

50376  
1989  
69

50376  
1989  
69

# T H E S E

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

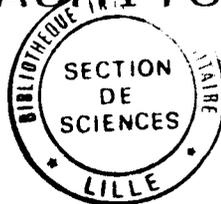
pour obtenir le grade de

DOCTEUR

mention: Biologie et Génétique des Populations

par

PIERRE SAUMITOU-LAPRADE



*De la stérilité mâle à la gynodioecie chez Beta maritima L.  
Aspects génétiques et moléculaires*



Soutenue le 2 Juin 1989, devant la Commission d'examen:

R. JEAN,	Président, Directeur de Recherche
Ph. GOUYON,	Rapporteur
F. VEDEL,	Rapporteur
G. MICHAELIS	Examineur
B. BADUFLE	Examineur
J. CUGUEN	Examineur
Ph. VERNET	Examineur

## SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	.....
CHAPITRE I.: LA STERILITE MALE ; ASPECTS GENETIQUES.....	.....
A.- LA STERILITE MALE CHEZ LES PLANTES SUPERIEURES.....	.....
1. La stérilité mâle nucléaire.....	.....
a) Le contrôle génétique.....	.....
b) Les différents types de stérilité mâle et les sites de blocage des gènes.....	.....
c) L'évolution du tapis.....	.....
d) La sensibilité à l'environnement.....	.....
2. La stérilité mâle nucléocytoplasmique.....	.....
a) Le contrôle génétique.....	.....
b) Les différents types de stérilité.....	.....
c) L'action des gènes cytoplasmiques: à quelles étapes interviennent-ils?.....	.....
d) Le développement du tapis nourricier.....	.....
3. Stérilité mâle nucléaire, stérilité mâle nucléocytoplasmique, quelles différences?.....	.....
a) Résumé des ressemblances et des différences des deux types de stérilité mâle.....	.....
b) La diversité phénotypique intra descendance de la CMS.....	.....
B.- ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE DU DETERMINISME GENETIQUE DE LA STERILITE MALE CHEZ BETA.....	.....
1. Les phénotypes sexuels observés.....	.....
2. Le déterminisme génétique de la stérilité mâle chez <i>Beta vulgaris</i> .....	.....
a) Analyse critique des modèles génétiques proposés.....	.....
b) Points clé pour un modèle génétique chez <i>Beta vulgaris</i> .....	.....
3. Le déterminisme génétique de la stérilité mâle chez <i>Beta maritima</i> .....	.....
a) Analyse de la bibliographie.....	.....
b) Etude au laboratoire de Lille.....	.....
c) Résultats et discussion.....	.....
C.- CONCLUSION.....	.....

CHAPITRE II.: LES BASES MOLECULAIRES DE LA STERILITE MALE  
ET LA VARIABILITE CYTOPLASMIQUE CHEZ BETA.....

A.- LES BASES MOLECULAIRES DE LA STERILITE MALE CHEZ  
LES PLANTES SUPERIEURES.....

1. Organisation du génome chloroplastique.....

2. Caractéristiques de l'information mitochondriale.....

a) Organisation de l'information mitochondriale.....

b) Variation de la structure secondaire et  
conservation de la séquence primaire du mtDNA;  
ou comment générer de la nouveauté en préservant  
ses gènes?.....

3. Localisation des gènes cytoplasmiques de la stérilité  
mâle dans la mitochondrie.....

4. La stérilité mâle sur le cytoplasme T du maïs.....

a) Fonctionnement de la stérilité mâle sur le  
cytoplasme T du maïs.....

b) Limites de l'analyse de la structure moléculaire  
du mtDNA en relation avec la stérilité mâle.....

B.- LE POLYMORPHISME CYTOPLASMIQUE CHEZ BETA MARITIMA.....

1. Problématique.....

2. Résultats. Discussion.....

a) Linear 10.4 Kb plasmid in the mitochondria of  
*Beta maritima*  
Pannenbecker G, Saumitou-Laprade P, Haggonta F,  
Jean R, Michaelis G.....

b) CMS in *Beta ssp.*: mitochondrial variability in  
populations revealed by Southern blot analysis  
Saumitou-Laprade P, Rouwendal G, Cuguen J, Krenez F,  
Michaelis G.....

c) Chloroplast DNA polymorphism within and among  
populations of *Beta maritima*.  
Saumitou-Laprade P, Pannenbecker G, Vernet Ph,  
Michaelis G.....

C.- CONCLUSION.....

CONCLUSION GENERALE - BILAN ET PERSPECTIVES.....



## INTRODUCTION

La variabilité des systèmes de la reproduction des êtres vivants a été observée et décrite depuis Darwin (1877). Le constat de cette variabilité a suscité, plus récemment, la mise en place de toute la problématique de l'évolution du sexe (Williams 1975, Maynard-Smith 1978, Charnov 1982, Stearns 1987, Michod et Levin 1988). Les mécanismes et les stratégies de la reproduction sont multiples et la question se pose de connaître pourquoi une espèce choisit une voie plutôt qu'une autre pour se reproduire.

Parmi les espèces végétales pratiquant la reproduction sexuée, différentes voies sont utilisées pour la transmission de l'information génétique, depuis l'hermaphroditisme: c'est-à-dire la présence dans la même fleur des organes mâles et femelles (Yampolsky 1922, Bawa 1980, Charnow 1982), à la dioecie, c'est-à-dire la reproduction entre individus portant des fleurs mâles et des individus portant des fleurs femelles. Il existe également, dans la nature, des espèces qui présentent un système de reproduction mixte: la gynodioecie. Elle se caractérise par la présence simultanée, en population naturelle, de plantes femelles (encore appelées mâle-stériles) et de plantes hermaphrodites (encore appelées mâle-fertiles).

La question posée par la gynodioecie est de comprendre comment des individus mâle-stériles, qui ne transmettent leurs

gènes que par la voie femelle, sont capables de se maintenir à haute fréquence face à des individus hermaphrodites qui les transmettent, à la fois par la voie femelle et la voie mâle. Dans ce contexte, le handicap des mâle-stériles est évident: comment, dans ces conditions, la sélection a-t-elle pu jouer en faveur de la perte d'une fonction essentielle dans la transmission de l'information héréditaire?

