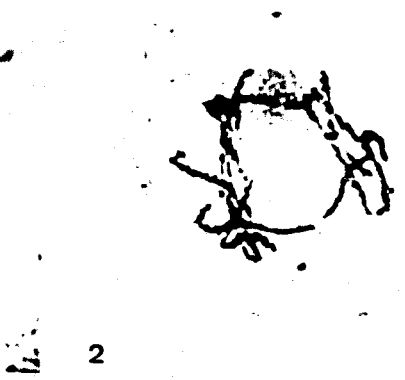
Photo 8 : Anaphase I, quelques chromosomes restent au niveau de la plaque équatoriale (x700)

Photo 9 : Population pollinique (x125)

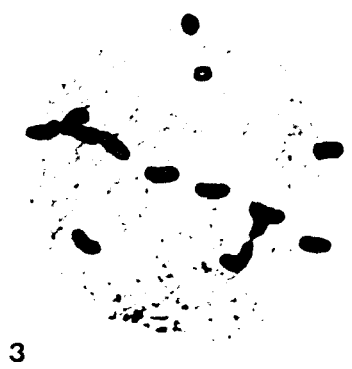
PHOTO 10 : Métaphase somatique de cellule de méristème racinaire de l'amphiploïde VVBB. Coloration Giemsa, par la technique du banding. (x800)



1



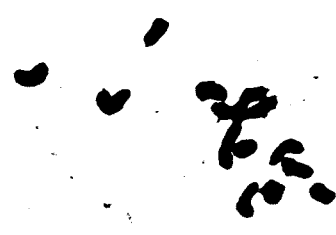
2



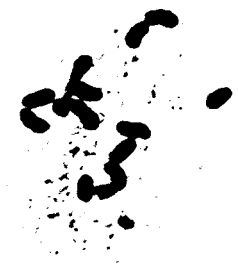
3



4



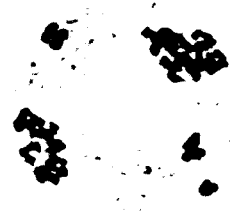
5



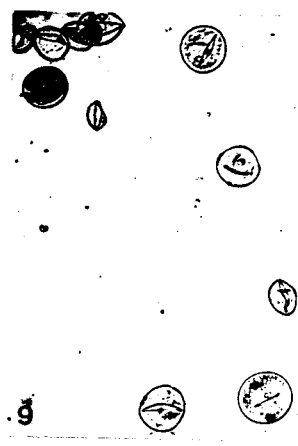
6



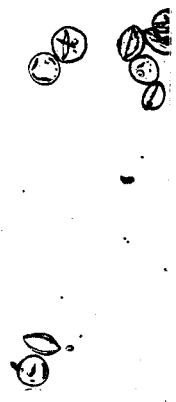
7



8



9



10



A l'anaphase I, la migration des chromosomes aux deux pôles est perturbée et il est courant d'observer des ponts anaphasiques (photo 7, planche VIII). De plus, certains chromosomes restent au niveau de la plaque équatoriale (photo 7 et 8, planche VIII). A l'anthèse, le pollen est de mauvaise qualité par la présence de nombreux grains vides et de grains très volumineux (photo 9, planche VIII).

IV.4 La plante haploïde doublée

a) la morphologie

La plante haploïde, traitée à la colchicine, appelée Co, est en réalité une chimère de secteurs haploïdes, diploïdes et même tétraploïdes. Nous avons remarqué que toutes les plantes ne possédant pas au moins 2 talles en Co, ont été stériles. Il est apparu donc important, d'avoir une bonne végétation de ces plantes traitées à la colchicine ce qui, comme nous l'avons vu, n'est pas toujours facile .

Sur les plantes fertiles, les taux de nouaison sont très variables, ils varient de un grain à plus de cent grains par plante, mais en général les épis sont partiellement fertiles (photo 3, planche VII). Les caryopses récoltés à maturité sur les plantes Co sont normaux. L'observation des plantes en C1 et C2, qui sont semées en plein champ , ne montrent pas la moindre trace de caractères d'*Hordeum bulbosum*. (J. LEFEBVRE, comm. pers., 1983)

b) le caryotype

Notre étude cytologique a porté sur les plantes en C1 issues de la germination des graines récoltées sur Co. Presque toutes les plantes étudiées sont diploïdes et présentent 14 chromosomes (photo 1, planche IX) dont 4 présentent une constriction secondaire. Seules quelques rares plantes sont tétraploïdes, elles sont actuellement en cours de végétation au laboratoire du Dr. LINDE LAURSEN.

PLANCHE IX

Observations cytologiques de l'haploïde doublé d'*Hordeum vulgare* cultivar Emir.

PHOTO 1 : Métaphase somatique d'une cellule méristématique racinaire, montrant 14 chromosomes (x850). On reconnaît facilement 3 chromosomes à satellite.

PHOTO 2 à 4 : Méiose des cellules mères de grains de pollen

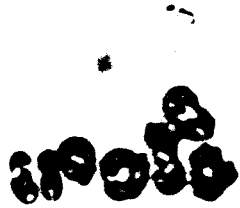
Photo 2 et 3 : Métaphase I montrant 7 bivalents (x1100)

Photo 4 : Anaphase I montrant le partage en deux lots identiques des chromosomes (x850).

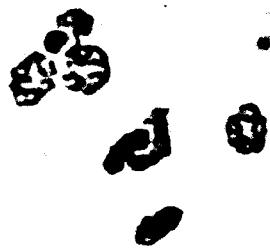
PHOTO 5 : Population pollinique de grains pleins (x125).



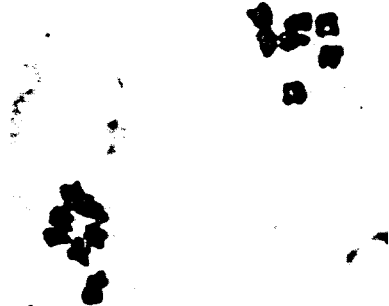
1



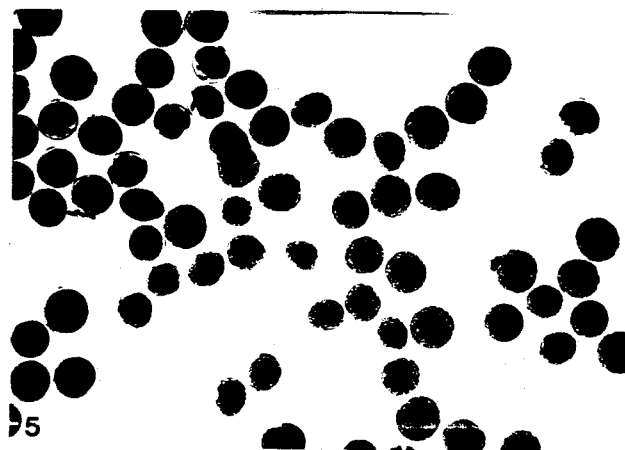
2



3



4



5



La coloration différentielle au Giemsa a porté sur des mitoses somatiques de notre matériel spécialement obtenues pour cette étude, en l'occurrence des haploïdes doublés de la variété Emir. Comme l'a montré LINDE LAURSEN (1978), des légères différences sur la nature des bandes entre cultivars d'orge existent et c'est la raison pour laquelle seule la variété Emir, dont l'idiogramme a été établi auparavant, a été étudiée.

Les germinations de ces graines d'haploïdes doublés d'Emir ont fourni un matériel d'étude moins bon, que celles obtenues dans notre étude préalable sur la variété. Aucune photographie n'a pu réellement être prise mais l'observation des lames a montré que tous les chromosomes de l'orge sont présents au niveau de ces mitoses somatiques et qu'il ne reste aucune trace de chromatine d'*Hordeum bulbosum* (I. LINDE LAURSEN, comm. pers., 1982)

c) la méiose et le pollen

La méiose des cellules mères de grains de pollen des plantes C1 est tout à fait normale et montre 7 bivalents (photo 2 et 3, planche IX). La migration des chromosomes vers les deux pôles de la cellule se fait bien (photo 4, planche IX). A l'anthèse, le pollen est de bonne qualité (photo 5, planche IX). A maturité, tous les épis sont fertiles.

IV.5 L'amphidiploïde VVBB

Au niveau de la plante hybride, comme au niveau de la plante haploïde d'ailleurs, aucune étude sur la coloration différentielle au Giemsa n'a été entreprise, suite aux conseils du Dr LINDE LAURSEN. En effet, cette technique de coloration est difficile et longue ; elle nécessite un matériel de bonne qualité présentant un maximum de divisions. C'est la cas de très jeunes germinations dans les conditions précisées

au chapitre II, mais pas celui de pointes de racines prélevées sur des plantes plus développées. Or l'haploïde et l'hybride étant stériles, nous aurions donc dû travailler dans les conditions les moins propices pour notre étude. Pour pallier cela, nous avons utilisé des germinations de l'amphidiploïde VVBB, que nous possédions dans notre collection, et de l'haploïde doublé VV qui sont cette fois, tous deux fertiles.

La photo 10, planche VIII montre une mitose somatique de l'amphidiploïde VVBB, colorée au Giemsa. Comme nous l'avait indiqué le Dr. LINDE LAURSEN, les chromosomes d'*Hordeum bulbosum* présentent très peu de bandes, alors que celles, présentées au niveau des chromosomes d'*Hordeum vulgare* sont bien caractéristiques.

V. CONCLUSION

L'analyse cytologique de notre matériel nous a permis de décrire et de sélectionner des embryons d'après leur morphologie. Sur le plan caryologique, nous n'avons pas décelé d'anomalies particulières sauf quelques rares cas de tétraploïdie après traitement à la colchicine.

CHAPITRE IV : ANALYSE DES DONNEES

I. TABLEAU GENERAL DES DONNEES PAR ANNEE

Les résultats globaux obtenus au cours des trois saisons consécutives de 1980 à 1982 sont reportés dans le tableau I que nous allons présenter.

I.1. Description du tableau avec présentation des pourcentages

Les résultats sont donnés par année aux étapes suivantes :

- le nombre de fleurs pollinisées préalablement castrées,
- le nombre de caryopses formés suite à la pollinisation. Le chiffre indiqué entre parenthèses représente le taux de nouaison, c'est à dire le nombre de caryopses formés par rapport au nombre de fleurs pollinisées. Il est de 13,39% pour 1980 - 26,76% pour 1981 et 56,59% pour 1982.

- le nombre d'embryons haploïdes ou hybrides mis en culture. Selon la définition donnée plus haut, l'embryon différencié est un embryon possédant une gemmule. Au cours des saisons 1981 et 1982, seuls ces types d'embryons ont été cultivés. En 1980, nous avons cultivé en plus, les embryons non différenciés (globulaires et cuneiformes) mais ils n'interviennent pas dans les données du tableau I. Il aurait été possible, déjà à ce stade, de séparer l'embryon hybride de l'embryon haploïde mais pour des raisons pratiques de manipulation, nous ne les séparons pas.



Caractères analysés	1980	1981	1982
Nombre de fleurs pollinisées	11 060	13 588	14 855
Nombre de caryopses formés (par rapport aux fleurs pollinisées)	1 481 (13,39%)	3 636 (26,76%)	8 406 (56,59%)
Nombre d'embryons différenciés (par rapport aux caryopses formés)	365 (24,65%)	1 280 (35,20%)	2 235 (26,59%)
Nombre de plantes haploïdes produites (par rapport aux embryons différenciés)	8 (2,19%)	399 (31,17%)	870 (38,93%)
Nombre de plantes hybrides VB produites (par rapport au total de plantes obtenues)	55 (87,30%)	3 (0,74%)	12 (1,36%)
Nombre de plantes fertiles obtenues après traitement à la colchicine des haploïdes (par rapport aux plantes traitées)	4 (50%)	192 (69,82%)	en cours

Tableau I : Bilan d'ensemble de l'haploïdiploïdisation, sur les 3 années

Le chiffre entre parenthèses représente le nombre d'embryons différenciés par rapport au nombre de caryopses formés. Il est de 24,65% ; 35,20% et 26,59% pour les trois années de 1980 à 1982.

- le nombre de plantes haploïdes produites jusqu'au stade 3-4 feuilles ; A ce stade, nous les retirons des tubes pour les repiquer en terre. Le chiffre entre parenthèses représente le nombre de plantes haploïdes produites par rapport au nombre d'embryons différenciés. Ce chiffre est de 2,19% ; 31,17% et 38,93% pour les trois années successives.

- le nombre de plantes hybrides VB produites jusqu'au stade 3-4 feuilles, reconnaissables à la pubescence des gaines, et repiquées en terre. Le chiffre entre parenthèses représente le nombre de plantes hybrides obtenues par rapport au nombre total de plantes repiquées en terre. Il est évident que, dans notre programme, ce type de plantes n'est pas recherché. En 1980, 87,30% des plantes obtenues sont hybrides contre 0,74% en 1981 et 1,36% en 1982. Nous expliquerons plus loin, la raison de cette baisse de pourcentage.

- le nombre de plantes fertiles obtenues après traitement à la colchicine, des plantes haploïdes. Le chiffre entre parenthèses représente le nombre de plantes fertiles obtenues par rapport au nombre de plantes haploïdes traitées. Il est de 50% en 1980 (sur 8 plantes traitées) et de 69,82% en 1981. Les résultats de 1982 n'y sont pas portés car ils sont encore incomplets. En outre, il faut remarquer que toutes les plantes ne sont pas traitées à la colchicine par suite de mortalité de jeunes plantes, à la sortie des tubes.

1.2. Amélioration générale des résultats

Le tableau I montre :

- une très nette augmentation des taux de nouaison de 1980 à 1982: Nous verrons ultérieurement que cette augmentation est le résultat d'une recherche de meilleures souches d'*Hordeum bulbosum* pour l'aptitude au croisement avec *Hordeum vulgare*.

- une augmentation de 1980 à 1981 du taux d'embryons différenciés puis une baisse de 1981 à 1982. Cette baisse met en évidence un facteur important de l'expérimentation : l'extraction des embryons des caryopses et leur mise en culture sur milieu gélosé est la seule étape de la technique dans laquelle intervient la sélection faite par l'expérimentateur. Au bout de la troisième année de manipulation, nous avons acquis davantage d'expérience pour définir un embryon comme différencié ; de ce fait, le tri fut plus sévère en 1982. Par voie de conséquence, le taux de plantes haploïdes en 1982 est supérieur à celui de 1981.

1.3. Enseignement des essais préliminaires de 1980

Comme nous l'avons vu dans le chapitre II, les croisements en 1980 ont été essentiellement réalisés en plein champ, avec comme parent mâle, un seul clone d'*Hordeum bulbosum* : Bo.

Le tableau I montre le faible taux de plantes obtenues : 8 haploïdes + 55 hybrides soit un total de 63 plantes par rapport au nombre de fleurs pollinisées : 11 060. Nous obtenons approximativement une plante pour près de deux cents fleurs traitées. De surcroît, 55 plantes sont hybrides, hybrides que nous avons contrôlés cytologiquement mais qu'il est toutefois aisé de reconnaître dès le stade 3 feuilles et très évidemment ultérieurement en végétation comme nous l'avons déjà signalé.

L'analyse du tableau II, représentant les résultats de cette même année, mais cette fois-ci en fonction du type d'orge (hiver ou printemps) et des conditions de culture (en champs ou en serre), nous amène à formuler un certain nombre de remarques :

- chez les orges d'hiver, les taux de nouaison sont supérieurs pour les plantes cultivées à l'extérieur. Cette différence ne reflète pas une éventuelle influence du milieu, mais le fait que nous avons choisi dans la serre, un croisement donnant de meilleurs résultats. En effet, les mêmes lignées ont été cultivées en champ et en serre. En serre, l'épiaison étant plus précoce, nous avons observé des croisements donnant de bons résultats et nous avons refait ces mêmes croisements sur des lignées cultivées en champs.

Caractères analysés	Orge d'hiver		Orge de printemps en champ
	en champ	en serre	
Nombre de fleurs pollinisées	4 730	3 050	3 280
Nombre de caryopses formés (par rapport aux fleurs pollinisées)	294 (6,2%)	73 (2,4%)	1 114 (34%)
Nombre d'embryons différenciés (par rapport aux caryopses formés)	48 (16,3%)	14 (19,20%)	303 (27,2%)
Nombre de plantes haploïdes produites (par rapport aux embryons différenciés)	2 (4,17%)	2 (14,29%)	4 (1,32%)
Nombre de plantes hybrides produites (par rapport au total de plantes obtenues).	4 (66,67%)	2 (50%)	49 (92,45%)
Nombre de plantes fertiles obtenues après traitement à la colchicine des haploïdes	1	1	2

Tableau II : Données de l'année 1980 en fonction du type d'orge
et des conditions de culture.



- les taux de nouaison sur les orges de printemps sont supérieurs à ceux observés sur les plantes de type hiver avec ce clone unique d'*Hordeum bulbosum*

- Sur les 1481 caryopses formés (tableau 1), 1116 embryons étaient non différenciés, c'est à dire que des types globulaire ou cuneiforme. Ils ont été cultivés sur des milieux contenant soit 20, 40 ou 80g/ litre de saccharose ; 3 seulement ont donné des plantes (2 sur le milieu à 80g/l de saccharose, 1 sur le milieu à 40g/litre). Dans beaucoup de cas, les embryons se sont nécrosés 1 à 2 jours après leur mise en culture. Dans d'autres cas, nous avons obtenu sur les milieux riches en saccharose, des cals. Des cals ont également été obtenus lors de la culture d'embryons différenciés côté ébauche de coléoptile face au milieu. Dans tous les cas où les caryopses étaient jaunes ou blanchâtres, desséchés et ridés, les embryons étaient surtout du type globulaire mais aussi plus rarement cuneiforme. Les années suivantes, nous ne disséquons plus ces caryopses pour extraire les embryons mais nous en tenons toujours compte dans le pourcentage de caryopses formés.

Au terme de cette première année d'essais, il semblait important d'améliorer ces résultats qui ne pouvaient pas être envisageables au niveau d'un système de production pour deux raisons essentielles :

- tout d'abord, avec ce seul clone d'*Hordeum bulbosum*, le taux de nouaison, d'embryons différenciés et à fortiori le taux de plantes obtenues sont trop faibles. La recherche de meilleures souches d'*Hordeum bulbosum* nous est apparue fondamentale et une collection a été constituée auprès de différents laboratoires étrangers en vue de les tester l'année suivante.

- en second lieu, la proportion d'hybrides interspécifiques (près de 90% des plantes obtenues) doit être fortement diminué. Des résultats similaires ont été obtenus par PICKERING (1980b) lorsque les expériences sont réalisées dans les mêmes conditions que les nôtres, c'est à dire en plein champ, sous des conditions climatiques médiocres. Il apparaît donc nécessaire de mieux maîtriser les conditions de l'environnement et c'est la raison pour laquelle nous avons travaillé en serre à partir de 1981. Remarquons cependant, qu'il semblait à priori plus intéressant de produire des haploïdes à partir de plantes en pépinière qui ont été soumises à une pression de sélection du milieu alors que les plantes cultivées en serre n'y sont pas soumises.

Nous nous proposons maintenant de présenter en détail, les résultats des saisons 1981 et 1982 : Durant 1981, nous avons essayé d'isoler des souches d'*Hordeum bulbosum*, bonnes productrices d'haploïdes, et durant 1982, ces souches ont été testées, en même temps que les facteurs du milieu ont été analysés.

II. RECHERCHE DE SOUCHES D'*HORDEUM BULBOSUM*

II.1. Remarques préliminaires

a) Sur le caractère génétique des souches d'*Hordeum vulgare* et d'*Hordeum bulbosum*

- les orges cultivées sur lesquelles ont été réalisés les croisements sont à des niveaux plus ou moins avancés en sélection de la F1 à la F5 donc à des états d'hétérozygotie plus ou moins importants. Dans notre étude et pour des raisons matérielles évidentes, toutes les souches d'*Hordeum bulbosum* n'ont pas pu être testées sur une même plante correspondant à la descendance d'un même croisement à un niveau de sélection donné mais sur plusieurs plantes. Ces plantes, issues d'un même épi en Fn-1 seront d'autant plus proches génétiquement en Fn, que n sera important. Nous avons donc réalisé une approximation en groupant sous la même appellation plusieurs plantes partiellement hétérozygotes et cette approximation sera d'autant moins bonne que l'on s'adressera à du matériel jeune en sélection.