Il existe différentes approches du paradoxe de la stérilité mâle. La première, c'est de considérer les espèces gynodioïques intermédiaires entre l'hermaphroditisme et la dioecie (Darwin 1877, Ross 1970, Lloyd 1974, Amago et Raven 1975). Dans ce cas la gynodioecie apparaît comme un passage "obligé" et transitoire, entre une situation d'équilibre (l'hermaphroditisme) et une autre situation d'équilibre (la dioecie): dans ce cas la question est de déterminer les termes du passage de l'hermaphroditisme à la gynodioecie et de la gynodioecie à la dioecie. Une seconde manière d'aborder la gynodioecie est de la considérer en temps que système stable à part entière dans lequel femelles et hermaphrodites peuvent se maintenir durablement (Van Damme et Van Delden 1984). La question de la gynodioecie conduit alors à s'intéresser aux mécanismes d'apparition et de maintien de la stérilité mâle dans les populations gynodioïques.

- L'étude de l'apparition de la stérilité mâle, nécessite d'étudier le déterminisme génétique qui conduit à l'expression du phénotype mâle-stérile. Elle suggère les questions suivantes: quels évènements génétiques, moléculaires, permettent

l'apparition de la stérilité mâle? Peut-t-on choisir entre un déterminisme nucléaire et un déterminisme nucléocytoplasmique. Dans le cas d'un déterminisme nucléocytoplasmique est-il possible de déterminer le nombre et le type de gènes impliqués dans la stérilité mâle, leur localisation et les mécanismes moléculaires qui peuvent conduire à la stérilité de la voie mâle?

D'un point de vue évolutif, la mise en évidence de l'intervention des gènes cytoplasmiques comme facteur déterminant la stérilité mâle permet d'affranchir l'existence de la gynodioecie de toute considération "magique" et de la situer dans la logique d'un phénomène de sélection naturelle. En effet, la mise en cause des gènes cytoplasmiques, comme facteurs responsables de la stérilité mâle permet de comprendre pourquoi il peut y avoir au niveau génétique sélection de ce phénomène. La sélection contre les gènes bloquant la voie mâle ne peut se faire qu'au niveau d'un compartiment génétique empruntant la voie mâle. Dans le cas de la stérilité mâle nucléocytoplasmique, les gènes déterminant la stérilité sont cytoplasmiques et ne sont transmis que par la voie femelle: ils ne sont donc pas contre-sélectionnés. De même, au niveau de l'information nucléaire transmise par les voies mâles et femelles, il est facile de comprendre la sélection en faveur des gènes de restauration de la fertilité mâle (Gouyon et Couvet 1985). Cette vision de la stérilité mâle à travers le conflit de chaque compartiment génétique cherchant à optimiser sa fitness (Cosmides et Tooby 1980) permet d'envisager la gynodioecie comme système de reproduction stable, dans la mesure où, que cela nous plaise ou non, il arrive que des conflits puissent constituer un état

stable, et durent longtemps pour peu qu'il y ait intérêt à les faire durer...

- L'étude de la gynodioecie, en temps que système stable, conduit à étudier le maintien des mâle-stériles dans les populations, une fois qu'ils y sont apparus. Ce maintien suppose des mécanismes compensatoires dont disposent les femelles pour ne pas disparaître face aux hermaphrodites. Cela conduit à prévoir l'efficacité de ces mécanismes et à tester leur pertinence par l'utilisation de modèles mathématiques: dans le cadre d'une stérilité mâle sous contrôle nucléaire, les femelles doivent posséder un avantage supérieur ou égal à 2, dans la production de descendants) par rapport aux hermaphrodites (Lewis 1941, Valdeyron 1961, Maynard-Smith 1978), dans ce cas il n'est pas possible d'expliquer des pourcentages en femelles supérieurs à 50%, sauf dans le cas d'une survie différentielle (Van Damme et Van Damme 1986). Dans le cas d'un déterminisme nucléocytoplasmique les modèles expliquent les fréquences de mâle stériles élevées sans nécessiter d'avantages femelles très élevés, en faisant intervenir non seulement des réallocations de ressources mais aussi le coût de la restauration ainsi que des flux géniques limités entre populations (Delannay *et al.* 1981, Gouyon *et al.* 1985).

La stérilité mâle est connue et utilisée chez *Beta vulgaris* depuis les travaux de Owen (1942, 1945). La découverte de populations naturelles de *B.maritima* dans les estuaires de la Manche, avec des taux variables de femelles (0 à 60%) (Boutin *et*

al. 1987; Dufermond 1986) ) a permis au laboratoire de développer différentes voies de recherches dont les intérêts appliqués et fondamentaux ne manquent pas. L'intérêt appliqué est de disposer de nouvelles sources de stérilité mâle, pour éviter le risque lié à l'utilisation d'une source unique de stérilité mâle dans la production de betteraves sucrières. L'intérêt fondamental est de pouvoir étudier et tester les mécanismes génétiques et écologiques permettant l'existence et le maintien des plantes mâle-stériles, ainsi que leur évolution dans les populations naturelles.

L'étude de la dynamique de la stérilité mâle dans les populations, ainsi que l'étude de l'allocation des ressources aux fonctions de reproduction des différents phénotypes sexuels sont développées au laboratoire par Véronique Boutin-Stadler.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux aspects génétiques de la stérilité mâle chez *Beta maritima*. Les conditions sont particulièrement favorables, dans la mesure où il est intéressant d'étudier une espèce sauvage, donc "peu trafiquée" du point de vue génétique, tout en disposant des outils d'investigation du génome d'une espèce cultivée dont l'intérêt économique peut justifier le coût de mise au point de ces outils. Ainsi, l'objectif que nous pouvions donner à ce travail était d'accéder à l'information cytoplasmique par les méthodes de la biologie moléculaire afin d'en évaluer le polymorphisme, de le marquer dans un premier temps, pour dans un second temps mieux comprendre

- comment la stérilité mâle peut apparaître et s'exprimer chez un individu: le conflit nucléocytoplasmique qui suppose une "attitude" active du génome cytoplasmique face à l'information nucléaire a-t-il une réalité au niveau moléculaire?

- comment l'information cytoplasmique est répartie dans les populations: quel est l'importance du polymorphisme cytoplasmique et peut-on le corrélér à des mécanismes qui concernent la stérilité mâle?

Nous aborderons, dans le chapitre 1, le déterminisme génétique de la stérilité mâle avec les moyens disponibles, c'est-à-dire les données acquises essentiellement sur les espèces cultivées. Ceci nous a permis de faire le point de ce qui est connu de la stérilité mâle chez *B.vulgaris* afin de pouvoir lui comparer celle de *B.maritima*. Enfin nous avons cherché à répondre à la question de la nature du déterminisme génétique de la stérilité mâle chez *Beta maritima*.

La prise en compte d'un déterminisme nucléocytoplasmique nous conduit au second temps de notre étude: le déterminisme nucléocytoplasmique suggère l'interaction de la composante nucléaire et de la composante cytoplasmique. Le chapitre 2 présente, tout d'abord, une revue de ce qui est connu, au niveau moléculaire, de l'interaction noyau/cytoplasme en lien avec la stérilité mâle, puis les résultats de notre étude des génomes cytoplasmiques dans les populations gynodioïques de *Beta maritima*. Nous avons pu caractériser le polymorphisme des différents génomes cytoplasmiques: au total 5 génotypes

mitochondriaux, 3 géotypes chloroplastiques et la présence ou l'absence d'un plasmide mitochondrial linéaire de 10.4 Kb. La distribution de ce polymorphisme dans les populations ainsi que sa relation à la stérilité mâle sont présentées, sa signification est abordée dans le cadre du conflit nucléocytoplasmique.



## CHAPITRE I:

### LA STERILITE MALE: ASPECTS GENETIQUES

#### A.- LA STERILITE MALE CHEZ LES PLANTES SUPERIEURES.

La stérilité mâle d'origine génétique peut être classée en trois grandes catégories selon le type de contrôle génétique qui la détermine: la stérilité mâle nucléaire ou stérilité mendélienne pour laquelle le noyau agit seul sur la fonction mâle, la stérilité cytoplasmique dans laquelle les descendants de plantes femelles seront exclusivement femelles quelle que soit l'information nucléaire, et la stérilité nucléocytoplasmique ou CMS (abréviation de l'expression anglaise Cytoplasmic Male Sterility). Dans ce cas la stérilité mâle est le résultat de l'interaction des génomes nucléaires et cytoplasmiques. La stérilité mâle cytoplasmique, observée dans quelques cas de croisements interspécifiques, par fusion de protoplastes, ne sera pas développée dans la suite de ce chapitre.

#### 1. LA STERILITE MALE NUCLEAIRE.

La stérilité mâle nucléaire est surtout documentée dans le cas des espèces cultivées car, en population, les conditions pour son maintien nécessitent des mécanismes de compensation

importants en faveur des plantes femelles (Lewis 1941).

La stérilité mâle nucléaire ou stérilité mendélienne apparaît très fréquemment de façon spontanée à l'intérieur d'une même espèce. Elle a été observée et étudiée dans environ 175 espèces différentes dont la majorité sont des dicotylédones. Le nombre de gènes connus pour provoquer ce phénomène est extrêmement élevé dans certains cas, et ce, à l'intérieur même de l'espèce. C'est le cas par exemple pour plusieurs plantes cultivées: chez le maïs on compte jusqu'à 60 gènes différents, capables de provoquer la stérilité mâle, chez la tomate 55, chez l'orge 48 (voir pour revue Kaul, 1987). On observe également des variants alléliques au même locus: chez le soja, 4 allèles ont été identifiés au locus *ms1* (Palmer *et al.*, 1976; 1978).

Chez un grand nombre d'espèces la présence de nombreux gènes nucléaires de stérilité mâle est observée dans des variétés en cours d'amélioration. Une telle accumulation s'explique, entre autres, par la fréquence élevée d'apparition des gènes de stérilité mâle: chez la tomate, on considère que la fréquence d'apparition d'un mutant mâle-stérile est de  $2 \cdot 10^{-4}$  (Rick, 1945), chez "lima bean", elle est estimée à  $5 \cdot 10^{-5}$  (Allard, 1953).

Les croisements interspécifiques ne génèrent la stérilité mâle nucléaire qu'à un taux extrêmement faible: la plupart du temps ce type de croisement conduit à de la stérilité nucléocytoplasmique.

a) Le contrôle génétique.

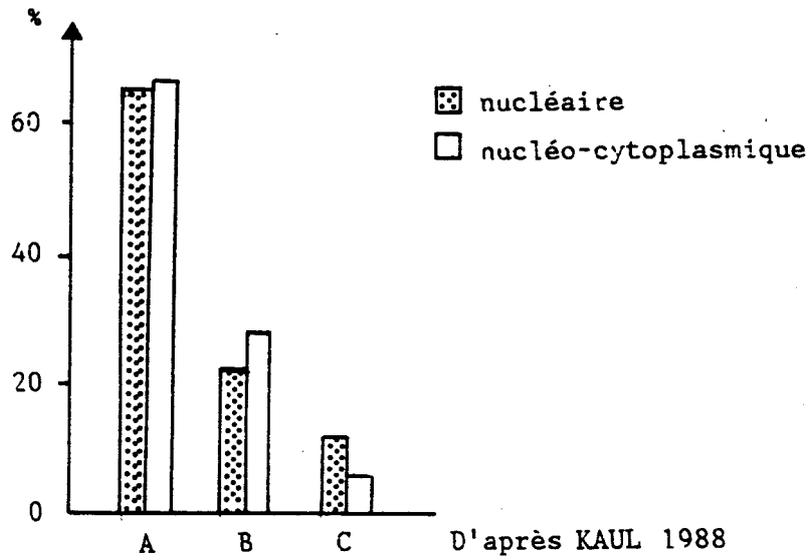
Parmi les différents cas de stérilité mâle étudiés (répartis entre 175 espèces), le contrôle génétique est majoritairement monogénique récessif (50% des cas) et les cas de déterminisme dominant de la stérilité sont extrêmement rares (2%). Dans un très grand nombre de cas, le mode d'action des gènes n'est pas connu. Les cas de déterminisme oligogénique sont rares mais possibles: chez *Daucus carota* (Hansche et Gabelman, 1963 a,b) et *Phaseolus vulgaris* (Mustchler et Bliss, 1980) il y a, pour certains cas de stérilité mâle, action simultanée d'un gène récessif et d'un gène dominant. Chez *Medicago sativa* une stérilité mâle, sous contrôle de trois gènes nucléaires, a été observée (Childers et Mc Lennan, 1960).

b) Les différents types de stérilité mâle et les sites de blocage des gènes.