-- Le parent mâle, *Hordeum bulbosum* nous offre à priori la même situation génétique ; en effet, l'auto-incompatibilité très élevée d'*Hordeum bulbosum* (HESLOP HARRISON, 1979) favorise l'allogamie et maintient par conséquent l'hétérozygotie. Les gamètes mâles que nous utilisons ont une constitution génétique différente même au niveau d'une plante unique ou de plusieurs plantes obtenues par voie asexuée. Toutefois, des études récentes (PICKERING, 1983b) montrent que des plantes d'*Hordeum bulbosum* obtenue par voie sexuée mais tirées d'une même population ont une variabilité génétique faible à l'égard des caractères

qui nous intéressent dans ce travail d'haploïdisation de l'orge, à savoir : le taux de nouaison, la qualité des embryons et la fréquence des plantes hybrides. Cette variabilité sera donc plus faible au niveau d'une plante ou de plusieurs obtenues par division d'une touffe unique.

b) sur le point de vue du sélectionneur dans l'analyse des données

Afin d'établir rapidement un plan de travail pour la production à grande échelle d'haploïdes doublés d'orge d'hiver, nous avons construit notre analyse des données en nous appuyant sur les bases suivantes : D'après les études bibliographiques du chapitre II, il semblerait que les génotypes des deux parents *H. vulgare* et *H. bulbosum* interviendraient dans le phénomène d'haploïdisation. Or, les orges desquelles nous tirons les haploïdes sont données par le sélectionneur ; elles sont choisies en fonction des critères agronomiques précis, déterminés soit sur les plantes elles mêmes pour du matériel à partir de la F2, soit sur les parents utilisés pour le croisement, s'il s'agit d'un matériel en F1. Les critères ne tiennent bien entendu pas compte de l'aptitude qu'auraient ces lignées d'orge à s'haploïdiser par le système *bulbosum*, et c'est la raison pour laquelle notre analyse statistique portera principalement sur le facteur *H. bulbosum* dans l'analyse des données

11.2. Les tableaux de données

A partir des croisements réalisés entre les 8 souches d'*H. bulbosum* par les 50 lignées d'orge, trois tableaux ont pu être réalisés :

- le tableau des taux de nouaison (tableau III)
- le tableau des taux d'embryons différenciés
- le tableau des taux de plantes haploïdes produites.

Tableau III : *Hordeum vulgare* x *H. bulbosum*

Taux de nouaison des différents croisements entre génotypes d'orge et souches d'*H. bulbosum*

V \ B	Souches d' <i>Hordeum bulbosum</i>							
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
V 01	53	32	63	39	50	68	30	65
V 02	17	0	0	64	0	32	77	38
V 03	23	17	31	21	8	23	24	0
V 04	12	0	11	43	18	0	0	69
V 05	58	26	40	10	54	7	34	15
V 06	13	21	47	5	86	25	18	14
V 07	38	17	10	32	80	14	80	44
V 08	33	29	28	36	35	67	3	61
V 09	76	38	56	70	40	77	68	44
V 10	50	0	0	43	68	35	84	33
V 11	66	29	41	46	49	57	40	41
V 12	45	8	16	8	34	33	23	26
V 13	31	28	5	20	25	18	22	19
V 14	10	25	6	88	29	31	14	25
V 19	30	52	44	21	56	59	11	38
V 16	14	25	28	30	45	54	33	32
V 17	39	13	21	32	53	47	47	62
V 18	42	17	0	25	49	23	46	62
V 19	28	3	44	21	26	25	23	21
V 20	31	25	11	40	56	30	38	38
V 21	29	24	25	29	31	29	33	29
V 22	52	18	22	41	63	15	51	36
V 23	39	0	22	23	50	14	0	0
V 24	59	31	40	41	77	35	44	44
V 25	21	8	46	3	38	7	76	0
V 26	10	8	20	15	20	33	33	31
V 27	9	19	27	33	65	31	32	56
V 28	20	16	44	19	46	29	36	44
V 29	0	13	0	14	17	18	19	15
V 30	13	0	12	27	4	20	0	14
V 31	39	64	77	72	76	65	27	99
V 32	99	39	99	22	99	67	77	91
V 33	53	47	82	99	99	53	85	99
V 34	21	0	13	5	20	0	21	0
V 35	0	0	9	4	12	20	22	50
V 36	25	17	20	5	35	53	12	11
V 37	35	0	0	21	9	15	14	23

Génotypes d'orge

BUS LILLE

Tableau III (suite)

V \ B	Souches d' <i>Hordeum bulbosum</i>							
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
V 38	32	0	0	4	0	21	0	23
V 39	11	9	14	2	20	69	58	8
V 40	0	3	0	0	30	0	11	0
V 41	31	19	11	17	18	23	24	4
V 42	0	0	2	6	52	22	5	4
V 43	63	0	0	4	9	20	33	15
V 44*	3	4	22	32	16	<u>53</u>	17	9
V 45*	4	5	4	9	19	9	<u>27</u>	28
V 46*	<u>30</u>	3	11	21	8	<u>40</u>	11	18
V 47*	8	0	6	13	14	<u>16</u>	7	13
V 48*	<u>32</u>	15	25	40	<u>49</u>	9	<u>45</u>	17
V 49*	0	11	56	14	23	7	<u>43</u>	9
V 50	8	0	19	4	13	4	2	8

* : représente les orges à 6 rangs d'hiver.
Les autres, sont à 2 rangs d'hiver.

Les valeurs soulignées, dans les orges à 6 rangs, correspondent au meilleur rendement par souche d'*H. bulbosum* retenue dans notre combinaison pollinique (B1+B5+B6+B7).



Nous avons, par croisement, les résultats d'au moins un épi de fleurs pollinisées mais dans la plupart des cas, les résultats portent sur 2 à 4 épis qui sont à considérer comme des répétitions. Dans le premier cas, la variable portée dans les tableaux est le résultat d'un épi ; Dans le second cas, elle est la moyenne des répétitions. Un exemple de tableau est donné pour les taux de nouaison (tableau III). Les répétitions permettent de limiter les effets dus à la saison ; en effet, nous avons essayé de ne pas intervenir sur une même lignée et avec le même pollinisateur deux fois à une même époque de l'année et c'est ainsi que chaque répétition a été débutée lorsque l'ensemble des 50 lignées d'orge avaient été croisées par les 8 souches d'*Hordeum bulbosum*. De plus, pour limiter "l'effet plante", nous avons également pris la précaution de polliniser les différents épis d'une même plante avec des souches d'*Hordeum bulbosum* différentes.

11.3. Comparaison entre les souches d'*Hordeum bulbosum* dans les différents stades de la méthode.

Nous présentons dans le tableau IV, l'ensemble des trois tableaux précédemment décrits, mais les résultats sont cette fois-ci, donnés en fonction des diverses souches d'*Hordeum bulbosum*, toutes lignées d'orge confondues. De plus, nous indiquons dans la dernière colonne, le taux de plantes haploïdes produites par rapport au nombre de fleurs pollinisées.

a) Mise en évidence du taux de nouaison comme facteur limitant principal de la méthode

L'analyse statistique que nous avons utilisée est le test G décrit par SOKAL et ROHLF (1981). Cette analyse montre que les valeurs de G, portées dans le bas du tableau, sont significatives et témoignent de l'influence de la souche d'*Hordeum bulbosum* sur la réussite du programme d'haploïdisation. Il faut remarquer que G est nettement plus important pour le caractère "taux de nouaison" (259,46) comparé aux autres caractères représentant le taux d'embryons différenciés (61,92) et le taux de plantes haploïdes obtenues (28,30). L'influence de la souche d'*Hordeum bulbosum*, très importante sur l'aptitude au croisement avec *Hordeum vulgare*, le serait à un degré moindre sur le pourcentage d'embryons différenciés et beaucoup moins sur l'aptitude de ces embryons à se



Souche d' <i>H. bulbosum</i>	Nombre de fleurs nouées (1)	Nombre de fleurs non nouées (2)	Taux (3)	Nombre embryons différenciés (4)	Nombre embryons non différenciés (5)	Taux (6)	Nombre de plantes haploïdes produites (7)	Nombre embryons sans développement (8)	Taux (9)	Nombre de plantes haploïdes produites (10)	Nombre de fleurs pollinisées moins Nombre plantes haploïdes (11)	Taux (12)
B1	508	1263	28,68%	189	319	37,20%	69	120	36,51%	69	1702	3,90%
B2	260	1474	14,99%	56	204	21,54%	10	46	17,86%	10	1724	0,58%
B3	385	1388	21,71%	162	223	42,08%	50	112	30,86%	50	1723	2,82%
B4	400	1249	24,26%	119	281	29,75%	32	87	26,83%	32	1617	1,94%
B5	697	1266	35,34%	270	422	39,02%	104	166	38,52%	104	1854	5,31%
B6	419	1020	29,12%	155	264	36,99%	50	105	32,26%	50	1389	3,47%
B7	478	1097	30,35%	194	284	40,59%	61	133	31,44%	61	1514	3,87%
B8	494	1195	29,25%	135	359	27,33%	23	112	17,04%	23	1666	1,36%
	G = 259,46 ^{***}			G = 61,92 ^{***}			G = 28,30 ^{***}			G = 117,546 ^{***}		

*** : Signification à 0,001

Tableau IV : Résultats comparés des souches d'*Hordeum bulbosum*, dans le croisement *H. vulgare* x *H. bulbosum*, pour la production d'haploïdes d'orge. Test G.

développer en plantes. En d'autres termes, les réussites par rapport au stade précédent différencient de moins en moins les souches entre elles.

Il faut reconnaître cependant qu'il est étonnant d'observer une différence entre les embryons des différentes souches d'*Hordeum bulbosum*, dans leur aptitude à donner une plante haploïde (% des plantes haploïdes du tableau IV), car un embryon différencié devrait se développer normalement, indépendamment de la souche d'*Hordeum bulbosum*. Nous avançons l'hypothèse suivante pour expliquer cette différence : certaines souches d'*Hordeum bulbosum* pourraient induire même s'ils sont différenciés, des embryons de plus petite taille que ceux induits par d'autres souches et leur aptitude à se développer en plante serait plus difficile. Il y aurait ainsi, une qualité différente entre embryons différenciés. Ce résultat confirme les observations de NOVAK (1977) mais pas celles de PICKERING et MORGAN (1983).

De l'ensemble de ces résultats, le fait important est le suivant :

Parmi les différentes étapes de la méthode expérimentale, l'aptitude à donner des caryopses apparaît comme un facteur limitant pour le rendement en plantes haploïdes. Les étapes suivantes y interviennent à un degré plus faible. Aussi allons nous analyser plus loin, les relations entre les facteurs *H. vulgare* et *H. bulbosum* pour le taux de nouaison.

b) Hiérarchie des souches d'*Hordeum bulbosum* pour le rendement en plantes haploïdes

L'analyse du nombre de plantes haploïdes produites par rapport au nombre de fleurs pollinisées (dernière colonne du tableau IV) permet de réaliser un classement des souches d'*H. bulbosum* qui peuvent s'ordonner en ordre décroissant pour leur aptitude à induire des haploïdes de la manière suivante : B5 > B1 > B7 > B6 > B3 > B4 > B8 > B2. La souche B5 donne en moyenne sur les cinquante lignées d'orge étudiées plus de cinq haploïdes pour cent fleurs pollinisées, ce qui correspond à plus de un haploïde par épi d'orge traité (un épi d'orge 2 rangs compte en moyenne 20 fleurs). Cette souche B5 se détache nettement des autres souches ; à l'autre extrémité, B2 montre un très faible taux de réussite.

4774
5008
1222

Type d'orge d'hiver	Nombre de fleurs nouées (1)	Nombre de fleurs non nouées (2)	Taux (3)	Nombre d'embryons différenciés (4)	Nombre d'embryons non différenciés (5)	Taux (6)	Nombre de plantes haploïdes produites (7)	Nombre d'embryons sans développement (8)	Taux (9)	Nombre de plantes haploïdes produites moins Nombre plantes haploïdes (10)	Nombre de fleurs pollinisées (11)	Taux (12)
6 rangs (n ₁ = 48)	421	2011	17,31% + 14,48%	156	259	37,59%	45	111	28,85%	45	2387	11,85%
2 rangs (n ₂ = 352)	3215	7942	28,28% + 23,90%	1124	2097	34,90%	345	770	31,49%	345	10811	3,09%
	G = 145,05 ^{xxx}			G = 1,16 N.S.			G = 0,46 N.S.			G = 12,28 ^{xxx}		

xxx : signification à 0,001
N.S. : non significatif

n₁ = 6 lignées d'orge 6 rangs x 8 souches d'*H. bulbosum* = 48
n₂ = 44 lignées d'orge 2 rangs x 8 souches d'*H. bulbosum* = 352

Tableau V : Résultats comparés orges à 6 rangs et orges à 2 rangs d'hiver pour leur aptitude à l'haploïdisation par la méthode bulbosum. Test G.

En résumé, l'analyse statistique du tableau IV nous a permis de préciser :

- qu'il existe une variabilité entre nos diverses souches d'*Hordeum bulbosum*, pour leur aptitude à produire des haploïdes d'orge,
- et que le taux de nouaison était le facteur limitant qui différencie le plus les souches entre elles.

11.4. Effet du facteur *Hordeum vulgare* 2 rangs - 6 rangs, dans les différentes étapes de la méthode expérimentale (Tableau V)

Pour donner un effet d'ensemble du facteur *vulgare*, nous regroupons les données des différentes étapes de la méthode expérimentale en deux classes : pourcentages pour les orges 2 rangs, pourcentages pour les orges 6 rangs. Dans les colonnes 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 et 11, nous donnons les valeurs absolues d'une étape en sommant les valeurs obtenues dans les différentes lignées qui composent les orges 6 rangs ou les orges 2 rangs. A ces valeurs nous appliquons le test G. Celui-ci démontre que les orges 2 rangs et 6 rangs sont significativement différentes pour le taux de nouaison et le taux de plantes haploïdes par rapport au nombre de fleurs pollinisées. Les orges 2 rangs présentent donc une meilleure aptitude à donner des caryopses et des plantes haploïdes, que les orges à 6 rangs. Par contre, pour le taux d'embryons différenciés et le taux de plantes haploïdes par rapport au nombre d'embryons différenciés, les différences entre les orges 2 rangs et 6 rangs ne sont plus significatives. Ceci tend à montrer qu'une fois les caryopses obtenus, le type d'orge 2 rangs ou 6 rangs, n'intervient plus sur la qualité des embryons au moment de leur culture, ni sur le taux de plantes obtenues à partir du développement de ces embryons. Le stade limitant dans notre expérimentation est bien le stade de nouaison, constatation que nous avons déjà faite plus haut.

Il faut cependant nuancer les conclusions si nous prenons en compte la variabilité à l'intérieur des 6 rangs et des 2 rangs, indiquée pour les taux de nouaison (tableau V, colonne 3), : les écart-types sont très élevés mais les deux moyennes restent significativement différentes

$$(\bar{x}(2 \text{ rangs}) - \bar{x}(6 \text{ rangs})) = 10,97 ; S_{\bar{x}(2 \text{ rangs}) - \bar{x}(6 \text{ rangs})} = 2,44$$

$$t = 4,49^{xxx} \quad (xxx = \text{signification à } 0,001).$$

Méthode de calcul décrite par FRONTIER (1981).

11.5. Effets conjugués du facteur *H. bulbosum* et du facteur *H. vulgare* sur le taux de nouaison

A partir du tableau de croisement diallèle (tableau III) qui est un tableau de correspondance pour les taux de nouaison, trois méthodes d'analyse ont été appliquées :

- l'analyse de variance qui permet de déterminer s'il existe des différences entre souches d'*Hordeum bulbosum* sur l'ensemble des lignées d'*H. vulgare* confondues et entre lignées d'*H. vulgare* sur l'ensemble des souches d'*H. bulbosum* confondues,

- l'analyse factorielle des correspondances, analyse multidimensionnelle, permettant d'étudier l'ensemble des variables simultanément. Le principe de cette méthode d'analyse est décrit par FENELON (1981).

- la méthode graphique, qui, à l'inverse de l'analyse multidimensionnelle, étudie chaque variable isolément.

Les deux dernières méthodes consistent à comparer des profils des données par souche *H. bulbosum* ou *H. vulgare*. Les figures 2 à 4 donnent un exemple de ces profils. Le profil B6 est la ligne qui relie les différents points des taux de nouaison pour les différentes orges. Dans notre cas, ce profil est composé de 50 points. Inversement, le profil V1 est composé des 8 points d'*Hordeum bulbosum*.

Nous verrons ces trois méthodes d'analyse successivement.

a) Analyse de variance

Pour estimer la variabilité déterminée par les deux parents pour le caractère taux de nouaison, nous avons réalisé une analyse de variance à deux facteurs sur le tableau III. Nous avons suivi la méthode décrite par SOKAL et ROHLF (1981).

L'analyse est donnée dans le tableau ci-dessous :

Origine de la variation	Somme des carrés	ddl.	Ecart quadratique moyen	F
Entre les <i>H. bulbosum</i> (colonnes)	14 646,88	7	2 092,4114	7,58 ^{***}
Entre les <i>H. vulgare</i> (lignes)	103 727,01	49	2 116,8778	7,67 ^{***}
Erreur	94 587,87	343	275,7664	
	----- 212 961,76	----- 399		

*** : Signification < 0,001

$$F_{343}^7(0,001) = 3,27$$

$$F_{343}^{49}(0,001) = 1,7$$

Dans leur aptitude à donner des caryopses, les souches *H. vulgare* et *H. bulbosum*, sont significativement différentes entre elles. En outre, si on compare les valeurs de F obtenues à leur seuil de signification de 0,001, on voit que les différences entre lignées d'*Hordeum vulgare* sont plus importantes que celles entre les souches d'*H. bulbosum*. Il n'est donc pas possible qu'une seule souche d'*H. bulbosum* donne de bons rendements en caryopses pour l'ensemble des lignées d'*H. vulgare*. Par contre, il est possible que quelques souches *H. bulbosum* mélangées, puissent donner de bons rendements en caryopses sur l'ensemble des lignées d'*H. vulgare*. Elles auraient l'une par rapport à l'autre, des effets complémentaires, l'une donnant par exemple de bons résultats avec un groupe de lignées d'*H. vulgare* et l'autre avec un autre groupe de lignées d'*H. vulgare*. Le mélange d'*H. bulbosum* couvrant ainsi toutes les souches d'*H. vulgare*. En d'autres termes, l'objectif que nous nous fixons maintenant est de mettre en évidence des aptitudes spécifiques à la combinaison des 8 souches d'*H. bulbosum* avec les 50 lignées d'orge. La méthode d'analyse est celle de l'analyse factorielle des correspondances.



Tableau VI : Valeurs propres de l'analyse factorielle.

NUM.	ITER	VAL. PROPRE	POURCENT.	CUMUL
2	0	.7422507	23.341	23.341
3	2	.06096277	19.170	42.511
4	2	.05127883	16.125	58.636
5	2	.4240879	13.336	71.971
6	2	.03543364	11.142	83.114
7	4	.03326721	10.461	93.575
8	2	.02043220	6.425	100.000

Tableau VII : paramètres de l'analyse factorielle pour les souches d'*Hordeum bulbosum*

J1	QLT	POID	INR	1#F	COR	CTR	2#F	COR	CTR	3#F	COR	CTR	4#F	COR	CTR
B1	962	128	137	45	6	3	-244	177	126	-451	602	511	-244	177	182
B2	332	69	79	53	8	3	345	323	134	-3	0	0	18	1	1
B3	647	109	134	321	262	151	371	350	245	-30	2	2	114	33	33
B4	579	118	130	-407	475	264	-32	3	2	180	92	74	55	9	8
B5	732	167	124	289	354	188	59	15	9	195	161	123	-217	202	188
B6	694	134	119	-170	104	53	146	76	47	-250	224	165	286	290	259
B7	965	139	147	210	132	83	-435	567	435	157	73	67	254	193	213
B8	652	136	130	-372	460	255	20	1	1	147	71	57	-190	120	117

b) L'analyse factorielle des correspondances

Dans l'optique de cette méthode, notre problème de recherche se pose de la manière suivante (LEFEBVRE, 1980) :

- dans quelle mesure certaines souches d'*Hordeum bulbosum* ont-elles des aptitudes à la combinaison différentes avec les lignées d'orge ?
- certaines lignées d'orge ont-elles des aptitudes à la combinaison différentes avec les souches d'*Hordeum bulbosum* ?
- et d'une façon plus globale, peut-on d'un tel tableau, faire ressortir certains groupes d'*Hordeum bulbosum*, certains groupes d'orge, et des liaisons entre ces groupes ?