Qu'il s'agisse de la stérilité mâle nucléaire ou de la stérilité mâle nucléocytoplasmique, il est possible de différencier trois types de perturbations, pouvant entraîner cette stérilité mâle (fig 1.1).

- Un premier type, appelé sporogène, concerne toutes les mutations intervenant dans le déroulement de la microsporogénèse, c'est-à-dire, depuis les premiers stades de la méiose, jusqu'à la formation des microspores. Les blocages décrits peuvent se situer très tôt dans la méiose (la plupart des gènes ms de stérilité mâle sont actifs sur

Figure 1.1. : Fréquences des différents types de stérilité mâle : sporogène (A), structurale (B), fonctionnelle (C) dans les stérilités nucléaire et nucléo-cytoplasmique.



la prophase I) ou plus tard, au cours des différentes étapes de la formation des microspores.

- Un second type de modifications, appelé structural ou histologique, concerne toutes les anomalies anatomiques des organes de reproduction mâles; ceux-ci peuvent être absents ou mal formés (Gottschalk et Kaul, 1974), ou présents: dans ce cas la formation du tissu sporogène est inhibée (Hafen et Stevenson, 1958) ou la microsporogénèse n'est pas déclenchée (Gottschalk, 1976). Dans le cas de la stérilité de type structural, le moment du blocage peut se situer très tôt, dans le processus de développement de l'étamine, et conduire à des étamines absentes, rudimentaires, entièrement modifiées ou partiellement modifiées (anthères pétaloïdes, stigmoïdes ou carpelloïdes).
- Un troisième type de modifications pouvant entraîner la stérilité mâle, concerne les mutations conduisant à une stérilité mâle fonctionnelle; dans ce cas la microsporogénèse est normale: le développement de la microspore, aboutit à un grain de pollen bien constitué, (cellule végétative et cellule reproductrice fonctionnelles) mais ce pollen est incapable de germer. Dans d'autres cas, il s'agit de stérilité, due à la non déhiscence de l'anthère ou la non formation de l'exine.

c) L'évolution du tapis nourricier.

Le tapis nourricier est un organe essentiel pour la formation des grains de pollen. Il assure une fonction nourricière des

méiocytes, en leur apportant différentes enzymes, hormones et tous les éléments nutritifs. Le développement normal du tapis suit, généralement, les étapes suivantes: au début de l'androgénèse, les cellules du tapis s'individualisent dans le tissu méristématique qui deviendra l'anthère. Elles restent longtemps soudées au tissu sporogène qu'elles entourent. En début de prophase réductionnelle, elles augmentent considérablement de volume, elles dégènèrent généralement en fin de stade tétrade quand les microspores se séparent, par dissolution de la paroi du méiocyte. La dégénérescence des cellules du tapis se traduit par l'apparition de structures granulaires, dans le cytoplasme: le noyau perd ses granulations chromatiques et diminue progressivement de taille, et son enveloppe finit par se dissoudre. A la déhiscence de l'anthère, le tapis forme une couche de cellules mortes, réduites à leur paroi cellulaire.

Trois grands types de comportement du tapis ont été observés chez les plantes mâle-stériles (Fig 1.2).

- Un développement normal du tapis: chez de nombreuses espèces, le développement du tapis, sa différenciation et sa désintégration sont identiques à ce que l'on observe chez les mâle-fertiles. Dans ce cas, les gènes de stérilité, impliqués dans la microsporogénèse, peuvent agir à n'importe quel stade de celle-ci (Fig 1.3A). Cependant la majorité des blocages (40%) se font au stade tétrade.
- Un développement anormal du tapis: ici la stérilité tient à l'impossibilité, pour les microspores, d'utiliser les ressources présentes dans le tapetum. Le développement

Figure 1.2.: Fréquences des types d'évolution du tapis nourricier dans les stérilités mâles nucléaire et nucléo-cytoplasmique: développement du tapis normal (A), anormal (B) et persistant (C).

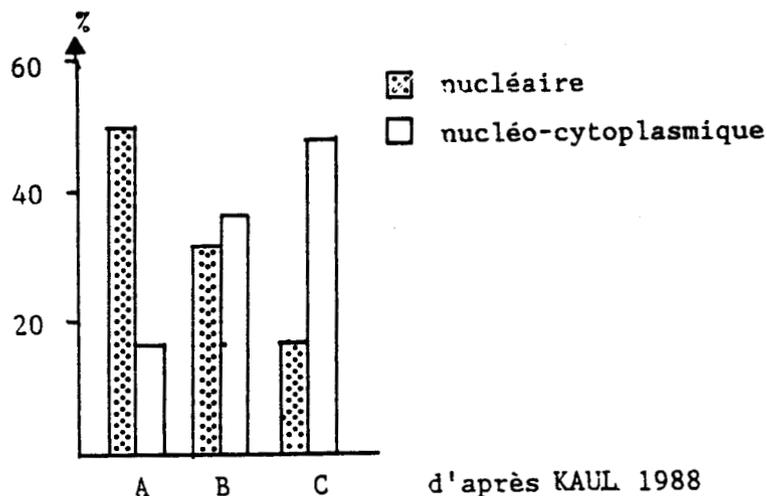
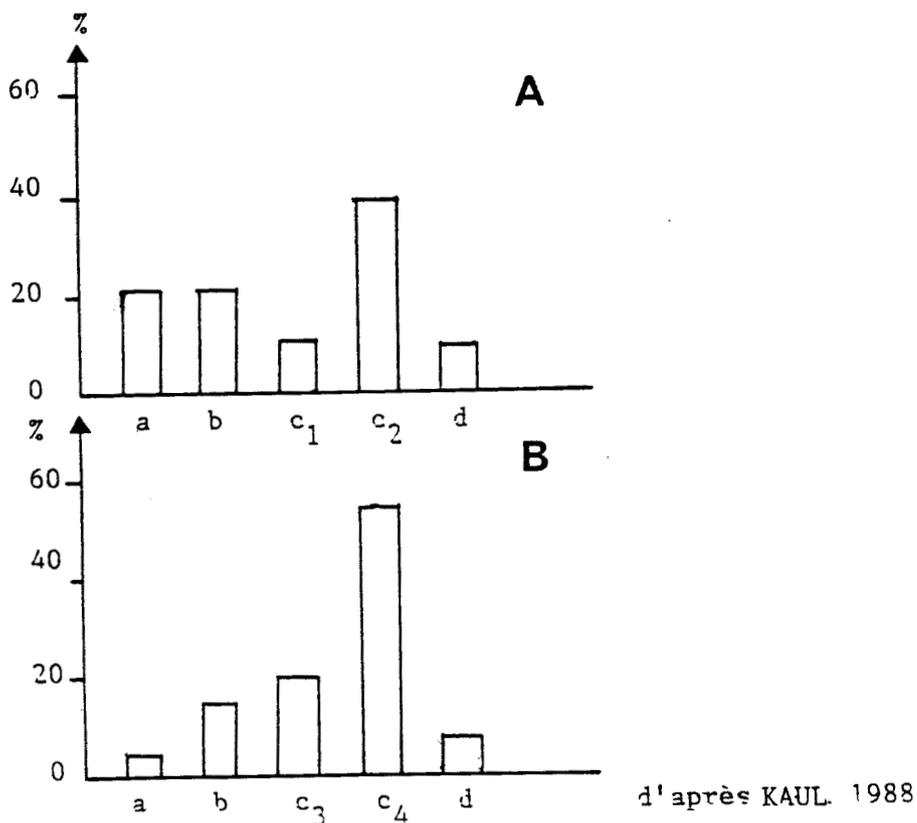


Figure 1.3.: Fréquences des espèces male-stériles suivant les stades d'action des gènes dans la stérilité mâle nucléaire dans le cas de développement normal (A) et anormal (B) du tapis: blocage en préméiose (a), prophase I (b), méiose I et II (c<sub>1</sub>), lors de la formation de la microspore (c<sub>2</sub>), ou des tétrades (c<sub>3</sub>), à la libération des microspores (c<sub>4</sub>), maturation du pollen (d).



anormal du tapis peut être la cause de cette incapacité ou au contraire, c'est l'incapacité des microspores (pour des raisons diverses) à utiliser les réserves accumulées dans le tapis, qui entraîne le développement anormal du tapis. Dans ce cas près de 60% des blocages de la microsporogénèse se font au moment de la séparation des microspores (Fig.1.3.B).

- Un développement persistant du tapis: le tapis peut persister jusqu'à la fin de la formation des microspores, parfois même après leur avortement.

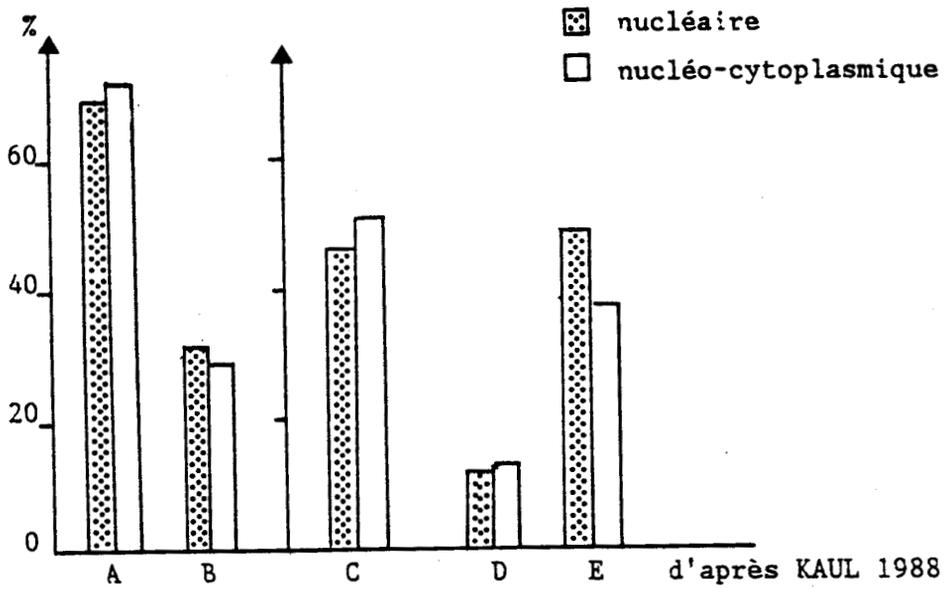
d) La sensibilité à l'environnement.

Dans 75% des cas, les gènes impliqués dans la stérilité mâle nucléaire, sont sensibles à l'environnement (Fig 1.4). Parmi les gènes sensibles, environ 45% réagissent à la température et plus de 10% à la photopériode. Il faut néanmoins noter que pour 40% des cas de stérilité nucléaire, la sensibilité à l'environnement est reconnue, mais le ou les facteurs environnementaux responsables, ne sont pas identifiés.

## 2. LA STÉRILITÉ MÂLE NUCLÉOCYTOPLASMIQUE

La stérilité mâle nucléocytoplasmique (CMS), a été observée dans différents cas: sur 320 espèces où elle a été identifiée, son apparition est considérée comme résultant d'une différenciation intraspécifique (25% des cas), ou de croisements interspécifiques (75% des cas), parmi lesquels figurent des

Figure 1.4.: Fréquence des espèces male-stériles sensible (A) ou non sensible (B) aux facteurs environnementaux dans les stérilités mâles nucléaire et nucléo-cytoplasmique. Parmi les sensibles, sensibilité à la température (C), à la photopériode (D), sensibilité observée mais facteur environnemental inconnu (E).



croisements intergénériques. Les croisements entre espèces différentes seraient donc la principale source de CMS, en amélioration des plantes.

a) Le contrôle génétique.