Comme nous l'avons déjà signalé, seule la première question présente pour nous un intérêt pratique en sélection. (paragraphe 11.1b de ce chapitre), et c'est la raison pour laquelle nous négligeons l'étude des profils de réponse des diverses lignées d'orge en fonction du type d'*Hordeum bulbosum* utilisé.

La sortie mécanographique de l'ordinateur donne :

- le tableau des valeurs propres : tableau VI
- le tableau des *Hordeum bulbosum* : tableau VII
- les plans des facteurs, dont un exemple est donné figure 1 que nous allons interpréter maintenant :

La valeur propre représente, en pourcentage, l'inertie du nuage de points, c'est à dire l'étendue du nuage. Dans les correspondances, la première valeur propre ou triviale est très voisine de l'unité (0,99999750), elle donne les coordonnées du centre de gravité du nuage. La valeur propre 2 qui correspond au premier facteur utile, de même que les suivantes, sont faibles (0,07422507 et moins) ce qui signifie que le nuage de points n'est pas très étiré, en d'autres termes qu'il n'y a pas d'oppositions franches entre souches d'*Hordeum bulbosum*. Le cumul des 4 premiers facteurs extraits de l'analyse, expliquent 71,97% de l'inertie, et nous avons donc étudié que les 4 premiers facteurs.

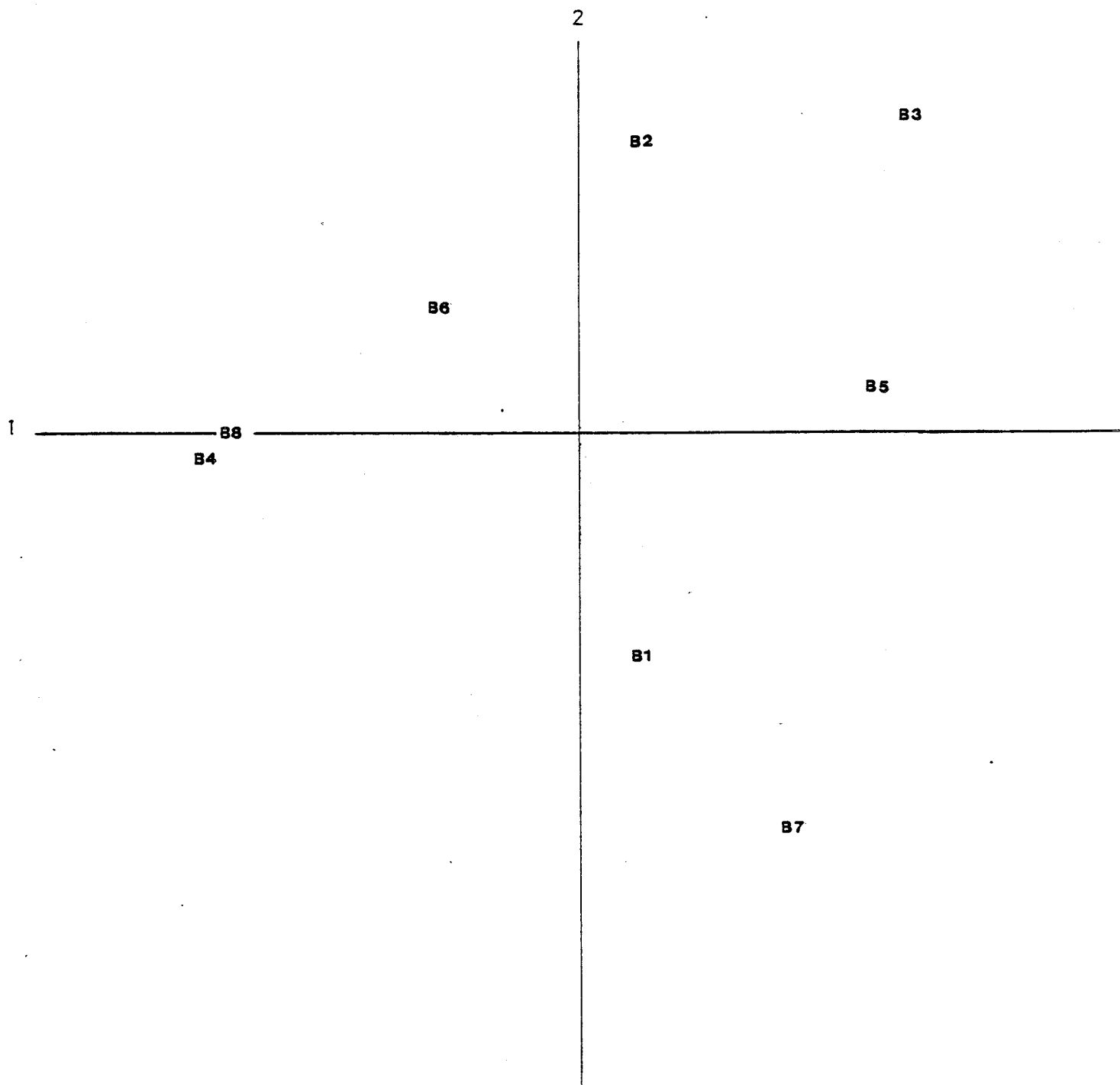


Figure 1 : Analyse factorielle des correspondances:
 Coordonnées des souches d'*Hordeum bulbosum*, sur le plan
 des facteurs 1 et 2.

Sur le tableau VII, tous les *Hordeum bulbosum* n'entrent pas en ligne de compte dans l'interprétation ; ne sont gardés que ceux qui sont assez bien représentés sur les axes choisis ($QLT > 500$) et dont la masse statistique est suffisamment élevée ($POID > 100$). INR correspond à la contribution du point dans l'inertie totale du nuage, sa valeur est également faible pour B2 qui sera éliminé de l'interprétation.

Ensuite, chaque groupe de 3 colonnes correspond aux axes factoriels 1 à 4. Les colonnes 1F, 2F, 3F, 4F, donnent les coordonnées des points sur les axes factoriels correspondants. COR indique la qualité de représentation du point sur l'axe factoriel et CTR, la contribution du point à l'inertie de cet axe.

La figure 1 donne les coordonnées des souches d'*Hordeum bulbosum*, sur le plan des facteurs 1 et 2.

Sur l'axe factoriel 1, on remarque que B4 et B8 sont proches et opposés à B3 et B5 ; B4, B5 et B8 étant bien représentés sur cet axe, et B3 un peu moins.

Sur l'axe factoriel 2, B7 est opposé à B3 ; ces deux points étant bien représentés sur cet axe.

B1 semble opposé à tous les autres B sauf à B6 sur l'axe factoriel 3, mais seul B1 est bien représenté et à un degré moindre B6.

L'axe factoriel 4 montre peu d'oppositions nettes, les qualités de représentation sont toutes moyennes.

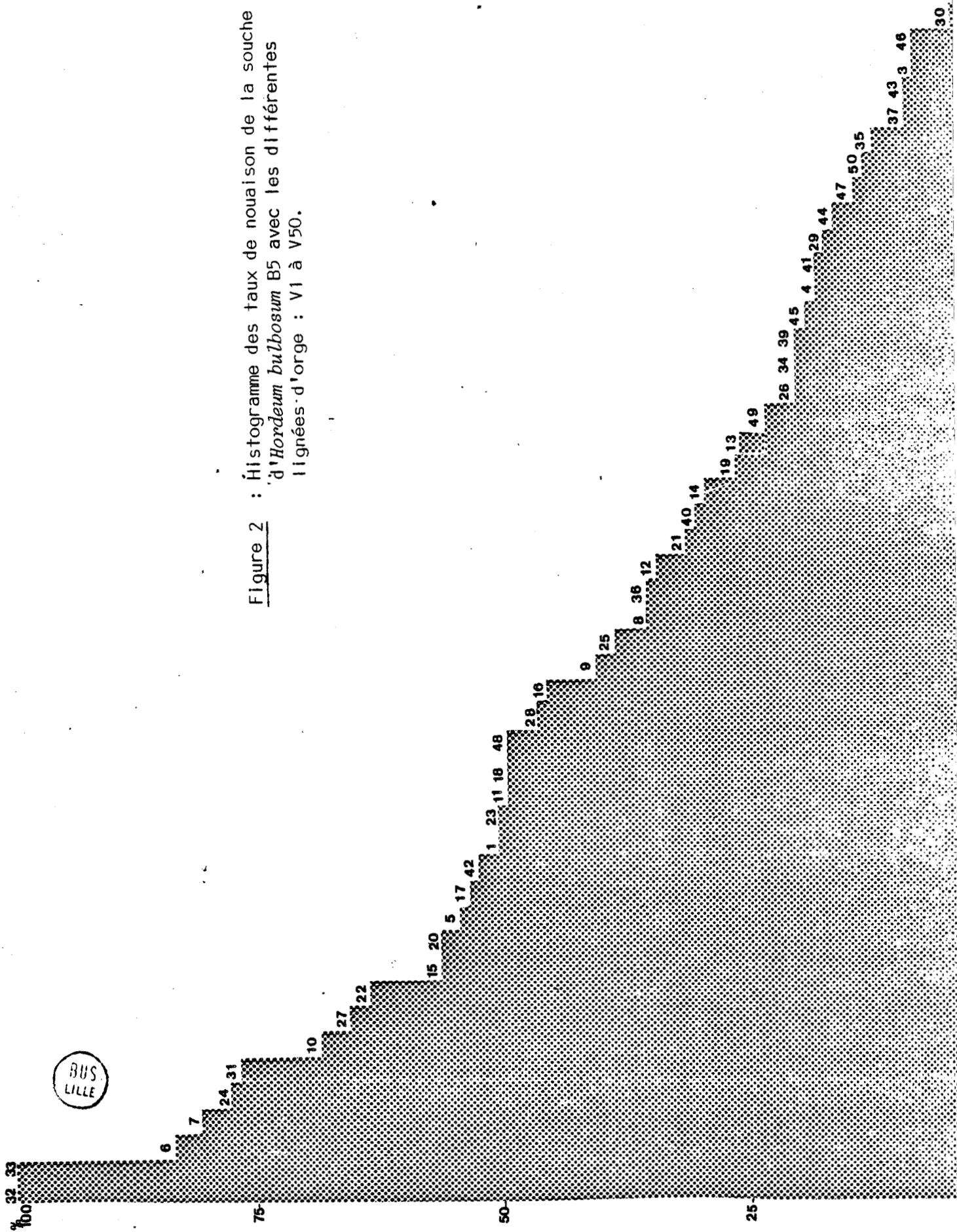
Pour retenir les souches intéressantes, nous suivons les deux principes suivants :

- des souches opposées sont complémentaires,
- parmi les souches opposées, nous retenons que celles ayant un bon rendement, c'est le cas des souches B5, B7 et B1 ou B6.

Cependant, l'analyse factorielle ne montre pas de structures fortes comme l'avait déjà indiqué l'analyse des valeurs propres. Pour confirmer ce premier choix, nous appliquons la méthode graphique qui nous avait été conseillée par Monsieur DOUAIRE.

BUS
LILLE

Figure 2 : Histogramme des taux de nouaison de la souche
d'*Hordeum bulbosum* B5 avec les différentes
lignées d'orge : V1 à V50.



c) la méthode graphique

Comme nous l'avons montré au chapitre III.2., la souche B5 a donné, en moyenne, les meilleurs résultats en croisement avec les orges. Nous avons tracé, pour cette souche, l'histogramme des taux de nouaison en fonction des différentes lignées d'orge de sorte que ces taux, indiqués en pourcentage, soient dans un ordre décroissant (figure 2). Ensuite, tout en gardant le même classement des lignées d'orge établies pour la souche B5, nous avons tracé tous les histogrammes correspondants aux autres souches. Un exemple est donné sur la figure 3, pour B2, et figure 4 pour B6.

En superposant un à un tous les histogrammes ainsi tracés sur celui de référence, nous avons constaté qu'il existait certaines complémentarités, le but étant de couvrir le maximum de surface non occupée par B5. Nous montrons que les meilleures complémentarités sont obtenues en superposant B1 + B6 + B7 à B5. Ce qui voudrait indiquer, qu'en mélangeant le pollen de ces quatre souches, on puisse augmenter de manière significative les faibles taux de nouaison obtenus entre B5 et certaines lignées d'orge comme le montre la figure 5. L'addition de la souche B2 n'apporte rien et les autres, B3, B4 et B8, qu'un ou deux pics sporadiques. L'importance de la souche B1 confirme d'ailleurs un des résultats de l'analyse factorielle des correspondances dans la mesure où elle semble se détacher des autres.

La méthode graphique permet ainsi de visualiser la contribution de chaque souche en complément de B5. Elle confirme ainsi le choix des souches d'*Hordeum bulbosum*, fait à la suite de l'analyse multidimensionnelle. Nous aboutissons donc à une nouvelle hypothèse de travail : le mélange de pollen provenant des souches B1, B5, B6 et B7 donnerait le meilleur rendement en plantes haploïdes indépendamment du facteur *Hordeum vulgare*.

Selon PICKERING (comm. pers. , 1982), il y a cependant un risque à utiliser un mélange de pollen. En effet, cet auteur, insiste sur l'aptitude de certaines souches d'*Hordeum bulbosum* à donner en grande proportion

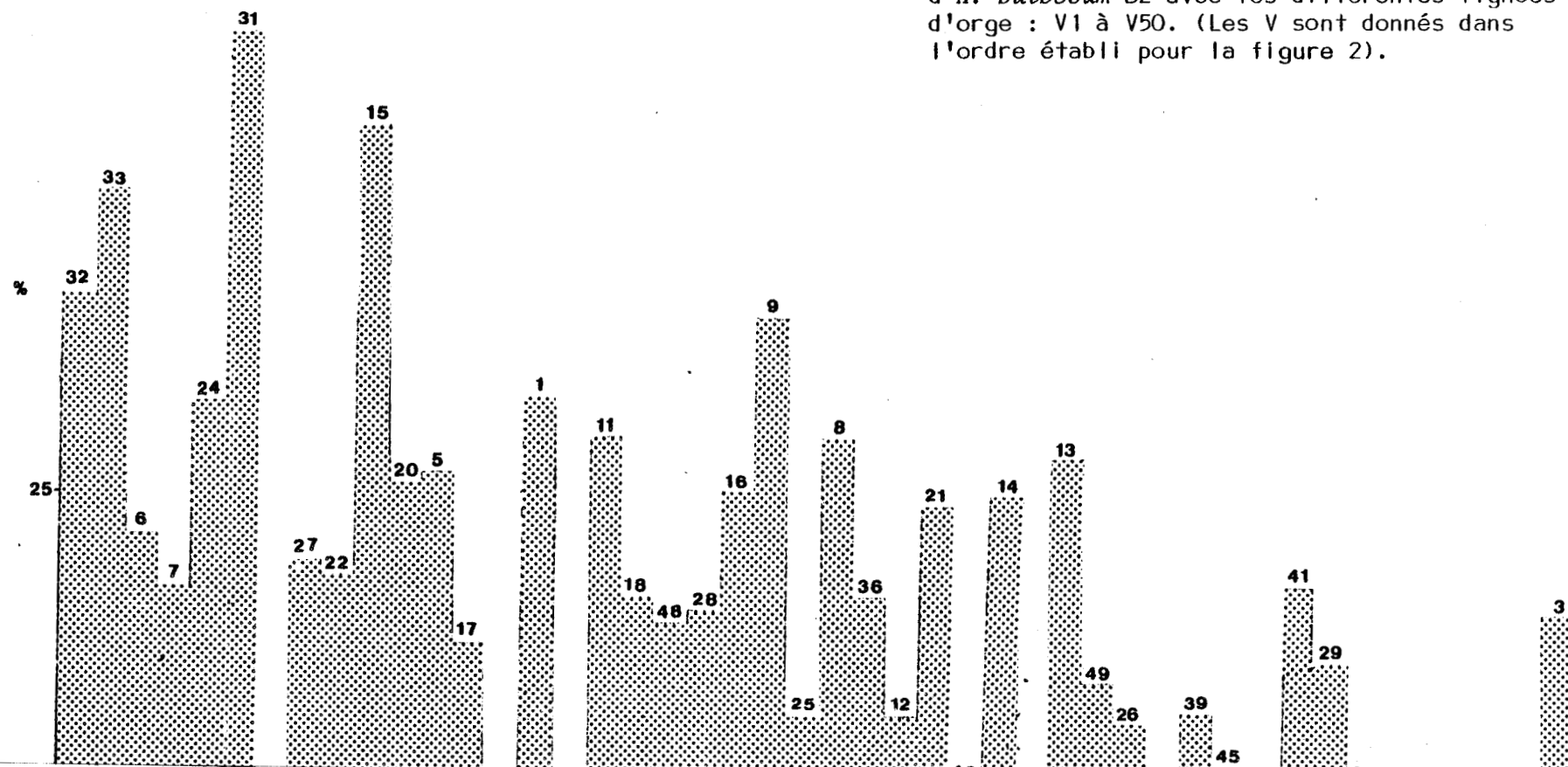


Figure 3 : Histogramme des taux de nouaison de la souche d'*H. bulbosum* B2 avec les différentes lignées d'orge : V1 à V50. (Les V sont donnés dans l'ordre établi pour la figure 2).

3777
508
808

Figure 4 Histogramme des taux de nouaison de la souche d'*H. bulbosum* B6 avec les différentes lignées d'orge : V1 à V50. (Les V sont donnés dans l'ordre établi pour la figure 2).