De nombreux auteurs parlent, dans le cas de la CMS, de gènes de stérilité nucléaire. Cependant si l'on considère l'interaction cytoplasme/noyau, il est plus logique de parler de gène de stérilité cytoplasmique, en référence à la ou aux mutations mitochondriales qui ont provoqué la stérilité mâle, et de gènes nucléaires de restauration de la fertilité, qui compensent, rectifient ou annulent, les effets de la mutation cytoplasmique.

Dans ce cadre, on considère que les processus de restauration sont dominants pour trois quart des cas (dont 30% à contrôle monogénique et 40% à contrôle oligogénique), et récessifs pour un quart des cas (dont 24% à contrôle monogénique et 6% à contrôle polygénique).

b) Les différents types de stérilité.

Les trois grands types de stérilité, décrits dans le cas de la stérilité mâle nucléaire, se retrouvent avec des proportions comparables pour la CMS (Fig 1.1).

- La stérilité qui bloque la sporogénèse, représente la majorité des cas observés (68%). Le blocage peut se produire depuis les stades préméiotiques, jusqu'aux stades

les plus tardifs de la formation du pollen: des cas de blocage de la mitose pollinique ont été décrits chez des espèces, comme *Petunia* (Izhar, 1977) ou *Beta vulgaris* (Kinoshita, 1980).

- La stérilité structurale est observée dans 26% des cas et peut s'exprimer de différentes façons: depuis l'absence complète d'étamine, jusqu'à une mauvaise formation de l'anthère.
- La stérilité fonctionnelle constitue, là encore, le cas de figure le moins représenté (6%).

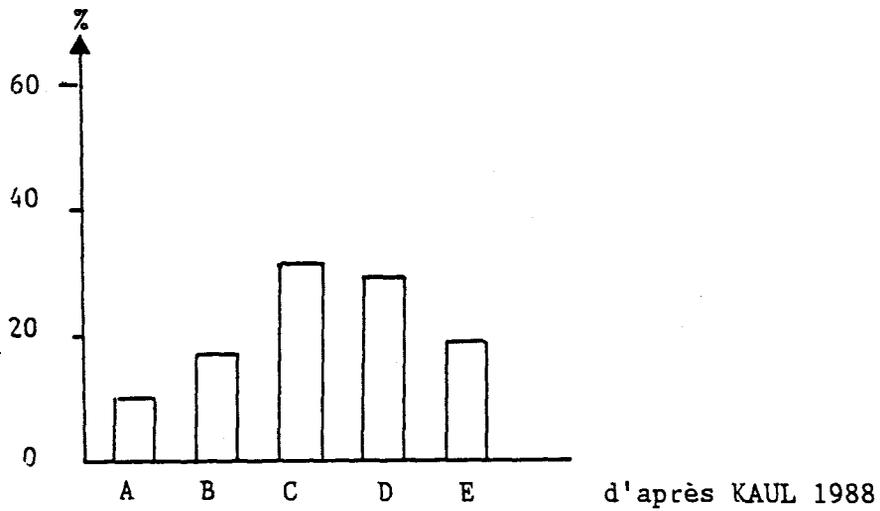
c) L'action des gènes cytoplasmiques de stérilité: à quelles étapes interviennent-ils?

Les stades d'action des gènes sont très variables (fig 1.5), selon les espèces, ou même, selon les individus d'une même espèce (Hanson et Conde, 1985).

Dans les 245 cas de CMS consécutifs à un croisement interspécifique, l'action des gènes cytoplasmiques de stérilité se situe, pour 40% seulement, pendant la microsporogénèse, la majorité agissant soit en prophase I, soit pendant la maturation des microspores. Si la CMS apparaît après un croisement intraspécifique, le stade privilégié de blocage se situe durant la méiose (pour revue voir Kaul, 1988 p128, 129, 130).

Parfois, pour un même cytoplasme, les modes de blocage peuvent différer en fonction du génotype nucléaire, ce qui

Figure 1.5.: Fréquence des espèces à stérilité mâle nucléocytoplasmique suivant les stades d'action des gènes: blocage en préméiose (A), en prophase I (B), pendant la formation des microspores (C), pendant le développement de la microspore (D), pendant la formation du pollen (E).



suggère l'existence de plusieurs génotypes femelles. Par exemple chez le trèfle rouge (Kaul, 1988), deux lignées CMS sur le même type cytoplasmique ont été isolées: chez l'une, la dégénérescence de la mitochondrie dans la microspore, entraîne la destruction du noyau, chez l'autre, c'est l'inverse: la dégénérescence du noyau entraîne la disparition des mitochondries.

Le stade qui suit la libération des microspores constitue une étape critique, où la plupart des gènes de restauration semblent lever des blocages: au moment où les microspores deviennent indépendantes, au moment où le sporoderme se forme, et au moment de la première mitose pollinique.

d) Le développement du tapis nourricier.

Dans le cas de la CMS, on retrouve les mêmes possibilités d'évolution du tapetum, que pour la stérilité mâle nucléaire, mais avec des fréquences différentes (Fig 1.2): un développement normal (16%), anormal (35%) ou persistant (43%).

Un même mode de développement du tapis peut dépendre de déterminismes nucléocytoplasmiques différents: par exemple le développement anormal du tapis se rencontre dans les trois stérilités T, C et S, décrites chez le maïs (Duvick, 1965; Beckett, 1971), avec quelques variantes dans l'expression. Sur le cytoplasme T, le tapis présente un développement anormal (destruction des mitochondries), après l'initiation de la méiose; sur le cytoplasme C, le tapis est persistant, c'est-à-dire qu'il

ne se détruit pas en cédant ses substances nutritives aux microspores; enfin, sur le cytoplasme S, le développement est normal jusqu'à un stade tardif du développement des microspores, puis devient anormal.

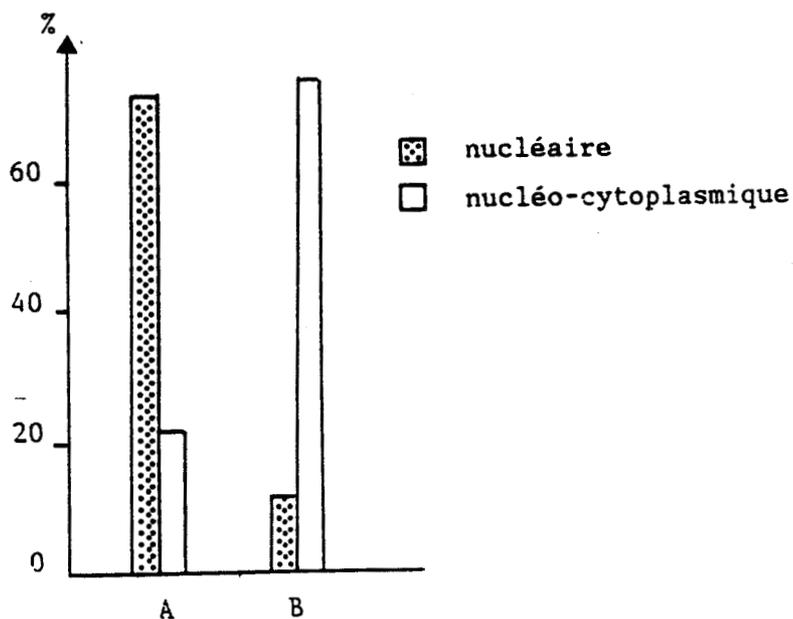
3. STERILITE MALE NUCLEAIRE, STERILITE MALE NUCLEO-CYTOPLASMIQUE, QUELLES DIFFERENCES?

Ce qui frappe, à l'issue de cette étude comparative des stérilité mâles nucléaires et nucléocytoplasmiques, c'est l'extrême diversité des processus cytologiques aboutissant au phénotype mâle-stérile, et la multiplicité des sites de blocage de la sporogénèse. Les trois types de stérilité: structurale, fonctionnelle ou touchant à la sporogénèse, se rencontrent, quelles que soient la stérilité en jeu et la diversité du contrôle génétique. Dans cette diversité, est-il possible de trouver des différences spécifiques de chaque type de stérilité?

a) Résumé des ressemblances et des différences des deux types de stérilité mâle.

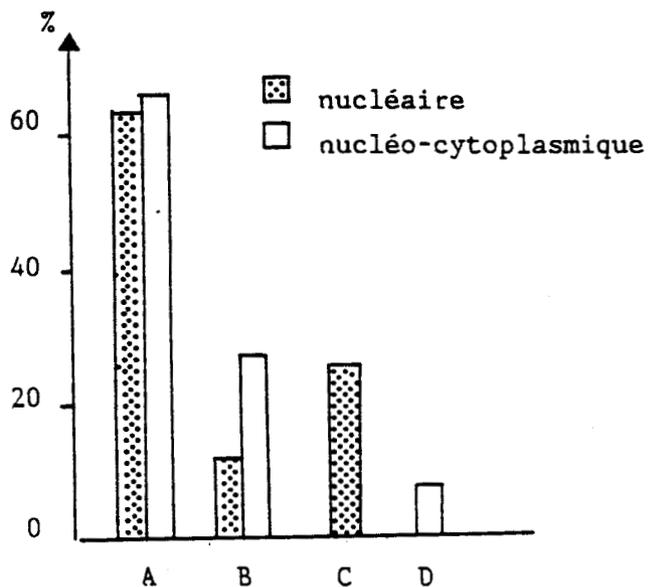
En ce qui concerne l'origine de la stérilité mâle, on rencontre des stérilité mâles nucléaires et nucléocytoplasmiques à l'issue de croisements intra et inter-spécifiques (Fig 1.6). Cependant, la stérilité mâle nucléocytoplasmique est majoritairement signalée dans le cas de croisements interspécifiques, alors que la stérilité nucléaire est majoritairement d'origine intraspécifique.

Figure 1.6.: Fréquences des stérilités males nucléaire et nucléo-cytoplasmique selon leur origine: intraspécifique (A), interspécifique (B).



d'après KAUL, 1988

Figure 1.7.: Fréquence des stérilités nucléaire et nucléo-cytoplasmique selon les contrôles génétiques comparés de la restauration de la fertilité mâle: 1 gène dominant de restauration identifié (A), 1 gène récessif (B), plusieurs gènes dominant indépendants (C), contrôle polygénique (D).



d'après KAUL 1988

Les types de stérilité sont les mêmes (fig 1.1): il existe, dans chaque cas, des stérilités de type sporogène, structural et fonctionnel. Les fréquences respectives des différents types sont équivalentes dans les stérilités nucléaire et nucléocytoplasmique.

Le contrôle génétique de la restauration, dans les deux cas est, majoritairement, monogénique dominant (Fig 1.7). Il existe des cas de déterminisme récessif et de déterminisme polygénique.

Le stade d'action des gènes, au cours de la sporogénèse, et la fréquence de chaque stade de blocage (Fig 1.8), ne font pas apparaître de différences dans les deux types de stérilité.

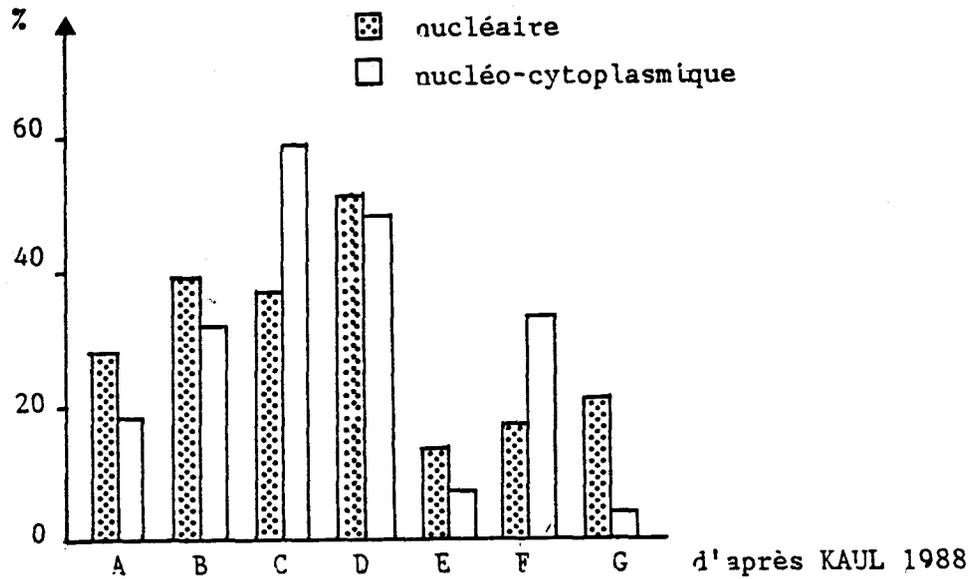
Les trois types d'évolution du tapis nourricier sont représentés dans les deux stérilités (Fig 1.2). Cependant dans le cas de la stérilité nucléaire, le développement du tapis est majoritairement normal et minoritairement persistant, alors que dans les cas de stérilité nucléocytoplasmique, le tapis est majoritairement persistant.