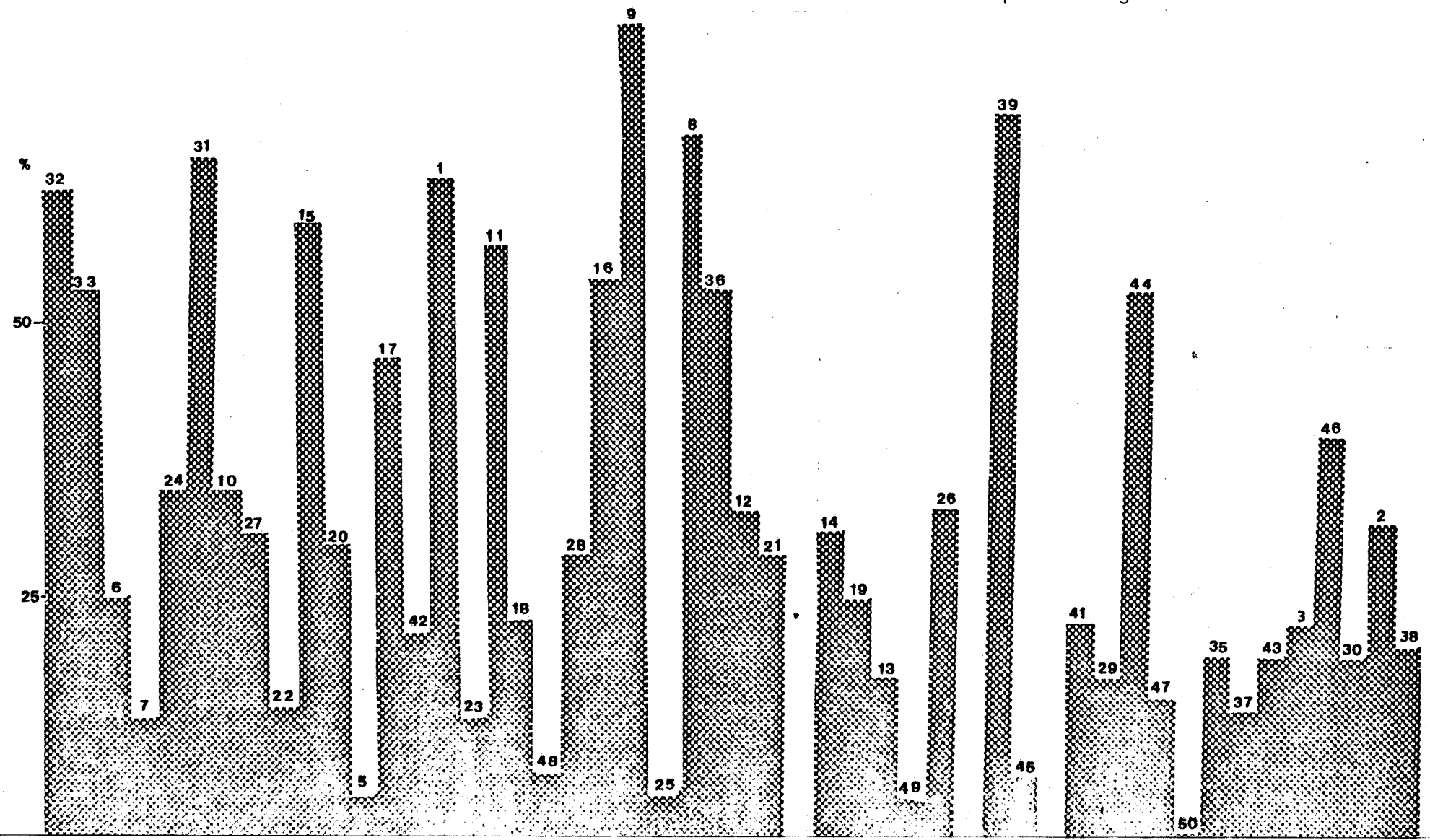
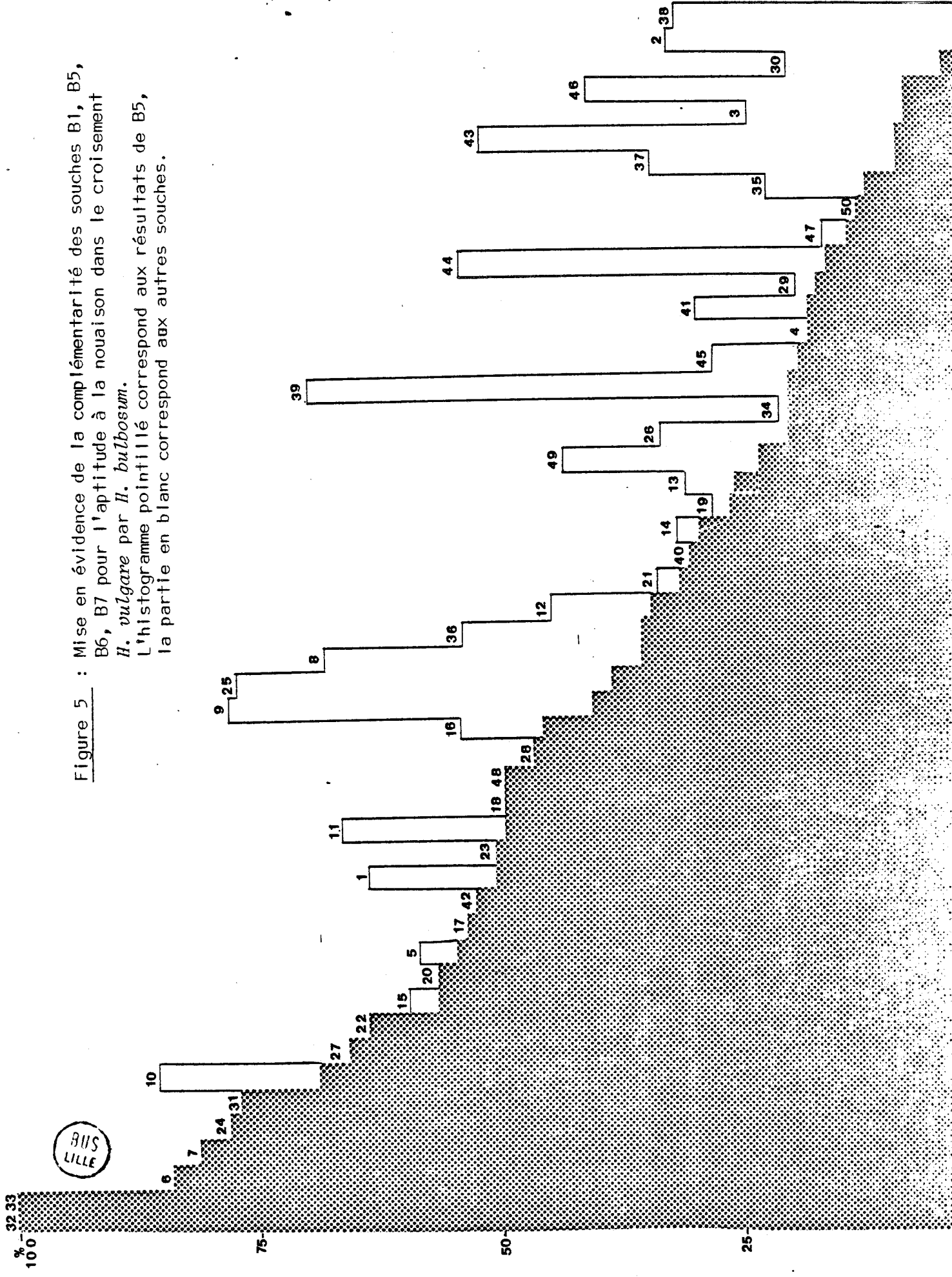




Figure 5 : Mise en évidence de la complémentarité des souches B1, B5, B6, B7 pour l'aptitude à la nouaison dans le croisement *H. vulgare* par *H. bulbosum*. L'histogramme pointillé correspond aux résultats de B5, la partie en blanc correspond aux autres souches.



des embryons globulaires. Si en plus ces souches présentent une croissance du tube pollinique plus rapide que les autres, le mélange ne serait plus valable. Nous avons heureusement évité ce risque dans notre analyse, puisque nous avons testé les souches d'*Hordeum bulbosum*, pour leur aptitude à donner des embryons différenciés et que leur taux est très voisin : 37,20%, 39,02% ; 36,99% et 40,59%.

Toutefois, la théorie étant quelquefois bien loin des réalités, surtout en biologie, nous avons voulu vérifier empiriquement le bien fondé de l'utilisation d'un mélange de pollen dans ce programme d'haploïdisation et c'est la raison pour laquelle, une troisième saison d'essais a été entamée.

III. RENDEMENT DE LA COMBINAISON POLLINIQUE D'*HORDEUM BULBOSUM*

III.1. Présentation de la méthode expérimentale

Les quatre souches d'*Hordeum bulbosum* précédemment retenues, en l'occurrence B1, B5, B6 et B7, ont fourni la combinaison pollinique que nous avons utilisée en croisement avec les lignées d'orge. Ces lignées d'orge sont, comme nous l'avons signalé dans le chapitre II, essentiellement constituées de la descendance en F3 d'un croisement entre orges d'hiver à 6 rangs. Elles ont été notées de V'1 à V'35. En plus, nous avons ajouté quelques plantes d'orge 6 rangs d'hiver provenant de graines préalablement traitées avec une substance mutagène ainsi que quelques plantes issues d'un back-cross 1 (2 rangs x 6 rangs) x 6 rangs d'hiver, et 7 F1 2 rangs de printemps.

Dans un premier temps, nous allons montrer le rendement de la combinaison pollinique d'*Hordeum bulbosum* choisie, par rapport :

- aux résultats globaux obtenus en 1981 avec les huit souches d'*H. bulbosum*, qui constituaient notre matériel de départ.

- aux résultats globaux obtenus en 1981 avec la seule souche, nous ayant donné les meilleurs résultats, c'est à dire B5. Ceci permettra de voir, si les autres souches d'*Hordeum bulbosum* utilisées en mélange avec B5, apportent une amélioration dans l'haploïdisation.



Source de pollen	Nombre de fleurs nouées (1)	Nombre de fleurs non nouées (2)	Taux (3)	Nombre embryons différenciés (4)	Nombre embryons non différenciés (5)	Taux (6)	Nombre de plantes haploïdes produites (7)	Nombre embryons sans développement (8)	Taux (9)	Nombre de plantes haploïdes produites (10)	Nombre de fleurs pollinisées moins Nombre plantes haploïdes (11)	Taux (12)
1) 8 souches d' <i>Hordeum bulbosum</i>	3636	9952	26,76%	1280	2356	35,20%	399	881	31,17%	399	13 189	2,94%
2) combinaison pollinique d' <i>Hordeum bulbosum</i>	8406	6449	56,59%	2235	6171	26,59%	870	1365	38,93%	870	13 985	5,86%
	G = 2639,79 ^{xxx}			G = 89,39 ^{xxx}			G = 21,43 ^{xxx}			G = 145,93 ^{xxx}		

xxx : Signification à 0,001

Tableau VIII : Résultats comparés du mode de pollinisation dans le croisement *H. vulgare* x *H. bulbosum* :

- 1) pollinisation séparée par souches d'*H. bulbosum*
- 2) pollinisation avec pollen mélangé de 4 souches d'*H. bulbosum*.

Test G.

Dans un deuxième temps, nous analyserons trois facteurs du milieu ; les deux premiers seront réalisés sur notre matériel principal, en l'occurrence les 35 lignées d'orge (V'1 à V'35), le troisième sur le matériel *H. vulgare*, de 1981 à 1982, ce sont :

- l'effet saison sur la réussite de la méthode,
- l'effet de la méthode de castration : en coupant les glumelles à l'aide de fins ciseaux ou en réalisant une très fine incision dans la glumelle, pour enlever, dans les deux cas, les anthères.
- Enfin, nous avons testé deux milieux de culture pour l'obtention des plantes in vitro suite à la culture des embryons : le milieu GAMBORG B5 modifié par l'addition de 7g/litre de Bacto-Agar et sans 2,4-D, et le milieu Orchid Agar.

III.2. Comparaison mélange pollinique/pollen entre souches

a) par rapport aux résultats globaux obtenus avec les 8 souches d'*Hordeum bulbosum*

Les résultats comparatifs sont portés dans le tableau VIII, qui se présente de la même manière que les deux tableaux IV et V, précédemment étudiés. Le tableau VIII montre une nette augmentation du taux de nouaison suite à l'utilisation de la combinaison pollinique choisie, puisque celui-ci passe de 26,76% à 56,59%, soit plus du double. La valeur de G correspondante est ainsi très significative ($G=2639,79$). Inversement, au niveau des taux d'embryons différenciés, le pourcentage moyen diminue, (26,59% au lieu de 35,20%). Nous avons expliqué au paragraphe 1.2. de ce même chapitre, la raison de cette baisse qui trouve une explication dans le fait que nous avons acquis une plus grande expérience pour définir un embryon comme différencié, ce qui nous a permis de réaliser une sélection plus sévère des embryons pour les cultiver sur le milieu gélosé. La valeur de G, pour ce caractère, est significative ($G = 89,39$).

Par voie de conséquence, le taux de plantes haploïdes obtenues par rapport aux embryons cultivés, augmente, puisqu'il passe de 31,17% à 38,93%. La valeur de G correspondante est significative ($G=21,43$). Lorsque l'on rapporte, le taux de plantes haploïdes obtenues par rapport au nombre de fleurs pollinisées (indiqué dans la dernière colonne du tableau VIII), on remarque que nos résultats ont presque été doublés,



Source de pollen	Nombre de fleurs nouées (1)	Nombre de fleurs non nouées (2)	Taux (3)	Nombre embryons différenciés (4)	Nombre embryons non différenciés (5)	Taux (6)	Nombre de plantes haploïdes produites (7)	Nombre de plantes haploïdes produites (8)	Taux (9)	Nombre de fleurs pollinisées moins Nombre plantes haploïdes (11)	Taux (12)
1) <i>H. bulbosum</i> B5	692	1266	35,34%	270	422	39,02%	104	166	38,52%	1854	5,31%
2) Combinaison pollinique	8406	6449	56,59%	2235	6171	26,59%	870	1365	38,93%	13985	5,86%
		G = 315,46 ^{***}		G = 46,44 ^{***}			G = 0,02 N.S.			G = 0,96 N.S.	

*** : Signification à 0,001

N.S. : Non significatif

Tableau IX : Rendement de la combinaison pollinique d'*H. bulbosum* choisie par rapport à celui obtenu avec la souche B5 dans l'haploïdisation de l'orge.

1) pollinisation par la meilleure souche d'*H. bulbosum*

2) pollinisation mélangée d'*H. bulbosum*

Test G.

puisque ce pourcentage passe de 2,94% à 5,86%. La valeur de G est bien entendu significative (G=145,93). Une fois de plus, nous remarquons que les différences sont beaucoup plus fortes au niveau des taux de nouaison.

Nous avons tenu compte de la variabilité entre les lignées d'orge, en appliquant le test t décrit par FRONTIER (1981), sur le caractère taux de nouaison. Nous nous sommes reportés au tableau III, pour les résultats globaux obtenus avec les 8 souches d'*Hordeum bulbosum*, et au tableau réalisé de la même manière que ce tableau III, pour les lignées V'1 à V'35. Nous obtenons les résultats suivants :

Taux de nouaison moyen, obtenu :

- avec la combinaison pollinique : $\bar{x}_1 = 59,47\% \pm 23,25\%$

- avec le pollen de 8 souches d'*H. bulbosum* : $\bar{x}_2 = 28,34\% \pm 23,10\%$

$$\bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 31,13\%$$

$$S_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2} = 1,866$$

$$t = 16,68^{***}$$

La valeur de t montre que cette différence est significative et confirme bien les résultats du test G, que nous venons de faire sur le caractère taux de nouaison.

En conclusion, nous pouvons donc dire que nos résultats ont été globalement améliorés par l'utilisation uniquement de souches d'*Hordeum bulbosum* à bon rendement d'haploïdes et ceci permet de confirmer les observations faites dans le paragraphe II de ce même chapitre.

Nous avons voulu développer notre analyse en comparant le rendement de la combinaison pollinique retenue par rapport aux résultats obtenus avec la meilleure souche d'*H. bulbosum*, en l'occurrence B5.

b) par rapport aux résultats globaux obtenus avec la souche B5

Les résultats comparatifs sont présentés dans le tableau IX. Pour les deux premiers caractères, à savoir, le taux de nouaison et le taux d'embryons différenciés, les tendances sont les mêmes que précédemment,

Source de pollen	Nombre de plantes haploïdes produites	Nombre de fleurs pollinisées moins Nombre de plantes haploïdes produites	Taux
<i>H. bulbosum</i> B5	8	365	2,14%
Combinaison pollinique	870	13 985	5,86%
		G = 11,94 ^{xxx}	

xxx : signification à 0,001

Tableau X : Rendement de la combinaison pollinique d'*Hordeum bulbosum*, par rapport à celui obtenu avec la souche B5, en croisement avec les orges à 6 rangs.
Test G.



(tableau VIII) : le taux de nouaison augmente en utilisant la combinaison pollinique, celui-ci passe de 35,34% à 56,59%, et, inversement le taux d'embryons différenciés diminue de 39,02% à 26,59%. Dans les deux cas, les valeurs de G sont significatives (315,46 et 46,44). Par contre, pour les deux derniers caractères : le taux de plantes haploïdes obtenues par rapport au nombre d'embryons différenciés et par rapport au nombre de fleurs pollinisées, les différences ne sont pas significatives. L'augmentation du taux de nouaison, caractère sur lequel nous avons basé notre recherche de souches d'*Hordeum bulbosum*, est annihilée par le plus faible taux d'embryons différenciés, puisque le taux de plantes haploïdes produites par rapport au nombre d'embryons mis en culture reste à peu près le même (38,52% avec la souche B5 et 38,93% avec la combinaison pollinique).

Globalement, nous pouvons dire, que dans ces conditions, la combinaison pollinique n'apporte pas une amélioration significative par rapport à la seule souche B5, mais avant d'établir une conclusion, nous voudrions rappeler un fait très important : En effet, le plan de sélection en cours, nous imposait de prendre comme lignées d'*H. vulgare*, des orges d'hiver à 6 rangs et comme nous l'avons rappelé dans le paragraphe III.1 de ce même chapitre, les orges d'hiver sur lesquelles nous avons testé les souches d'*H. bulbosum* individuellement, étaient essentiellement à 2 rangs. Nous avons montré (tableau V) les différences entre orges à 2 rangs et orges à 6 rangs, pour l'aptitude à donner des haploïdes et cette différence était significative ($G = 12,28^{***}$). Nous nous proposons donc de comparer les résultats obtenus avec la combinaison pollinique, à ceux obtenus avec la souche B5 en croisement uniquement avec les orges à 6 rangs, et ceci sur le caractère : taux de plantes haploïdes obtenues par rapport au nombre de fleurs pollinisées (tableau X). Dans ce cas, nous remarquons que nos résultats sont plus que doublés car nous passons de 2,14% à 5,86%, par l'utilisation de ce mélange de pollen d'*H. bulbosum* en croisement avec les orges à 6 rangs d'hiver. La valeur de G correspondante est significative, (11,94). L'amélioration du résultat provient donc de l'intervention du pollen autre que celui de la souche B5.

c) Conclusion sur l'utilisation de la combinaison pollinique

De l'ensemble des études réalisées jusque maintenant, nous pouvons conclure qu'il existe une variabilité entre souches d'*H. bulbosum* pour leur aptitude à induire des haploïdes d'orge. L'amélioration globale de nos résultats est passée par la recherche de meilleures souches

d'*Hordeum bulbosum*, et par une plus grande pratique de cette technique.

Parmi les différentes souches qui constituent notre combinaison pollinique, une d'entre elles, la souche B5, est nettement supérieure aux autres.

Toutefois, du fait que notre matériel *H. vulgare* ait été changé d'une année

sur l'autre, puisque nous sommes passé d'orges d'hiver à 2 rangs essentiel-

lement, à des orges d'hiver à 6 rangs, nous pouvons prouver la contribution

des autres souches B1, B6 et B7 en complément de la souche B5 dans notre

mélange pollinique. Ce fait peut être mis en évidence lorsque l'on ne consi-

dère que les quelques orges à 6 rangs du tableau III pour lesquelles nous

montrons que pour chacune d'entre elles, correspond au moins une bonne

valeur du taux de nouaison en croisement avec l'une des quatre souches

d'*H. bulbosum* retenues.

En comparant les résultats obtenus en 1981, avec la seule

souche B5 sur les quelques lignées d'orge à 6 rangs, avec ceux de 1982

constitués presque uniquement d'orges à 6 rangs, nous montrons par un

test G, le net intérêt de l'utilisation de ce mélange de pollen.

Nous pensons qu'il serait nécessaire de vérifier notre

conclusion sur le matériel de 1983, en limitant les effets liés au change-

ment du caractère génétique des orges et les effets liés à l'environnement.

Pour ce faire, nous pensons polliniser à la même époque, un demi épi avec

le pollen de la souche B5 et l'autre demi épi avec notre combinaison pollin-

inique. Les résultats sur plusieurs répétitions nous donnerons des infor-

mations intéressantes.

Nous donnons maintenant le compte rendu de nos études

faites sur les facteurs du milieu dans l'amélioration de la technique.

IV. ETUDE DES FACTEURS DU MILIEU

Dans le but d'améliorer la technique de production d'haploïdes doublés d'orge par la méthode bulbosum, nous avons étudié trois facteurs du milieu :

- les deux premiers ont été étudiés sur les lignées V'1 à V'35 pendant les trois mois suivants : Mars, Avril, Mai, pour l'effet saison. Pendant cette période, nous avons réalisé deux types de castration simultanément sur chaque épi : pour les épillets situés sur un côté d'épi, nous avons ôté les anthères par une incision réalisée dans la glumelle inférieure, méthode que nous avons appelée "pince", pour les épillets situés de l'autre côté de l'épi, nous avons d'abord coupé les glumelles au 1/3 supérieur, puis enlevé les anthères avec une pince ; nous avons appelé cette dernière méthode : "ciseau" . Pour chaque épi, nous avons noté le nombre de fleurs castrées par l'une et l'autre méthode, puis le nombre de caryopses formés correspondants. Pour des raisons pratiques, les opérations ultérieures ne sont plus séparées. La pollinisation a été réalisée dans tous les cas, avec la combinaison pollinique précédemment décrite.

- le troisième facteur que nous étudierons, sera la composition du milieu de culture pour l'obtention des plantes in vitro.

IV.1: Effet saison et méthode de castration sur le taux de nouaison

a) Présentation des résultats

L'ensemble des résultats est porté dans le tableau XI. Il s'agit d'un tableau à trois entrées puisqu'à chaque lignée d'orge, correspond en fonction des deux facteurs du milieu étudiés: saison et méthode de castration, les résultats obtenus pour chaque épi (répétition).

Pour des raisons matérielles, le nombre de répétitions n'est pas identique dans chaque case. Nous avons supprimé les lignées V'9, V'19 et V'28 pour lesquelles nous n'avons pas au moins, une répétition.

Tableau XI : Taux de nouaison du croisement *Hordeum vulgare* x *H. bulbosum* (pollinisation mélangée) en fonction des facteurs du milieu : saison et opération de castration.

LIGNEES D' ORGE	FACTEUR SAISON											
	MARS				AVRIL				MAI			
	FACTEUR OPERATION						CASTRATION					
	Ciseau		Pince		Ciseau		Pince		Ciseau		Pince	
	Rapport	%	Rap.	%	Rap.	%	Rap.	%	Rap.	%	Rap.	%
V'11	9/10	90	9/10	90	8/8	100	6/7	86	8/9	89	9/10	90
	8/9	89	8/8	100	5/6	83	6/7	86	3/7	43	3/7	43
					10/11	91	10/11	91				
					5/8	63	7/8	88				
					6/7	86	7/7	100				
					5/10	50	7/10	70				
V'12	3/5	60	4/5	80	5/6	83	5/5	100	4/7	57	4/7	57
	5/6	83	5/6	83	6/7	86	5/5	100	5/6	83	6/6	100
	3/8	38	5/9	56					10/12	83	9/12	75
	5/7	71	5/8	63					6/7	86	3/6	50
	7/9	78	7/8	88					5/6	83	4/6	67
	0/8	0	2/8	25								
V'13	4/5	80	4/5	80	5/8	63	5/8	63	4/7	57	5/6	83
	5/7	71	5/6	83	6/10	60	6/10	60	3/8	38	3/8	38
	3/6	50	4/5	80					8/8	100	5/8	63
V'14	2/8	25	1/7	14	5/6	83	7/7	100	5/7	71	6/7	86
	4/6	67	4/6	67	4/6	67	4/5	80	7/7	100	6/7	86
	2/7	29	2/6	33	1/7	14	5/7	71	6/6	100	5/6	83
	3/6	50	3/6	50					5/5	100	3/5	60
V'15	8/6	100	5/7	71	5/6	83	6/7	86	2/7	29	5/7	71
	2/6	33	5/7	71	6/6	100	5/6	83	1/5	20	3/5	60
					2/6	33	3/6	50				
					0/6	0	1/6	17				
V'16	0/7	0	2/6	33	0/5	0	3/6	50	4/5	80	5/5	100
	0/8	0	3/9	33	0/6	0	1/6	17	1/5	20	1/4	25
					2/6	33	2/5	40				
					5/6	83	5/6	83				
					7/7	100	7/7	100				
					6/7	86	6/7	86				



.../...

V'7	4/7 6/7 6/6	57 86 100	3/7 7/7 6/6	43 100 100	5/7 7/8 6/6 3/6	71 88 100 50	5/8 6/9 7/7 3/6	63 67 100 50	4/9 6/7 6/7 8/9 8/8 6/9	49 86 86 89 100 67	5/8 5/7 6/7 8/9 6/8 7/8	6 7 8 9 10 11
V'8	4/8 3/6	50 50	3/6 3/6	50 50	6/9 5/7	67 71	8/10 7/8	80 88	6/6 2/5	100 40	5/6 2/5	8 9
V'10	3/8 6/7 2/6 5/8	38 86 33 63	2/7 5/7 3/7 5/7	29 71 43 71	4/9 6/8 4/10	44 75 40	4/9 6/9 5/9	44 67 56	3/6 6/7 5/5	50 86 100	4/6 7/7 6/6	6 7 8 9
V'11	4/8 6/7 3/8	50 86 38	7/8 6/6 3/8	88 100 38	8/8 1/7 3/7 4/6 6/7 3/7	100 14 43 67 86 43	8/8 2/7 3/7 5/5 6/7 3/8	100 29 57 100 86 38	4/7 7/9 4/9 6/8	57 78 44 75	4/7 6/8 7/8 7/8	5 6 7 8
V'12	5/7 7/9 7/9 7/9	71 78 78 78	6/7 6/9 6/9 7/9	86 67 67 78	2/7 4/11	29 36	5/6 8/10	83 80	8/10 8/8 5/5 11/11 7/9 6/7 4/5	80 100 100 100 78 86 80	11/11 7/7 5/6 9/11 8/8 7/7 5/5	10 11 12 13 14 15 16
V'13	6/6 4/10 0/10	100 40 0	6/7 6/10 2/11	36 60 18	9/9 10/10 9/12 6/7	100 100 75 86	9/9 9/10 9/12 5/6	100 90 75 83	7/9 7/8 8/9 7/7 6/8 4/6	78 88 89 100 75 67	8/9 8/8 6/8 6/7 6/7 5/6	8 9 10 11 12 13
V'14	5/7 4/5 3/9 6/7	71 80 33 86	7/7 3/4 5/8 4/7	100 75 63 57	8/10 4/8 2/7 1/10 8/8 2/8 5/7	80 50 29 10 100 25 71	9/10 3/8 3/8 3/10 7/7 2/8 5/7	90 38 38 30 100 25 71	6/7 5/8 4/7 7/7 7/10 7/8 5/9	86 63 57 100 70 88 56	6/7 5/8 2/7 6/6 9/10 5/7 5/9	8 9 10 11 12 13 14
V'15	4/10 6/9	40 67	5/10 5/9	50 56	6/8 3/5 7/9 5/5 6/7	75 60 78 100 86	7/8 4/5 9/9 6/6 4/7	88 80 100 100 57	3/5 3/5 6/10 5/10	60 60 60 50	4/5 3/5 6/9 7/10	8 9 10 11
V'16	5/8 5/5 4/7	63 100 57	5/9 5/6 5/7	55 83 71	6/8 4/7 6/6 6/9	75 57 100 67	8/8 6/7 6/6 6/9	100 86 100 67	7/9 3/7 4/9	78 43 44	7/9 6/7 4/8	7 8 9

.../...

.../...

V'17	3/6 6/7	50 86	3/7 3/7	43 43	5/7 7/10	71 70	6/6 7/7	100 100	7/8 5/8 6/6 3/7 3/5	88 63 100 43 60	8/8 7/8 4/6 7/7 2/3	100 88 67 100 67
V'18	6/7 1/7	86 14	6/7 3/8	86 38	4/5 9/11	80 82	4/5 9/11	80 82	4/6 4/8	67 50	4/5 7/8	80 88
V'20	4/5 1/9 7/8	80 11 88	3/4 2/9 8/9	75 22 89	6/8 2/11	35 18	6/8 2/10	75 20	3/3 5/6	100 83	5/5 6/6	100 100
V'21	6/10 5/6	60 83	6/10 5/6	60 83	5/10 9/10	50 90	4/10 9/10	40 90	5/7 4/7	71 57	6/7 6/7	86 86
V'22	3/6 3/7	50 43	4/6 2/7	67 29	4/10 4/10	40 40	9/10 4/9	90 44	6/7 5/8	86 68	7/7 7/7	100 100
V'23	4/9 3/7 5/10 6/9	44 43 50 67	6/9 3/7 7/10 7/9	67 43 70 78	6/6 6/7 8/8 0/9 8/9	100 86 100 0 89	7/7 5/7 8/8 4/10 8/9	100 71 100 40 89	6/7 6/7 5/6	86 86 83	5/7 5/6 5/6	71 83 83
V'24	5/7 5/7 7/7	71 71 100	5/6 6/7 5/7	83 86 71	4/8 4/6 4/9	50 67 44	4/7 4/6 5/10	57 67 50	1/9 6/8 3/6 7/8 7/7 4/9	11 75 50 88 100 44	1/9 6/8 4/6 6/7 6/6 6/9	11 75 67 86 100 67
V'25	5/10 1/6 5/5	50 17 100	5/9 2/6 6/6	56 33 100	6/6 5/5	100 100	5/7 7/10	71 70	2/9 4/10 7/8	22 40 88	4/8 5/10 6/7	50 50 86
V'26	2/5 2/5	40 40	2/7 2/5	29 40	4/9 2/5	44 40	5/9 2/5	56 40	3/6 3/5 3/6	50 60 50	5/6 3/5 3/6	83 60 50
V'27	3/8 5/6	38 83	4/6 5/6	67 83	2/8 3/8 6/8	25 38 75	3/8 1/8 6/7	38 13 86	6/7 7/7 5/6 3/5	86 100 83 60	6/7 6/7 4/5 4/5	86 86 80 80
V'29	0/6 3/6	0 50	1/6 3/7	17 43	1/6 5/6 5/6 6/7	17 83 83 86	2/6 5/6 5/6 7/7	33 83 83 100	6/7 2/6 5/6	86 33 83	4/6 5/6 5/5	67 83 100



.../...

.../...

V'30	6/8	75	5/9	56	4/6	67	4/6	67	9/10	90	9/10	90
	5/5	100	6/6	100	6/9	67	6/9	67	6/8	75	6/8	75
	1/6	17	4/7	57	4/8	50	7/8	88	5/7	71	5/7	71
					6/7	90	9/9	100				
					9/11	83	9/12	70				
V'31	3/6	50	4/5	80	6/7	86	7/7	100	6/6	100	5/5	100
	3/6	50	5/5	100	4/7	57	5/6	83	4/6	67	6/6	100
	6/7	86	6/8	75	6/7	86	4/6	67				
	4/7	57	5/6	83	4/7	57	2/7	29				
	5/6	83	4/6	67	4/7	57	4/7	57				
					5/6	83	6/7	86				
					6/8	75	7/8	88				
					4/6	67	4/7	57				
					7/7	100	7/7	100				
	V'32	1/4	25	3/4	75	4/9	44	4/10	40	6/6	100	5/6
5/6		83	6/7	86	7/7	100	7/7	100	7/7	100	5/6	83
5/6		83	4/5	80	3/10	30	6/10	60				
0/7		0	2/8	25	4/8	50	5/8	63				
8/10		80	7/10	70								
6/8		75	7/7	100								
V'33	1/7	14	3/7	43	3/6	50	4/5	80	4/6	67	6/6	100
	7/7	100	6/8	75	4/9	44	5/9	56	6/8	75	4/7	57
	1/7	14	2/7	29	4/9	44	6/9	67				
	6/8	75	6/9	67								
V'34	4/8	50	3/9	33	4/7	57	4/7	57	5/7	71	6/6	100
	4/5	80	4/5	80	7/8	88	8/9	89	3/6	50	5/6	83
	4/7	57	5/8	63	7/9	78	7/8	88				
V'35	6/8	75	6/8	75	6/10	60	6/10	60	8/9	89	8/8	100
	5/9	56	5/9	56	6/11	55	8/11	73	9/13	69	9/13	69
	4/8	50	2/8	25					6/7	86	6/7	86
	1/11	9	1/10	10								

Remarque : Les lignées V'9 ; V'19 ; V'28 ; ont été éliminées car nous n'avions pas suffisamment de résultats.

Les valeurs portées sont données de deux manières : sous la forme d'un rapport indiquant le nombre de caryopses obtenus divisé par le nombre de fleurs pollinisées et sous la forme d'un pourcentage qui indique le taux de nouaison. Pour l'analyse de ces données, nous avons utilisé une analyse de variance à trois facteurs avec pondération. Cette pondération est nécessaire dans la mesure où les effectifs de chaque case varient plus que d'un facteur 2 à 1. Ce travail a été réalisé au département de Mathématiques appliquées de l'E.N.S.A. de Rennes, sous la direction de Monsieur MASSON.

b) Analyse de variance non orthogonale à
trois facteurs

Nous donnons dans le tableau XII, les moyennes ajustées, c'est à dire avec pondération des taux de nouaison pour les trois facteurs : le facteur lignée d'orge, le facteur mois, et le facteur opération de castration. Par exemple, pour le facteur lignée d'orge, la valeur indiquée pour chaque lignée correspond à la moyenne pondérée des taux de nouaison de toutes les répétitions réalisées quel que soit le mois et la méthode de castration. De même pour les facteurs mois ou opération, cette valeur correspond à la moyenne pondérée des taux de nouaison de toutes les répétitions, quelques que soient les lignées d'orge et l'opération de castration ou le mois. On remarque que les moyennes des taux de nouaison, dans le facteur lignée fluctuent entre 48,13% et 80,98%. Les taux de nouaison par mois sont de 60,35% pour le mois de mars, de 68,68% pour le mois d'avril et de 75,15% pour le mois de mai. On peut ainsi noter que plus on avance vers les mois d'été, plus les taux de nouaison augmentent.

Pour l'opération de castration, les taux de nouaison sont de 65,01% pour la méthode "ciseau" et de 71,96% pour la méthode "pince". La méthode de castration "pince", semble donc plus favorable.

Le taux de nouaison total moyen est de 68,24%.

a)

Lignées d'orge	Moyenne pondérée en %	Lignées d'orge	Moyenne pondérée en %
V'1	80,99 ± 12,16	V'18	69,19 ± 14,32
V'2	71,14 ± 15,81	V'20	67,83 ± 22,67
V'3	66,52 ± 7,82	V'21	71,27 ± 7,88
V'4	67,65 ± 26,12	V'22	62,52 ± 22,50
V'5	55,74 ± 16,21	V'23	75,52 ± 12,55
V'6	48,14 ± 23,74	V'24	64,41 ± 11,39
V'7	80,42 ± 2,01	V'25	64,52 ± 17,72
V'8	63,94 ± 12,96	V'26	48,14 ± 11,01
V'10	63,76 ± 15,69	V'27	65,13 ± 17,44
V'11	64,83 ± 7,90	V'29	61,79 ± 24,36
V'12	79,94 ± 22,14	V'30	74,53 ± 6,24
V'13	76,25 ± 18,88	V'31	77,11 ± 11,84
V'14	66,18 ± 11,23	V'32	70,49 ± 16,78
V'15	68,61 ± 13,79	V'33	61,62 ± 12,94
V'16	72,87 ± 10,64	V'34	70,89 ± 12,80
V'17	71,79 ± 18,93	V'35	60,78 ± 16,96

b)

Mois	Moyenne pondérée en %
Mars	60,35 ± 16,43
Avril	68,68 ± 15,66
Mai	75,15 ± 14,42

c)

Méthode de castration	Moyenne pondérée en %
Ciseaux	65,01 ± 16,81
Pince	71,96 ± 15,81

TABEAU XII : Moyennes pondérées des faux de nouaison

- a) par lignée d'orge (les deux opérations confondues par lignée)
- b) par mois (lignées et opérations de castration confondues)
- c) par opération de castration (lignées et mois confondus)

Une transformation angulaire en Arc sinus a été appliquée à ce tableau XII. Dans la transformation angulaire, les proportions proches de 1 ou de 0 se trouvent dispersées, ce qui a pour effet d'augmenter leur variance.

L'analyse de variance pondérée à 3 facteurs a porté sur les taux de nouaison et sur les valeurs transformées en Arc sinus : tableaux XIII et XIV, respectivement.

c) Interprétation des résultats

Les tableaux XIII et XIV montrent tout d'abord que les différences des taux de nouaison pour les trois facteurs sont significatives. Le facteur le plus important est le facteur mois. Comme nous l'avons vu, les taux de nouaison augmentent lorsque les croisements sont réalisés plus près des mois d'été. La culture des plantes en serre au mois de mars nécessite un apport lumineux et calorifique complémentaire alors qu'au mois de mai, les conditions naturelles sont suffisantes. Il paraît certain que ces conditions artificielles ne créent pas celles du mois de mai, par exemple.

Le deuxième facteur qui intervient ensuite est le facteur opération de castration : les meilleurs résultats sont obtenus avec la méthode "pince". Nous montrons donc que le fait de laisser les glumelles entières est plus favorable à la nouaison. Dans ces conditions, il semblerait qu'il se crée, au niveau de la fleur, un micro-climat propice à un meilleur fonctionnement des gamètes.

Le dernier facteur qui intervient est le facteur lignée. Celui-ci n'est significatif qu'au seuil de 0,005 et montre qu'il existe une variabilité entre lignées d'orge pour l'aptitude au croisement avec *Hordeum bulbosum*, mais que cette variabilité est relativement faible. Toutes les lignées d'orge présentent avec la combinaison pollinique, des taux de nouaison moyens d'au moins 48%, et ceci nous semble intéressant dans la mesure où il est possible de produire des haploïdes quelque soit le génotype



Origine de la variation	Somme des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	F
Opération mois (ajusté) lignée	0,68774	1	0,68774	19,01 ^{***}
	2,05314	2	1,0265	
	3,76693	31	0,1215	
Opération (ajusté) mois lignée	0,6824	1	0,6824	12,64 ^{***}
	2,0584	2	1,0292	
	3,7669	31	0,1215	
Opération mois lignée (ajusté)	0,64078	1	0,64078	2,19 ^{**} F ₃₀ [∞] = 1,79 (pour P=0,005)
	2,2034	2	1,10170	
	3,6636	31	0,11818	
Interaction résiduelle	7,5740	149	0,0508	0,94 N.S.
	22,854	423	0,0540	
TOTAL	36,935	606		

*** : significatif à 0,000

TABLEAU XIII : Analyse de variance pondérée à 3 facteurs : opération de castration, mois, lignée d'orge pour le caractère taux de nouaison (en %).

Origine de la variation	Somme des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	F
Opération	1,31503	1	1,31503	19,193 ^{***}
mois (ajusté)	3,82814	2	1,91407	
lignée	6,07721	31	0,19604	
Opération (ajusté)	1,30474	1	1,30474	13,083 ^{***}
mois	3,83843	2	1,91921	
lignée	6,07721	31	0,19604	
Opération	1,17772	1	1,17772	1,926 ^{**} F ₃₀ = 1,79 (pour P=0,005)
mois	4,08906	2	2,04453	
lignée (ajusté)	5,95360	31	0,19205	
Interaction	14,8710	149	0,09981	1,00 N.S.
résiduelle	42,1731	423	0,0997	
TOTAL	68,2545	606		

***:significatif à 0,000

TABLEAU XIV : Analyse de variance pondérée à 3 facteurs : opération de castration, mois, lignée d'orge pour le caractère taux de nouaison (Transformation Angulaire)

de l'orge. Nous avons insisté sur ce point dans le chapitre I, pour définir cette méthode comme étant applicable en sélection.

Aucune interaction entre facteurs n'est significative ; les moyennes sont donc une bonne estimation de l'effet des facteurs.

En comparant les valeurs des F correspondantes des deux tableaux XIII et XIV, on remarque que celles ci sont peu différentes, ce qui montre que la transformation angulaire ne permet pas de changer nos résultats et nos interprétations.

Dans nos conditions, la pondération, bien que nous n'ayons pas pu le prévoir, ne change pas de manière significative nos résultats. Ainsi, le taux de nouaison global est de 68,24% avec pondération et de 68,23% sans pondération.

Pour des raisons pratiques, nous n'avons plus séparé dans les étapes ultérieures, les caryopses provenant des deux méthodes de castration d'un même épi. Nous allons étudier dans le paragraphe suivant, l'influence de la saison sur la différenciation des embryons.

IV.2 Effet saison sur la différenciation des embryons



Nous avons réalisé un tableau à double entrée dans lequel nous avons regroupé les résultats des deux méthodes de castration. Nous y avons porté les pourcentages obtenus pour chaque répétition et ceux-ci indiquent les taux d'embryons différenciés par rapport aux caryopses formés.

Les moyennes observées, toutes lignées d'orge confondues sont les suivantes :

- Mars	: $\bar{x}_1 = 19,10\% \pm 23,62\%$	$n_1 = 176$
- Avril	: $\bar{x}_2 = 25,00\% \pm 24,30\%$	$n_2 = 136$
- Mai	: $\bar{x}_3 = 29,94\% \pm 23,08\%$	$n_3 = 117$

Le taux de différenciation des embryons augmente ainsi lorsque l'on passe du mois de mars au mois de mai. L'analyse de variance à 1 facteur appliqué à ce tableau, montre que ces différences sont significatives entre mois :

Origine de la variation	Somme des carrés	d.d.l.	Carré moyen	F
entre mois	8 487,6399	2	4 243,82	7,56***
résiduelle	239 115,64	426	561,30	
total	247 603,2799	428		

*** :signification à 0,001

C'est ainsi que pour le caractère : taux de différenciation des embryons, l'effet mois est marqué, et il montre donc que plus on s'approche des conditions naturelles, meilleurs sont les résultats. Les conclusions étaient identiques pour le caractère taux de nouaison.

IV.3. Comparaison de 2 milieux de culture pour l'obtention des plantes in vitro

Deux milieux de culture ont été utilisés dans notre travail: le milieu Gamborg B5 modifié par l'addition de 7g/l de Bacto Agar et sans 2,4-D, et le milieu Orchid Agar. Le premier a été utilisé au cours de la saison 1981, le second en 1982.

Les résultats portés dans le tableau XV indiquent le nombre de plantes haploïdes produites par rapport au nombre d'embryons différenciés et repiqués; Cette comparaison a été réalisée pendant les mois d'avril et mai 1981 et 1982.

Milieu de culture	Nombre de plantes obtenues	Nombre d'embryons repiqués sans développement	Taux
Gamborg B5	309	578	34,84%
Orchid Agar	414	817	33,55%
G = 0,33 N.S.			

Tableau XV : Influence du milieu de culture sur le développement des embryons issus du croisement *Hordeum vulgare* x *H. bulbosum*

Le tableau XV ne montre pas de différence significative entre les deux milieux de culture pour l'obtention des plantes in vitro à partir du développement des embryons. Les taux sont en effet très voisins : 34,84% pour le milieu GAMBORG B5 et 33,55% pour le milieu Orchid Agar. Toutefois, nous voudrions nuancer notre conclusion car, comme nous l'avons indiqué auparavant, le choix des embryons au cours de la saison 1982 a été plus sévère qu'en 1981.

Nous reprendrons cette comparaison de milieux de culture en 1983.

V. LES CROISEMENTS BLE X HORDEUM BULBOSUM

Nous avons croisé un ensemble de six variétés de blé hexaploïdes et une tétraploïde (Cocorit 71) par un mélange de pollen de deux souches d'*H. bulbosum* tétraploïdes. Ce travail a été réalisé au mois de Juin 1982. Nous reportons dans le tableau suivant les résultats obtenus :

Variétés de blé	Nombre de fleurs pollinisées	Nombre de caryopses formés	Nombre d'embryons différenciés	Nombre de plantes haploïdes	Nombre d'haploïdes doublés obtenus
Chinese-spring	120	23	8	6	3
Timgalen	88	2	0	/	/
Gammut	114	0	/	/	/
Timmo	60	6	2	2	1
Roazon	106	0	/	/	/
Iéna	94	0	/	/	/
Cocorit 71	54	0	/	/	/

Ce tableau montre une très forte influence de la variété de blé pour l'aptitude au croisement intergénérique avec *H. bulbosum*. Seules trois variétés ont présenté une compatibilité partielle avec *H. bulbosum* : Chinese-Spring, Timgalen et Timmo. Près d'une fleur sur cinq de la variété Chinese Spring a présenté le développement d'un caryopse. Les taux sont plus faibles pour la variété Timmo et Timgalen.

Les caryopses formés sont en général de très petite taille et une partie d'entre eux sont blanchâtres et desséchés. Certains sont plus gros, verdâtres et présentent un embryon de petite taille (inférieur au millimètre). Sur les 31 caryopses obtenus, dix embryons différenciés ont été repiqués sur milieu de culture Orchid Agar, et huit se sont développés en plantes. Après traitement à la colchicine, trois plantes ont été fertiles.

Ce premier résultat nous montre que ce système ne peut actuellement être utilisé dans un schéma de sélection de blé, puisque comme l'avaient signalé plusieurs auteurs, l'effet du génotype du blé est très marqué de sorte que pour la plupart d'entre eux, il a été impossible d'obtenir une nouaison. Cependant, notre attention porte que la variété de blé tendre "Timmo", pour laquelle aucun résultat n'a été relaté jusqu'à présent dans la littérature. Nous pensons continuer ce travail en utilisant cette dernière variété, Chinese-spring, et une variété incompatible stricte, pour tester un ensemble de souches d'*H. bulbosum* tétraploïdes.

CONCLUSION

Au début de ce travail, nous avons mis l'accent, par l'analyse bibliographique, sur l'importance des travaux réalisés dans le domaine de l'haploïdisation des espèces végétales cultivées en général et sur celle de l'orge par croisement interspécifique avec *Hordeum bulbosum* en particulier. Cette technique est utilisée essentiellement dans trois pays (Canada, Danemark et Grande Bretagne) dans des schémas de sélection d'orge de printemps. En effet, ce type d'orge y tient une place très importante. Par contre, en France, la situation n'est pas la même dans la mesure où la culture et la sélection de l'orge d'hiver y sont beaucoup plus développées. Par voie de conséquence, nous avons été amenés à adapter cette technique à notre matériel de type hiver.

Dans un premier temps, nous avons montré que certaines souches d'*Hordeum bulbosum* présentaient des rendements très faibles en plantes haploïdes et qu'il était nécessaire de les écarter pour un système de production tel que le nôtre. Il existe une variabilité entre souches d'*Hordeum bulbosum* pour leur aptitude à induire des haploïdes d'orge. Une souche à bon rendement a été isolée. Cependant, nous avons montré que cette souche ne présentait pas de bons rendements avec toutes les lignées d'orge qui constituaient notre matériel. L'analyse factorielle des

correspondances réalisée sur un tableau de croisement diallèle, a permis de mettre en évidence des complémentarités entre certaines souches d'*Hordeum bulbosum* pour leur aptitude au croisement avec les orges. Quatre souches ont ainsi présenté des complémentarités intéressantes et nous les avons utilisées en combinaison pollinique. L'hypothèse d'un mélange de pollen comme moyen d'amélioration de notre technique sur orges d'hiver 2 rangs ou 6 rangs, a été confirmée empiriquement. Pour les orges d'hiver à 6 rangs, matériel qui nous a semblé le plus difficile à haploïdiser par cette technique, nous avons obtenu en moyenne près de six plantes haploïdes pour cent fleurs pollinisées. Une variabilité existe également entre lignées d'orge mais aucune ne s'est montrée réfractaire à cette technique en utilisant la combinaison pollinique d'*H. bulbosum*.

De plus, l'étude des facteurs du milieu nous a apporté des informations intéressantes que nous prendrons en compte pour nos travaux futurs. D'une part, les croisements réalisés sur des plantes situées en plein champ nous ont donné un taux d'hybrides interspécifiques très élevé et nous avons abandonné cette solution au profit du travail en serre. D'autre part, nous avons montré que même dans ces conditions, l'effet saison est très marqué pour la réussite du programme, ainsi avons nous abandonné les croisements pendant les mois d'hiver. Un autre élément à prendre en considération est la méthode de castration, pour laquelle nous montrons qu'il est préférable de laisser les glumelles intactes plutôt que de les couper au tiers supérieur.

Ce travail ne s'arrêtera pas bien entendu à ce niveau et nous nous proposons maintenant d'esquisser nos futures voies d'études. Certains auteurs (KASHA et al., 1977) ont signalé qu'il était possible de fixer les gènes impliqués dans le phénomène d'hétérosis puisque certains haploïdes doublés tirés d'une F1 peuvent avoir un rendement aussi élevé que des hybrides F1 montrant un effet d'hétérosis très marqué. Nous pensons comparer des haploïdes doublés issus d'hybrides d'un même croisement mais à des stades plus ou moins avancés en sélection et essayer de définir le meilleur stade pour une production de lignées homozygotes au regard de caractères comme le rendement principalement.

Sur le plan de l'amélioration de la technique elle-même, nous pensons qu'il est nécessaire de continuer un programme de recherche de meilleurs souches d'*H. bulbosum*. Cette recherche doit se faire au niveau de trois caractères principaux qui sont le taux de nouaison, le taux d'embryons différenciés et le faible taux de plantes hybrides, en comparaison avec notre combinaison pollinique.

Toutes les manipulations sont longues et demandent une certaine pratique pour mener à bien un programme. Il serait bien entendu souhaitable d'en réduire leur durée. Recemment, DAHIYA et JATASRA, (1979) ont obtenu des résultats intéressants en facilitant l'opération de castration. Ces auteurs montrent qu'en coupant les glumelles avec une partie des anthères encore vertes, les microspores contenues dans ces anthères ne peuvent continuer leur maturité et de ce fait, la castration ne devient plus nécessaire. Nous envisageons de comparer cette méthode à celle que nous utilisons actuellement, car elle pourrait bien entendu nous faire gagner beaucoup de temps.

La comparaison de milieux de culture pour l'obtention des plantes in vitro sera reprise dès cette année de même qu'une étude sur la température d'incubation des embryons après repiquage (PICKERING, 1983c).

Nous pensons d'autre part, étendre notre recherche, à celle des croisements *Triticum aestivum* x *Hordeum bulbosum* pour laquelle beaucoup de travail reste à faire au regard des résultats préliminaires que nous avons obtenus. Notre première voie sera de tester plusieurs souches d'*H. bulbosum* (4x) en croisement avec quelques variétés de blé communes.

B I B L I O G R A P H I E

- ADAMSKI T., 1979a. The obtaining of autodiploid barley lines using haploïds from the cross *Hordeum vulgare* L. x *Hordeum bulbosum* L. *Genetica polonica*, 20, 31-42.
- ADAMSKI T., 1979b. Morphological characters of autodiploids lines in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Genetica polonica*, 20, 179-188.
- AGOUDJIL S., 1980. Essai de caractérisation des chromosomes de *Capsicum annuum* par les techniques du caryogramme et du banding. *Thèse de 3ème cycle*, Université de Paris XI, 47p. .
- ALJANABI K., 1981. Haploïdisation chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) par élimination chromosomique à partir du croisement intergénérique avec *Hordeum bulbosum* L. *Thèse de Docteur-Ingénieur*, Université de Paris XI, 186p.
- ALJANABI K., PICARD E., 1981. Transfert chez le blé tendre par androgénèse in vitro des gènes de compatibilité avec *Hordeum bulbosum* (kr1 kr2). *C. R. Acad. Sc. Paris*, 292, 247-250.
- AMER S., FARAH O., 1978. Cytological effects of pesticides. X. Meiotic effects of "Phosvel". *Cytologia*, 45, 241-245.
- ASSELIN de BEAUVILLE M., 1980. Obtention d'haploïdes in vitro à partir d'ovaires non fécondés de riz, *Oryza sativa* L.. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 290, 489-492.
- BADENHUIZEN N.P., 1941. Experimentally produced haploids in *Nicotiana tabacum* by means of X-rays. *Natuurwetenschap. Tijds. Nederland Indie*, 101, 240-242.
- BARCLAY I.R., 1975. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. *Nature*, 256, 410-411.
- BARCLAY I.R., SHEPHERD K.W., SPARROW D.B.H., 1972. Control of chromosome elimination in *Hordeum vulgare*-*H. bulbosum* hybrids. *Barley Genetics Newsletter*, 2, 22-24.
- BENNETT M.D., FINCH R.A., BARCLAY I.R., 1976. The time, rate and mechanism of chromosome elimination in *Hordeum* hybrids. *Chromosoma*, 54, 175-200.
- BLAKESLEE A.F., BEILING J., FARNHAM M.E., BERGNER A.D., 1922. A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. *Science*, 55, 646-647.
- BLANCHET Y., 1967. Haploïdie et sélection des plantes. *Le Sélectionneur français*, 1-49.
- BOURGIN J.P., NITSCH J.P., 1967. Obtention de *Nicotiana* haploïdes à partir d'étamines cultivées in vitro. *Ann. Physiol. Végétale*, 9, 377-382.

- BRETTELL R.I.S., THOMAS E., WERNICKE W., 1981. Production of haploid maize plants by anther culture. *Maydica*, 26, 101-111.
- BROWN J.S., WERSMAN E.A., 1982. Nature of reduced productivity of anther-derived dihaploid lines of flue-cured tobacco. *Crop Science*, 22, 1-4.
- BURHAM C., 1962. Haploids and monploids. p. 179-182. In *Discussion in cytogenetics*, Burgess Publishing Company.
- CAMEFORT H., BOUE H., 1969. *Reproduction et biologie des principaux groupes végétaux : les cormophytes ou archégoniates*. DOIN, Paris, 422p.
- CAMPOS F.F., MORGAN D.T.Jr., 1960. Genetic control of haploidy in *Capsicum frutescens* L. following crosses with untreated and X-rayed pollen. *Cytologia*, 25, 362-372.
- CAUDERON Y., 1981. Hybridation interspécifique et amélioration des plantes. I. Evolution des voies d'étude des relations entre espèces. *C. R. Acad. Agri.*, 12, 1001-1012.
- CAUDERON Y., CAUDERON A., 1956. Etude de l'hybride F1 entre *Hordeum bulbosum* L. et *H. secalinum* Schreb. *Ann. Amélior. Plantes*, 6, 307-317.
- CHANG Z., HONG-YUAN Y., 1981. Induction of haploid rice plantlets by ovary culture. *Plant Sci. Letters*, 20, 231-237.
- CHAPMAN V., MILLER T.E., RILEY R., 1976. The production of wheat haploids by the use of *H. bulbosum*. *Ann. Rep. P.B.I.*, 99-100.
- CHAPMAN V., MILLER T.E., 1977. Haploidy in the genus *Aegilops*. *Wheat Inf. Serv.*, 44, 21-22.
- CHASE S.S., 1949. Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize, and in its component single cross hybrids and inbred lines. *Genetics*, 34, 328-332.
- CHASE S.S., 1952. Monoploids in maize. In J.W. GOWEN. *Heterosis*. Iowa State College Press, Ames.
- CHASE S.S., 1969. Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea-mays* L.) *Bot. Rev.*, 35, 117-167.
- CHOO T.M., REINBERGS E., 1982. Analyses of skewness and kurtosis for detecting gene interaction in a doubled haploid population. *Crop science*, 22, 231-235.
- CHOO T.M., REINBERGS E., PARK S.J., 1982. Comparison of frequency distributions of doubled haploid and single seed descent lines in barley. *Theor. Appl. Genet.* 61, 215-218.
- CHUECA M.C., CAUDERON Y., TEMPE J., 1977. Technique d'obtention d'hybrides Blé tendre x *Aegilops* par culture in vitro d'embryons immatures. *Ann. Amélior. Plantes*, 27, 539-547.
- CHUNG-SHEN K., 1982. The preliminary studies on culture of unfertilized ovary of rice in vitro. *Acta Bot. Sinica*, 24, 33-39.
- CLAPHAM D., 1971. In vitro development of callus from the pollen of *Lolium* and *Hordeum*. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 65, 285-292.

- CLAPHAM D., 1973. Haploid *Hordeum* plants from anthers in vitro
Z. Pflanzenzüchtg., 69, 142-155.
- CLAPHAM D., 1977. Haploid induction in cereals, p.279-340. In J. REINERT
and Y.P.S. BAJAJ. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue
and organ culture*. Springer-Verlag, Berl., Heid., N.Y.
- COLLINS G.B., LEGG P.D., 1979. Recent advances in the genetic and applications
of haploidy in *Nicotiana*, p.197-213. In D.R. DAVIES and D.A. HAPWOOD.
The plant genome, Proc. of the 4th John Innes Symp., Norwich,
Grande Bretagne.
- CONGER B.V., 1981. Agronomic crops. p165-215. In B.V. CONGER. *Cloning
agricultural plants via in vitro techniques*. C.R.C. Press, Boca Raton,
Floride.
- CORBINEAU F., COME D., 1980. Quelques caractéristiques de la dormance du
caryopses d'orge (*Hordeum vulgare* L., variété Sonja). *C. R. Acad. Sc.
Paris*, 290, 547-550.
- COSTES C., 1967. Eclairage artificiel et sélection. *Le Sélectionneur
Français*, 3, 3-13.
- DAGNELIE P., 1975. *Théorie et méthodes statistiques*. Vol 2, PRESSES
AGRONOMIQUES, Gembloux, 2^e éd., 463p.
- DAHIYA B.N., JATASRA D.S., 1979. A rapid method of hand crossing barley
Indian J. Agric. Sci., 49, 915-917.
- DAVIES D.R., 1958. Male parthenogenesis in barley. *Heredity*, 12, 493-498.
- DAVIES D.R., 1974. Chromosome elimination in inter-specific hybrids.
Heredity, 32, 267-269.
- DAVIES D.R., 1979. Some of the implications of haploidy for the angiosperms.
p. 161-169. In D.R. DAVIES and D.A. HOPWOOD. *The plant genome, Proc.
4th John Innes Symp.*, Norwich, Grande Bretagne.
- DEANON J.R., 1957. Treatment of sweet corn silks with maleic hydrazide and
colchicine as a means of increasing the frequency of monoplastoids.
Philipp. Agri. 41, 346-377.
- DE BUYSER J., HENRY Y., LAUR R., LONNET P., 1981. Utilisation de l'andro-
génèse in vitro dans des programmes de sélection du blé tendre.
(*Triticum aestivum* L.). *Z. Pflanzenzüchtg.*, 87, 290-299.
- DE FOSSARD R.A., 1974. Terminology in haploid work. P.403-410. In K.J.
KASHA. *Haploids in plant breeding, Advances and potential, Proc.
1st Intl. Symp.*, Guélfh, Canada.
- DE JONG J.H., DE BOCK T.S.M., 1978. Use of haploids of *Beta vulgaris* L.
for the study of orcein and Giemsa stained chromosomes. *Euphytica*,
27, 41-47.
- DEMARLY Y., 1975. Anther and pollen culture for production of haploids.
Their utilization in plant breeding. p.142-154. In *Ploidy in fodder
plants, Proc. Cong. Eucarpia*, Zurich, Suisse.

- DEVAUX P., LEFEBVRE J., JEAN R., 1981. Analyse de la ségrégation mendélienne "2 rangs d'épillets, 6 rangs d'épillets" sur l'épi d'orge cultivée. *Bull. Soc. Bot. N. France*, 34, 51-58.
- DEYMIE B., 1983. Maltage : but et principe. Problème d'utilisation de l'acide gibberellique. p. 225-236. In *Les substances de croissance et leurs utilisations en agriculture.*, C.R. Coll. Columa, t.2, *Applications pratiques*. Paris. France.
- DORE C., 1978. Techniques de production des haploïdes et cas de l'asperge. *Le Sélectionneur Français*, 26, 19-23.
- DOSBA F., TROTTET M., TANGUY A.M., 1979. Obtention d'haploïdes d'*Aegilops squarrosa* L. et de blé tendre à partir d'embryons doubles. *Sciences agronomiques Rennes*, 1-7.
- DUMAS de VAULX R., 1979. Obtention de plantes haploïdes chez le melon (*Cucumis melo* L.) après pollinisation par *Cucumis ficifolius*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 289, 875-878.
- DUMAS de VAULX R., CHAMBONNET D., POCHARD E., 1981. Culture in vitro d'anthères de piment (*Capsicum annuum* L.) : amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à + 35°C. *Agronomie*, 1, 859-864.
- DUMAS de VAULX R., POCHARD E., 1974. Essai d'induction de la parthénogenèse haploïde par action du protoxyde d'azote sur les fleurs de piments (*Capsicum annuum* L.). *Ann. Amélior. Plantes*, 24, 283-306.
- DUNWELL J.M., 1981. Influence of genotype and environment on growth of barley embryos in vitro. *Ann. Bot.*, 48, 535-542.
- DYER A.F., 1979. *Investigating chromosomes*. ARNOLD, London, 1^{er} éd., 138p.
- ESSAD S., CACHON H., 1965. Recherches préliminaires sur orge pour une tentative d'amélioration des traitements par la colchicine. *Ann. Amélior. Plantes*, 15, 5-21.
- FALK D.E., KASHA K.J., 1981. Comparison of the crossability of rye (*Secale cereale*) and *Hordeum bulbosum* onto wheat (*Triticum aestivum*). *Can. J. Genet. Cytol.*, 23, 81-88.
- FALK D.E., KASHA K.J., 1983. Genetic studies of the crossability of hexaploid wheat with rye and *Hordeum bulbosum*. *Theor. Appl. Genet.*, 64, 1-5.
- FEDAK G., 1976. Evaluation of doubled haploïds in barley. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 76, 147-151.
- FEDAK G., 1977a. Haploïds from barley x rye crosses. *Can. J. Genet. Cytol.* 19, 15-19.

- FEDAK G., 1977b. Barley monoloids and hybrids from barley x rye crosses. p.269-273. In *Interspecific hybridization in plant breeding, Proc. 8th Eucarpia Cong.*, Madrid, Espagne.
- FENELON J.P., 1981. *Qu'est ce que l'analyse des données ?*. LEFONEN, Paris, 311p. .
- FEYT H., PELLETIER G., 1976. Haploidie et sélection. *Ann. Amélior. Plantes*, 26, 365-386.
- FINCH R.A., BENNETT M.D., 1979. Meiotic stability in control and newly colchicine induced dihaploid barley. *Can. J. Genet. Cytol.*, 21, 33-35.
- FINCH R.A., BENNETT M.D., 1982. Wheat x barley crosses. *Ann. Rep. P.B.I. for 1981*, 78-79.
- FISCHER H.E., 1962. Über vorkommen and bedeutung verschiedener genomstufen bei *Beta vulgaris* L. *Züchter*, 32, 40-48.
- FOROUGH-WEHR B., FRIEDT W., WENZEL G., 1982. On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. . *Theor. Appl. Genet.* 62, 233-239.
- FOROUGH-WEHR B., MIX G., GAUL H., WILSON H.M., 1976. Plant production from cultured anthers of *Hordeum vulgare* L. . *Z. Pflanzenzüchtg.* 77, 198-204.
- FOROUGH-WEHR B., PICKERING R., FRIEDT W., 1981. Related response of barley cultivars to the "bulbosum" and anther-culture techniques of haploid production. *Barley Genetics Newsletter*, 11, 54-59.
- FRONTIER S., 1981. *Méthode statistique*. MASSON, Paris, 246p.
- FUKUI K., NIIZEKI H., 1983. Artificial reduction of chromosome number in *Fragaria ananasa* following treatment with p-fluorophenylalanine. p.427-428. In A. FUJIWARA. *Plant tissue culture 1982, Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, Tokyo 1982, Japon.
- FUKUYAMA T., HOSOYA H., 1981. Time, pattern and genetic control of chromosome elimination in interspecific hybrids between 4X *Hordeum bulbosum* L. and 4X *H. vulgare* L. *Barley Genetics Newsletter*, 11, 47-50.
- FUKUYAMA T., TAKAHASHI R., 1976. A study of the interspecific hybrid, *Hordeum bulbosum* (4X) x *H. vulgare* (4X) with special reference to dihaploid frequency. p.351-360. In H. GAUL. *Barley genetics III, Proc. 3rd Intl. barley genet. Symp.*, Garching 1975, R.F.A. .
- GAGNIEU A., 1949. *L'observation des chromosomes*. SEDES, Paris, 79p.
- GALLAIS A., 1978. Place de l'haploidie dans un schéma de sélection. *Le sélectionneur français*, 26, 39-49.

- GAMBOURG O.L., 1982. Callus and cell culture. p.1-9. In L.R. WETTER and F. CONSTABEL. *Plant tissue culture methods*. N.R.C.C., Ottawa, Ontario, 2nd éd., 145p. .
- GAMBOURG O.L., MILLER R.A., OJIMA K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exptl. Cell Res.*, 50, 151-158.
- GAMBOURG O.L., MURASHIGE T., THORPE T.A., VASIL I.K., 1976. Plant tissue culture media. *In vitro*, 12, 473-478.
- GAUTHERET R., 1959. *La culture des tissus végétaux*. MASSON, Paris, 863p.
- GUHA S., MAHESHWARI S.C., 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204, 497.
- GUPTA S.B., 1969. Duration of mitotic cycle and regulation of DNA replication in *Nicotiana plumbaginifolia* and a hybrid derivative of *N. tabacum* showing chromosome instability. *Can. J. Genet. Cytol.*, 11, 133-142.
- GUPTA S.B., GUPTA P., 1973. Selective somatic elimination of *Nicotiana glutinosa* chromosomes in the F1 hybrids of *N. suaveolens* and *N. glutinosa*. *Genetics*, 73, 605-612.
- HAGBERG A., HAGBERG G., 1980. High frequency of spontaneous haploids in the progeny of an induced mutation in barley. *Hereditas*, 93, 341-343.
- HAGBERG G., HAGBERG A., 1982. Haploidy initiator gene in barley. p.686-689. In *Barley Genetics IV, Proc. 4th Intl. barley genet. Symp.*, Edinburgh 1981, Grande Bretagne.
- HAI-MAN L., 1978. The advance of studies on medium for anther culture of rice in China. p.57-64. In *Proc. Symp. Plant tissue culture*, Science Press, Peking 1978, 531p.
- HARLAN J.R., 1976. Barley. p.93-98. In N.W. SIMMONDS. *Evolution of crop plants*, LONGMAN, 339p.
- HERMSEN J.G.Th., 1974. Summation : Haploids in plant breeding. p. 281-285, In K.J. KASHA. *Haploids in plant breeding, Advances and potential, Proc. 1st Intl. Symp.*, Guelph, Canada.
- HESLOP HARRISON J., 1979. Pollen-stigma interaction in grasses : a brief review. *N.Z.J. Bot.*, 17, 537-546.
- HO K.M., JONES G.E., 1980. Mingo barley. *Can. J. Plant Sci.*, 60, 279-280.
- HO K.M., KASHA K.J., 1975. Genetic control of chromosome elimination during haploid formation in barley. *Genetics*, 81, 263-275.
- HO K.M., MA P.C., MORTIMORE C.G., JONES G.E., 1978a. Application of the haploid technique in barley breeding. *Barley Newsletter*, 21, 43-44.

- HO K.M., SHANKS D.P., SMITH W.C., MA P.C., 1978b. Chromosome doubling at various growth stages of barley haploids with colchicine. *Barley Genetics Newsletter*, 8, 51-52.
- HO K.M., STOKKERMANS N.J., SADLER B.J., McINTOSH K.C., HO L.C., 1978c. Efficiency of barley haploid production. *Barley Genetics Newsletter*, 8, 53-55.
- HOUGLAS R.W., PELOQUIN S.J., GABERT A.C., 1964. Effect of seed parent and pollinator on frequency of haploids in *Solanum tuberosum*. *Crop science*, 4, 593-595.
- HU H., 1978. Advances in anther culture investigations in China. p.3-10. In *Proc. Symp. Plant tissue culture*, Science Press, Peking 1978, 531p.
- HU H., ZIYING X., JIANKANG J., XINGZHI W., 1983. Production of aneuploids and hereploids of pollen derived plants. p.421-424. In A. FUJIWARA. *Plant tissue culture 1982, Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, Tokyo 1982, Japon.
- HUMPHREYS M.W., 1978. Chromosome instability in *Hordeum vulgare* x *Hordeum bulbosum* hybrids. *Chromosoma*, 65, 301-307.
- HUSKINS C.L. 1948. Segregation and reduction in somatic tissues. I. Initial observations on *Allium cepa*. *J. Hered.* 39, 311-325.
- ISLAM R., SPARROW D.H.B., 1973. Production of haploids in barley. *Barley Newsletter*, 17, 40-42.
- JALANI B.S., MOSS J.P., 1980. The site of action of the crossability genes (Kr_1 , Kr_2) between *Triticum* and *Secale*. I. Pollen germination, pollen tube growth, and number of pollen tubes. *Euphytica*, 29, 571-579.
- JALANI B.S., MOSS J.P., 1981. The site of action of crossability genes (Kr_1 , Kr_2) between *Triticum* and *Secale*. II. Proportion of pistils containing pollen tubes and effects of alternate pollination on seed set. *Euphytica*, 30, 105-112.
- JENSEN C.J. 1974a. Production of monoploids in barley. A progress report. p. 167-179. In *Polyploidy and induced mutations in plant breeding, Proc. FAO/IAEA and Eucarpia Meeting*, Bari, Italie.
- JENSEN C.J. 1974b. Chromosome doubling techniques in haploids. p.153-190. In K.J. KASHA. *Haploids in plant breeding, Advances and potential, Proc. 1st Intl. Symp.*, Guelph, Canada.
- JENSEN C.J., 1976. Barley monoploids and doubled monoploids : techniques and experience. p.316-345. In H. GAUL. *Barley genetics III, Proc. 3rd Intl. barley genet. Symp.*, Garching 1975, R.F.A.
- JENSEN C.J., 1977. Monoploid production by chromosome elimination. p. 299-340. In J. REINERT and Y.P.S. BAJAJ. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Springer-Verlag, Berl., Heid., N.Y.

- JENSEN C.J., 1982. Haploid production through chromosome elimination in cereal crops. In *Cell and tissue culture techniques in cereal improvement, Proc. Intl. Workshop*, Science press, Peking 1981, (sous presse).
- JOHNS W.A., REINBERGS E., 1973. Preliminary observations on the haploid barley breeding technique. *Barley Newsletter*, 16, 32-33.
- JOHNS W.A., HARVEY B.L., 1974. The effects of *Hordeum bulbosum* L. cytoplasm on *H. vulgare* L. p.276-277. In K.J. KASHA. *Haploids in plant breeding, Advances and potential, Proc. 1st Intl. Symp.*, Guelph, Canada.
- JØRGENSEN R.B., 1982. Biosystematics of *Hordeum bulbosum* L. *Nord. J. Bot.*, 2, 421-434.
- KAO K.N., KASHA K.J., 1969. Haploidy from interspecific crosses with tetraploid barley. p.82-88. In R.A. NILAN. *Barley Genetics II, Proc. 2nd Intl. barley genet. Symp.*, Washington 1969, U.S.A.
- KASHA K.J., 1974. Haploids from somatic cells. p.67-87. In K.J. KASHA. *Haploids in plant breeding, Advances and potential, Proc. 1st Intl. Symp.*, Guelph, Canada.
- KASHA K.J. 1976. Utilization of haploidy in plant breeding and mutation. *Genetika*, 8, 101-110.
- KASHA K.J. 1982. Production and applications of haploids in barley. p.127-135. In *Actas V Congr. Latinoam. Genética*.
- KASHA K.J., KAO K.N., 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Nature*, 225, 874-876.
- KASHA K.J., REINBERGS E., 1976. Utilization of haploidy in barley. p. 307-315. In H. GAUL. *Barley Genetics III, Proc. 3rd Intl. barley genet. Symp.*, Garching 1975, R.F.A.
- KASHA K.J., REINBERGS E., 1979. Achievements with haploids in barley research and breeding. p.215-230. In D.R. DAVIES and D.A. HOPWOOD. *The plant genome, Proc. of the 4th John Innes Symp.*, Norwich, Grande Bretagne.
- KASHA K.J., REINBERGS E., 1982. Recent developments in the production and utilization of haploids in barley. p.655-676. In *Barley Genetics IV, Proc. 4th Intl. barley genet. Symp.*, Edinburgh 1981, Grande Bretagne.
- KASHA K.J., SADASIVAI AH R.S., 1971. Genome relationships between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Chromosoma*, 35, 264-287.
- KASHA K.J., SONG L.S.P., PARK S.J., REINBERGS E., 1977. Fixation of heterosis: comparison of F₁ hybrids with their respective homozygous lines developed using doubled haploid procedures. *Cereal Res. Comm.*, 5, 205-214.

- KASHA K.J., SUBRAHMANYAM N.C., ALI A., 1978. Effect of gibberellic acid treatment, and nutrient supply through detached tillers, upon haploid frequency in barley. *Theor. Appl. Genet.*, 51, 169-175.
- KATAYAMA Y., 1934. Haploid formation by X-rays in *Triticum monococcum*. *Cytologia*, 5, 234-237.
- KATZNELSON J., ZOHARY D., 1967. Diploid and tetraploid *Hordeum bulbosum*. *Israël J. Bot.*, 16, 57-62.
- KAUL B.L., ZUTSHI U., 1971. Dimethyl sulphoxide as an adjuvant of colchicine in the production of polyploids in crop plants. *Indian J. Exp. Biol.*, 9, 522-523.
- KELLER W.A., ARMSTRONG K.C., 1978. High frequency production of microspore derived plants from *Brassica napus* anther cultures. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 80, 100-108.
- KIHARA H., 1940. Formation of haploids by means of delayed pollination in *Triticum monococcum*. *Bot. Mag.*, 54, 178-185. (en japonais avec résumé en anglais).
- KIHARA H., TSUNEWAKI K., 1962. Use of an alien cytoplasm as a new method of producing haploids. *Jpn. J. Genet.*, 37, 310-313.
- KIMBER G., RILEY R., 1963. Haploid angiosperms. *Bot. Rev.*, 29, 480-531.
- KINOSHITA T., 1983. Fundamental problems on haploid breeding by means of anther culture in rice plants. p. 567-568. In A. FUJIWARA. *Plant tissue culture 1982, Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, Tokyo 1982, Japon.
- KOLLER D., HIGHKIN H.R., 1960. Environmental control of reproductive development in *Hordeum bulbosum*, a perennial pasture grass. *Amer. J. Bot.*, 47, 843-847.
- KONZAK C.F., RANDOLPH L.F., JENSEN N.F., 1951. Embryo culture of barley species hybrids. *J. Hered.*, 42, 125-134.
- KOSTOFF Ø., 1941. The problem of haploidy. *Bibl. Genet.*, 13, 1-148.
- KRUSE A., 1967. Intergeneric hybrids between *Hordeum vulgare* L. ssp. *distichum* (v. Pallas, 2n = 14) and *Secale cereale* L. (v. Petkus, 2n = 14). p. 82-92. In *Royal Veterinary and Agricultural College, Yearbook*, Copenhagen, Denmark.
- KRUSE A., 1973. *Hordeum* x *Triticum* hybrids. *Hereditas*, 73, 157-161.
- KRUSE A., 1974. An in vivo/vitro embryo culture technique. *Hereditas*, 77, 219-224.

- KRUSE A., 1980. The potential use of heterosis in *Beta vulgaris* L. I. The production of monoploids, pure lines and polycross hybrids. p.117-137. In *Royal Veterinary and Agricultural College, Yearbook*, Copenhagen, Denmark.
- LACADENA J.R., 1974. Spontaneous and induced parthenogenesis and androgenesis. p. 13-32. In K.J. KASHA. *Haploids in plant breeding, Advances and potential, Proc. 1st Intl. Symp.*, Guelph, Canada.
- LACADENA J.R. RAMOS A., 1968. Meiotic behaviour in a haploid plant of *Triticum durum* Desf. *Genet. Iberica*, 20, 55-71.
- LANGE W., 1968. Voorlopige resultaten van kruisingen tussen *Hordeum vulgare* (Gerst) en *Hordeum bulbosum*. *Jaarb. Sticht. Ned. Graancent.*, 10, 118-124. (en hollandais avec résumé en anglais).
- LANGE W., 1969. Cytogenetisch en embryologisch onderzoek aan kruisingen tussen *Hordeum vulgare* en *H. bulbosum*. *Versl. Landbouwk. Onderz.*, 719, 1-162. (en hollandais avec résumé en anglais).
- LANGE W., 1971a. Crosses between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. I. Production, morphology and meiosis of hybrids, haploids and dihaploids. *Euphytica*, 20, 14-29.
- LANGE W., 1971b. Crosses between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. II. Elimination of chromosomes in hybrid tissues. *Euphytica*, 20, 181-194.
- LANGE W., JOCHEMSEN G., 1976a. The offspring of diploid, triploid and tetraploid hybrids between *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum*. In H. GAUL. *Barley Genetics III.*, *Proc. 3rd Intl. barley genet. Symp.*, Garching 1975, R.F.A.
- LANGE W., JOCHEMSEN G., 1976b. Karyotypes, nucleoli, and amphiplasty in hybrids between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Genetica*, 46, 217-233.
- LARTER E.N.; ENNS H., 1960. The influence of gibberellic acid on the development of hybrid barley ovules in vivo. *Can. J. Genet. Cytol.*, 2, 435-441.
- LEFEBVRE J., 1980. *Introduction aux analyses statistiques multidimensionnelles*. MASSON, Paris, 2^eéd., 259p.
- LINDE-LAURSEN I., 1975. Giemsa C-banding of the chromosomes of "Emir" barley. *Hereditas*, 81, 285-289.
- LINDE-LAURSEN I., 1976. Identification by Giemsa staining of the barley chromosomes and their arms. *Barley Genetics Newsletter*, 6, 41-43.

- LINDE-LAURSEN I., 1978. Giemsa C-banding of barley chromosomes I: Banding pattern polymorphism. *Hereditas*, 88, 55-64.
- LUK'YANYUK S.F., IGNATOVA S.A., MAKSIMOVA V.I., NAVOLOTSKII V.D., SHEREMET A.M., 1980. Production of haploids by crossing of *Hordeum vulgare* with *Hordeum bulbosum*. *Sel'skokhozyaistvennykh Nauk im. V.I. Lenina*, 2, 7-9.
- LUNDQVIST A., 1962. Self-incompatibility in diploid *Hordeum bulbosum* L., *Hereditas*, 48, 138-152.
- LYER C.P.A., RANDHAWA G.S., 1965. Increasing colchicine effectiveness in woody plants with special reference to fruit crops, *Euphytica*, 14, 203-205.
- MAGOON M.L., KHANNA K.R., 1963. Haploids. *Caryologia*, 6, 191-235.
- MARKS G.E., 1973. Selecting *asparagus* plants as sources of haploids. *Euphytica*, 22, 310-316.
- MASHESHWARI S.C., RASHID A., TYAGI A.K., 1982. Haploids from pollen grains retrospect and prospect, *Ann. J. Bot.* 69(5) 865-879.
- MAZOTI L.B., MUALENBERG G.B., 1958. Natural haploids in maize. *Rev. Argent. Agron.*, 25, 171-178.
- MELCHERS G., LABIB G., 1974. Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts. I. Selection of light resistant hybrids of "haploid" light sensitive varieties of tobacco. *Molec. Gen. Genet.* 135, 277-294.
- MIAO S.H., KUO C.S., KWEI Y., SUN A.T., KU S.Y., LU W.L., WANG Y.Y., CHEN M.L., WU M.K., HANG L., 1978. Induction of pollen plants of maize and observations on their progeny. p.23-33. In *Proc. Symp. Plant tissue culture*, Science Press, Peking 1978, 531p.
- MIX G., 1983. Anther culture of *Solanum tuberosum* L. and some wild species. p.573-574. In A. FUJIWARA. *Plant tissue culture 1982. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, Tokyo 1982, Japon.
- MIX G., WILSON.H.M., FOROUGH-WEHR B., 1978. The cytological status of plants of *Hordeum vulgare* L. regenerated from microspore callus. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 80, 89-99.
- MONNIER M., 1973. Croissance et développement des embryons globulaires de *Capsella Bursa-pastoris* cultivés in vitro dans un milieu à base d'une nouvelle solution minérale. *Soc. Bot. Fr., Mémoires*, 179-194.
- MORGAN W.G., 1976. A technique for the production of polyploids in grasses. *Euphytica*, 25, 443-446.
- MORRISON J.W., HANNAH A.E., LOISELLE R., SYMKO S., 1959a. Cytogenetic studies in the genus *Hordeum*. II. Interspecific and intergeneric crosses. *Can. J. Plant Sci.*, 39, 375-383.

- MORRISON J.W., RAJHATHY T., 1959b. Cytogenetic studies in the genus *Hordeum*. III. Pairing in some interspecific hybrids. *Can. J. Genet. Cytol.* 1, 65-77.
- MUNTZING A., 1937. Note on a haploid rye plant. *Hereditas*, 23, 401.
- NATARAJAN A.T., SWAMINATHAN M.S. 1958. Haploidy induced by radiations in wheat. *Experientia*, 14, 336.
- NEI M., 1963. The efficiency of haploid method of plant breeding. *Heredity*, 18, 95-100.
- NITZSCHE W., 1973. Mitotic chromosome reduction in higher plants treated with 3 Fluorophenylalanine. *Die Naturwissenschaften*, 60, 1-2.
- NITZSCHE W., WENZEL G., 1977. *Haploids in plant breeding*. VERLAG PAUL PAREY, Berl. Hamb., 101p.
- NODA K., KASHA K.J., 1981a. Chromosome elimination in triploid hybrids between *Hordeum vulgare* (2x) and *H. bulbosum* (4x). *Cereal Res. Comm.*, 9, 85-91.
- NODA K., KASHA K.J., 1981b. Chromosome elimination in different meristematic regions of hybrids between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Jpn. J. Genet.*, 56, 193-204.
- NORDENSKIOLD H., 1939. Studies of a haploid rye plant. *Hereditas*, 25, 204-210.
- NORSTOG K., 1965. Development of cultured barley embryos. I. Growth of 0.1-0.4mm embryos. *Am. J. Bot.*, 52, 538-546.
- NORSTOG K., 1967. Studies on the survival of very small barley embryos in culture. *Bull. Torrey Bot. Club*, 94, 223-229.
- NORSTOG K., 1973. New synthetic medium for the culture of premature barley embryos. *In vitro*, 8, 307-308.
- NOVAK F., BETLACH J., 1969. Somatic haploidy in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genetika a Slechteni*, 5, 199-204.
- NOVAK F.J., MINARIK F., OHNOUTKOVA L., BOUMA J., 1977. Production of haploid barley (*Hordeum vulgare* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) in interspecific hybridization with *Hordeum bulbosum* L. p.427-439. In F.J. NOVAK. *Use of tissue cultures in plant breeding*, Proc. Intl. Symp., Olomouc 1976, Tchecoslovaquie.
- OETTLER G., 1982. Effect of parental genotype on crossability and response to colchicine treatment in wheat-rye hybrids. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 88, 322-330.
- ORTON T.J., TAI W., 1977. Chromosome elimination in a complex hybrid of the genus *Hordeum*. *Can. J. Bot.*, 55, 3023-3033.

- PARK S.J., WALSH E.J., REINBERGS E., SONG L.S.P., KASHA K.J., 1976. Field performance of doubled haploid barley lines in comparison with lines developed by the pedigree and single seed descent methods. *Can. J. Plant Sci.*, 56, 467-474.
- PERENNEC P., 1982. Utilisation des especes sauvages et des formes primitives dans l'amélioration de la pomme de terre. *Le Sélectionneur français*, 30, 13-19.
- PERSON C., 1955. An analytical study of chromosome behaviour in a wheat haploid. *Can. J. Bot.*, 33, 11-30.
- PICKERING R.A., 1975. Homozygous barley utilizing haploids. *Rep. Welsh Pl. Breed. Stn. for 1974*, 34-35.
- PICKERING R.A., 1977. Production of doubled haploid barley. *Rep. Welsh Pl. Breed. Stn. for 1976*, 61-63.
- PICKERING R. A., 1979a. Further investigations on partial incompatibility in crosses between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. p. 319-325. In *Proc. Conf. Broadening Genet. Base Crops*, Pudoc, Wageningen 1978, Pays-bas.
- PICKERING R.A., 1979b. Partial incompatibility between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Incompatibility Newsletter*, 11, 27-29.
- PICKERING R.A., 1980a. Attempts to overcome partial incompatibility between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Euphytica*, 29, 369-377.
- PICKERING R.A., 1980b. Use of the doubled haploid technique in barley breeding at the Welsh Plant Breeding Station. *Rep. Welsh Pl. Breed. Stn. for 1979*, 208-226.
- PICKERING R.A., 1982a. Pollen tube-stylodium interaction in *Hordeum vulgare* L. x *H. bulbosum* L. p.666-676. In *Barley Genetics IV, Proc. 4th Intl. barley genet. Symp.*, Edinburgh 1981, Grande Bretagne.
- PICKERING R.A., 1982b. The effect of tridemorph and pirimicarb on embryo development in barley. *Cereal Res. Comm.*, 10, 79-85.
- PICKERING R.A., 1982c. The effect of pollinisation bag type on seed quality and size in *Hordeum* inter- and intraspecific hybridization. *Euphytica*, 31, 439-449.
- PICKERING R.A., 1983a. The influence of genotype on doubled haploid barley production. (sous presse).
- PICKERING R.A., 1983b. The assessment of variability in two populations of *Hordeum bulbosum* L. for improving success rates in a doubled haploid programme. (sous presse).
- PICKERING R.A., 1983c. The influence of incubation temperature on the germination of haploid barley (*Hordeum vulgare* L.) embryos. (sous presse).

- PICKERING R.A., HAYES J.D., 1976. Partial incompatibility in crosses between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Euphytica*, 25, 671-678.
- PICKERING R.A., MORGAN P.W., 1978. Production of doubled haploid barley. *Rep. Welsh Pl. Breed. Stn. for 1977*, 65-66.
- PICKERING R.A., MORGAN P.W., 1979a. Production of doubled haploid barley. *Rep. Welsh Pl. Breed. Stn. for 1978*, 84-85.
- PICKERING R.A., MORGAN P.W., 1979b. Progress in doubled haploid production at the Welsh Plant Breeding Station. *Barley Newsletter*, 22, 141-143.
- PICKERING R.A., MORGAN P.W., 1983. Plant regeneration from haploid embryo of *Hordeum vulgare* L. (sous presse).
- PONTECORVO G., 1971. Induction of directional chromosome elimination in somatic cell hybrids. *Nature*, 230, 367-368.
- POPE M.N., 1944. Some notes on technique in barley breeding. *J. Hered.*, 35, 99-111.
- RAJHATHY T., 1967. Notes on some interspecific *Hordeum* hybrids. *Barley Newsletter*, 10, 69-70.
- RAQUIN C., 1980. Les haploïdes chez les plantes supérieures : origines, méthodes d'obtention, utilisation en amélioration des plantes. p 223-232. In R. CHAUSSAT and C. BIGOT. *La multiplication végétative des plantes supérieures*. Gauthier-Villars, Paris, 277p.
- REINBERGS E., PARK S.J., SONG L.S.P., 1976. Early identification of superior barley crosses by the doubled haploid technique. *Z. Pflanzenzüchtg*, 76, 215-224.
- REINBERGS E. SONG L.S.P., CHOO T.M., KASHA K.J., 1978. Yield stability of double haploid lines of barley. *Can. J. Plant Sci.*, 58, 929-933.
- RIEGER R., 1957. Inhomologenpaarung und meioseablauf bei haploiden formen von *Antirrhinum majus* L. *Chomosoma*, 9, 1-38.
- RIGGS T.J., SNAPE J.W., 1977. Effects of linkage and interaction in a comparison of theoretical populations derived by diploidized haploid and single seed descent methods. *Theor. Appl. Genet.*, 49, 111-115.
- RILEY R., CHAPMAN V., 1957. Haploids and polyhaploids in *Aegilops* and *Triticum*. *Heredity*, 11, 195-207.
- ROBBELEN G.P., ABDEL-HAFEZ A.G., REINHOLD M., 1977. Use of mutants to study host/pathogen relations. p. 359-374. In *Induced mutations against plant diseases*, IAEA, Vienne 1977, Autriche.
- SADASIVAIAH R.S., KASHA K.J., 1971. Meiosis in haploid barley. An interpretation of non-homologous chromosome associations. *Chromosoma*, 35, 247-263.

- SADASIVAIAH R.S., KASHA K.J., 1973. Non-homologous associations of haploid barley chromosomes in the cytoplasm of *Hordeum bulbosum* L. *Can. J. Genet. Cytol.*, 15, 45-52.
- SAGER R., RAMANIS Z., 1973. The mechanism of maternal inheritance in *Chlamydomonas* : Biochemical and genetic studies. *Theor. Appl. Genet.*, 43, 101-108.
- SAN NOEUM L.H., 1976. Haploïdes d'*Hordeum vulgare* L. par culture in vitro d'ovaires non fécondés. *Ann. Amélior. Plantes*, 26, 751-754.
- SAN NOEUM L.H., AHMADI N., 1982. Variability of doubled haploids from in vitro androgenesis and gynogenesis in *Hordeum vulgare* L. p.273-283. In E.D. EARLE and Y. DEMARLY. *Variability in plant regenerated from tissue culture*. (sous presse).
- SCHAEFFER G.W., BAENZIGER P.S., WORLEY J., 1979. Haploid plant development from anthers and in vitro embryo culture of wheat. *Crop Science*, 19, 697-702.
- SEANEY R.R., 1955. Studies on monoploidy in maize. *Abstracts in dissertation*, 15, 187-188.
- SEARS E.R., 1939. Cytogénétique : studies with polyploid species on wheat. I. Chromosomal aberrations in the progeny of a haploid of *Triticum vulgare*. *Genetics*, 24, 509-523.
- SHIMADA T., 1981. Haploid plants regenerated from the pollen callus of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Jpn. J. Genet.*, 56, 581-588.
- SIBI M., DUMAS de VAULX R., CHAMBONNET D., 1980. Androgénèse in vitro chez le piment *Capsicum annuum* L. Impact des prétraitements sur le taux de plantes régénérées. p. 143-146ter. In *Application de la culture in vitro à l'amélioration des plantes potagères, Réunion Eucarpia section "Légumes"*, Versailles 1980, France.
- SIMPSON E., SNAPE J.W., FINCH R.A., 1980. Variation between *Hordeum bulbosum* genotypes in their ability to produce haploids of barley, *Hordeum vulgare*. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 85, 205-211.
- SIMPSON E., SNAPE J.W., 1981. Doubled haploid production in barley. *Ann. Rep.P.B.I. for 1980*, 76.
- SINGH B.D., SINGH Y., SINGH J., SINGH R.B., SINGH R.M., 1978. Meiotic irregularities induced by insecticide treatments in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Cytol. Genet.* 13, 125-128.
- SITBON M., 1981. Production of haploid *Gerbera jamesonii* plants by in vitro culture of unfertilized ovules. *Agronomie*, 1, 807-812.
- SNAPE J.W., 1976. A theoretical comparaison of diploidised haploid and single seed descent populations. *Heredity*, 36, 275-277.

- SNAPE J.W., 1982. The use of doubled haploids in plant breeding. p. 52-58. In *Induced variability in plant breeding, Intl. Symp. of the section mutation and polyploidy of the European Association for research on plant breeding, Eucarpia*, PUDOC, Wageningen 1981, Pays-bas.
- SNAPE J.W., CHAPMAN V., MOSS J., BLANCHARD C.E., MILLER T.E., 1979. The crossabilities of wheat varieties with *Hordeum bulbosum*, *Heredity*, 42, 291-298.
- SNAPE J.W., BENNETT M.D., SIMPSON E., 1980. Post pollination events in crosses of hexaploid wheat with tetraploid *Hordeum bulbosum*. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 85, 200-204.
- SNAPE J.W., SIMPSON E., 1981. The genetical expectations of doubled haploid lines derived from different filial generations. *Theor. Appl. Genet.*, 60, 123-128.
- SOKAL R.R., ROHLF F.J., 1981. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. FREEMAN, San Francisco, 2nd ed., 859p.
- SONG L.S.P., PARK S.J., REINBERGS E., CHOO T.M., KASHA K.J., 1978. Doubled haploid vs the bulk plot method for production of homozygous lines in barley. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 81, 271-280.
- SUBRAHMANYAM N.C., 1977. Haploidy from *Hordeum* interspecific crosses. 1. Polyhaploids of *H. parodii* and *H. procerum*. *Theor. Appl. Genet.*, 49, 209-217.
- SUBRAHMANYAM N.C., 1979. Haploidy from *Hordeum* interspecific crosses. Part 2 : Dihaploids of *H. brachyantherum* and *H. depressum*. *Theor. Appl. Genet.*, 55, 139-144.
- SUBRAHMANYAM N.C., 1980. Haploidy from *Hordeum* interspecific crosses. Part 3 : Trihaploids of *H. arizonicum* and *H. lechleri*. *Theor. Appl. Genet.*, 56, 257-263.
- SUBRAHMANYAM N.C., KASHA K.J., 1971. Increased barley haploid production following gibberellic acid treatment. *Barley Genetics Newsletter*, 1, 47-50.
- SUBRAHMANYAM N.C., KASHA K.J., 1973. Selective chromosomal elimination during haploid formation in barley following interspecific hybridization. *Chromosoma*, 42, 111-125.
- SUBRAHMANYAM N.C., KASHA K.J., 1975. Chromosome doubling of barley haploids by nitrous oxide and colchicine treatments. *Can. J. Genet. Cytol.*, 17, 573-583.
- SUNDERLAND N., 1979. Anther and pollen culture 1974-1979, p. 171-183. In D.R. DAVIES and D.A. HOPWOOD. *The plant genome, Proc. 4th John Innes Symp.*, Norwich, Grande Bretagne.

- SYMKO S., 1969. Haploid barley from crosses of *Hordeum bulbosum* (2x) X *H. vulgare* (2x). *Can. J. Genet. Cytol.*, 11, 602-608.
- SZIGAT G., WUSTRACK C., 1976. Fertile artbastarde bei gerste (*Hordeum bulbosum* x *H. vulgare*). *Arch. Züchtungsforsch.*, 4, 287-300.
- SZIGAT G., WUSTRACK C., 1979. Über weitere arbeiten mit fertilen artbastarden bei gerste (*Hordeum bulbosum* x *H. vulgare*). *Tag. Ber., Akad. Landwirtsch. Wiss.*, 175, 217-221.
- THEVENIN L. 1969. L'haploidie en amélioration des plantes. *Le Sélectionneur français*, 7, 14-23.
- THIEBAUT J., KASHA K.J., 1977. Experiments on chromosome doubling of barley haploids with colchicine. *Barley Genetics Newsletter*, 7, 63-66.
- THIEBAUT J., KASHA K.J., 1978. Modification of the colchicine technique for chromosome doubling of barley haploids. *Can. J. Genet. Cytol.*, 20, 513-521.
- THIEBAUT J., KASHA K.J., TSAI A., 1979. Influence of plant development stage, temperature, and plant hormones on chromosome doubling of barley haploids using colchicine. *Can. J. Bot.*, 57, 480-483.
- THOMAS J.B., KALTSIKES P.J., GLENN ANDERSON R., 1980. Relation between wheat-rye crossability and seed set of common wheat after pollination with other species in the *Hordeae*. *Euphytica*, 30, 121-127.
- THOMPSON K.F., 1969. Frequencies of haploids in spring oil seed rape (*Brassica napus*). *Heredity*, 24, 318-319.
- TJIO J.H., HAGBERG A., 1951. Cytological studies of some X-ray mutants of barley. *An. Estac. Exp. Aula Dei*, 2, 149-167.
- TSUCHIYA T., 1962. Haploid plants in barley. *Chromosome Information Service*, 3, 14-15.
- TSUCHIYA T., SHAHLA A., 1982. Chromosome constitutions in the progenies of haploid initiator mutant, hap/hap homozygote in barley. *Barley Genetics Newsletter*, 12, 34.
- TSUNEWAKI K., RYU ENDO T., MUKAI Y., 1974. Further discovery of alien cytoplasm inducing haploids and twins in common wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 45, 104-109.
- TULECKE W., 1964. A haploid tissue culture from the female gametophyte of *Ginkgo biloba*. *Nature*, 203, 94-95.
- TULEEN N.A., 1973. Karyotype analysis of multiple translocation stocks of barley. *Can. J. Genet. Cytol.*, 15, 267-273.

- TURCOTTE E.L., FEASTER C.V., 1974. Methods of producing haploids : semi-gametic production of cotton haploids. p. 53-64. In K.J. KASHA. *Haploids in plant breeding, Advances and potential, Proc. 1st Intl. Symp.*, Guelph, Canada.
- TURCOTTE P., ST-PIERRE C.A., HO K.M., 1980. Comparaison entre des lignées pédigrees et des lignées haploïdes doublées chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.). *Can. J. Plant Sci.*, 60, 79-85.
- UCHIMIYA H., KAMEYA T., TAKAHASHI N., 1971. In vitro culture of unfertilized ovules in *Solanum melongena* and ovaries in *Zea mays*. *Jpn. J. Breed.*, 21, 247-250.
- WALSH E.J., 1974. Efficiency of the haploid method of breeding autogamous diploid species : A computer simulation study. p. 195-209. In K.J. KASHA. *Haploids in plant breeding, Advances and potential, Proc. 1st Intl. Symp.*, Guelph, Canada.
- WENZEL G., 1980. Recent progress in microspore culture of crop plants. p. 185-196. In D.R. DAVIÈS and D.A. HOPWOOD. *The plant genome, Proc. 4th John Innes Symp.*, Norwich, Grande Bretagne.
- WENZEL G., HOFFMAN F., THOMAS E., 1977. Increased induction and chromosome doubling of androgenetic haploid rye. *Theor. Appl. Genet.*, 51, 81-86.
- WENZEL G., UHRIG H., 1981. Breeding for nematode and virus resistance in potato via anther culture. *Theor. Appl. Genet.*, 59, 333-340.
- WHEATLEY W.G., KASHA K.J., 1982a. Effects of cycloheximide treatments on prophase and metaphase cells of a (2X) *Hordeum vulgare* x (2X) *Hordeum bulbosum* hybrid. *Barley Genetics Newsletter*, 12, 72-74.
- WHEATLEY W.G., KASHA K.J., 1982b. Chromosome elimination in bi-nucleate cell of a (2X) *H. vulgare* x (2X) *Hordeum bulbosum* hybrid. *Barley Genetics Newsletter*, 12, 74-77.
- WINKLE M.E., KIMBER G., 1976. Colchicine treatment of hybrids in the *Triticinae*. *Cereal Research. Comm.*, 4, 317-320.
- XU Z.H., HUANG B., SUNDERLAND N., 1982. Recent advances in barley anther culture. p. 137. In *4th Intl. barley genetics symp. (abstracts)* Edinburgh 1981, Grande Bretagne.
- YASUDA S., 1940. A preliminary note on the artificial parthenogenesis induced by application of growth promoting substance. *Bot. Mag.*, 54, 306-310.
- YEFEIKIN A.R., VASILEV B.I., 1936. Obtention artificielle d'haploïdes chez *Triticum durum* avec du pollen irradié aux rayons X. *Bull. Appl. Bot. Genet. and Plant Breed.*, 2, 39-45.

- YOSHIDA H., YAMAGUCHI H., 1973. Arrangement and association of somatic chromosomes induced by chloramphenicol in barley. *Chromosome*, 43, 399-307.
- ZAPATA F.J., TORRIZO L.B., ROMERO R.O., ALEJAR M.S., 1983. Androgenesis in *Oryza sativa*. p. 531-532. In A. FUJIWARA. *Plant tissue culture 1982, Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, Tokyo 1982, Japon.
- ZADOKS J.C., CHANG T.T., KONZAK C.F., 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.*, 14, 415-421.
- ZENKTELER M., STRAUB J., 1979. Cytoembryological studies on the process of fertilization and the development of haploid embryos of *Triticum aestivum* L. (2n=42) after crossing with *Hordeum bulbosum* (2n=14). *Z.Pflanzenzüchtg*, 82, 36-44.
- ZHONGEHUN Z., HAISHAN W., 1979. In vitro production of haploid plantlets from the unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* and *Nicotiana tabacum*. *Acta Genet. Sinica*, 6, 181-184. (en chinois avec résumé en anglais).

RESUME :

La méthode de production d'haploïdes doublés d'orge par croisement interspécifique entre *Hordeum vulgare* et *H. bulbosum* a été adaptée dans le cadre d'un schéma de sélection d'orges d'hiver 2 rangs et 6 rangs. La technique a été améliorée en recherchant les meilleures souches d'*H. bulbosum* pour leur aptitude à induire des haploïdes. Un système de croisement diallèle a été réalisé entre plantes de 50 lignées d'orge d'hiver (F2 à F5) et plantes de 8 souches d'*H. bulbosum* de provenance géographique différente. Les pourcentages de réussite aux différents stades de la méthode (nouaison, embryons différenciés, plantes haploïdes repiquées, plantes haploïdes doublées) sont relevés. L'aptitude à la nouaison ayant été démontrée comme facteur limitant pour le rendement en plantes haploïdes, l'analyse factorielle des correspondances appliquées aux taux de nouaison permet de retenir 4 souches d'*H. bulbosum* comme bonnes productrices d'haploïdes. Celles-ci sont ensuite testées en faisant la pollinisation en mélange des 4 pollens dont la complémentarité est ainsi démontrée pour la production à grande échelle d'haploïdes doublés. Parallèlement des conditions optimales d'expérimentation ont été mises en évidence, qui résident dans la méthode de castration, le type de milieu de culture et la saison du croisement.

Des résultats de l'expérimentation, il ressort que les orges d'hiver à 6 rangs sont plus difficiles à "haploïdiser" que les orges d'hiver à 2 rangs, cette difficulté voit son origine dans une incompatibilité plus marquée en croisement avec *H. bulbosum*.

Tout au long du travail, le matériel est analysé sur le plan caryologique : caryotype des parents, *H. vulgare* et *H. bulbosum*, de l'hybride, de l'haploïde et de l'haploïde doublé ; les modes d'appariement à la méiose de l'haploïde et de l'hybride; mises en évidence de l'élimination des chromosomes d'*H. bulbosum* dans les cellules de l'embryon ; test par la technique du banding de la présence des seuls chromosomes d'*H. vulgare* dans l'haploïde doublé.

MOTS CLEF : -HAPLOIDE
-HETEROCHROMATINE
-BANDES - C
-HORDEUM VULGARE
-HORDEUM BULBOSUM