La sensibilité à l'environnement est la même dans les deux types de stérilité (Fig 1.4).

L'instabilité phénotypique est signalée dans les deux cas.

Il n'y a pas, au milieu de cette diversité, de caractère spécifique de l'une des deux stérilités. En fait, le seul

Figure 1.8.: Fréquence des différents mutants agissant sur la microsporogénèse dans le cas des stérilités mâles nucléaire et nucléo-cytoplasmique: action en préméiose (A), prophase I (B), pendant la formation des microspores (C), au moment de la séparation des tétrades (D), pendant la mitose pollinique (E), pendant le développement du pollen (F), cas d'action variable (G).



argument qui permet de conclure à l'un ou l'autre des mécanismes, est l'analyse des croisements réciproques, et de leurs descendances. Dans le cas de la stérilité mendélienne, il y a équivalence des proportions des phénotypes sexuels observés dans les descendances de croisements réciproques en  $F_1$  et  $F_2$ , alors que dans le cas de la stérilité nucléocytoplasmique, ces descendances sont différentes. L'observation des  $F_2$  et des back-crosses est nécessaire, parce qu'elle permet de lever l'ambiguïté qui peut apparaître, dans les cas où, le ou les gènes de restauration de la fertilité, sont liés à un gène d'incompatibilité (Van Damme, 1983). Dans ce cas, les différences de ségrégations dans les descendances de croisements réciproques, sont le seul fait de la non-équivalence des gamètes efficaces, due aux allèles d'incompatibilité.

Dans le cas de la CMS du maïs, seule l'analyse des descendances des croisements réciproques a permis de regrouper les 160 sources de stérilité mâle connues, en 3 grands systèmes nucléocytoplasmiques: T, C, S. (Duvick, 1965; Beckett, 1971).

En fait, la grande différence entre la stérilité nucléaire et la CMS, ne réside pas dans la diversité des phénotypes sexuels, mais dans la répartition de cette diversité.

b) La diversité phénotypique intra descendance dans la CMS.

Dans le cas de la stérilité mâle nucléaire, le phénotype correspond à la mutation qui le provoque. Il est possible de

trouver, parmi les individus d'une même espèce, de nombreuses mutations provoquant l'apparition de stérilité mâles, qui diffèrent, légèrement ou profondément, dans leur expression phénotypique.

En revanche, dans le cas de la CMS, des différences d'expression phénotypique, sont décrites à l'intérieur d'une même descendance.

Owen (1952), décrivant et comparant la stérilité mâle nucléaire et la CMS découvertes chez *Beta vulgaris*, observe que pour des descendance issues de fécondation libre, il obtient des intermédiaires de stérilité uniquement dans le cas de la CMS, la stérilité mâle nucléaire ne générant que des femelles et des hermaphrodites. Owen conclut: "These constitute a relatively sure diagnosis of the cytoplasmic inheritance."

Dans la stérilité mâle nucléocytoplasmique, il peut exister au sein d'une même descendance et même sur un même individu au cours du temps, une flexibilité de l'expression de la stérilité mâle.

S'il est facile d'imaginer un grand nombre de sites d'action des gènes nucléaires qui peuvent induire la stérilité, il est plus difficile, a priori, d'accepter l'idée que l'information cytoplasmique, principalement la mitochondrie, de par le nombre limité d'informations génétiques contenues dans son génome, puisse provoquer un tel polymorphisme dans l'expression de la

stérilité mâle.

Comment expliquer ce polymorphisme?

Il y a deux façons d'aborder ce polymorphisme:

- Soit, en considérant que le polymorphisme est dû au fonctionnement de la mitochondrie: pour un même environnement génétique simple, la mitochondrie n'est pas stable (Lonsdale *et al.*, 1988) et son rapport avec l'information nucléaire peut changer.

-- Soit, en considérant que le polymorphisme provient du nombre de gènes nucléaires, pouvant intervenir dans la restauration de la CMS. Une mutation de la mitochondrie peut faire qu'un grand nombre de gènes nucléaires se retrouvent en situation de gènes mainteneurs de stérilité, et que toute mutation au niveau de ces loci, devient potentiellement restauratrice.

## B.- ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE DU DETERMINISME GENETIQUE DE LA STERILITE MALE CHEZ *Beta*.

### 1. LES PHENOTYPES SEXUELS OBSERVES.

L'étude génétique d'un caractère, quel qu'il soit, demande en premier lieu une description et une classification de son expression phénotypique. Le problème majeur, rencontré dans l'étude de la stérilité mâle dans le groupe *Beta vulgaris*, tient à la difficulté d'établir des classes phénotypiques bien définies. Les stades de blocage de la fonction mâle sont variés,

ainsi que les types de développement du tapetum (Tableau 1.1), la stérilité pouvant être de type structural, fonctionnel ou touchant à la sporogénèse, comme décrit précédemment.

Dans l'ensemble des travaux publiés sur ce sujet, les auteurs s'accordent à définir trois grands groupes de phénotypes sexuels: (i) les hermaphrodites, ou mâle-fertiles ou, pollen-fertiles, (ii) les intermédiaires, ou partiellement fertiles, ou partiellement mâle-stériles et (iii) les mâle-stériles, ou femelles.

(i) Les mâles fertiles portent des fleurs hermaphrodites à anthères jaunes déhiscentes, remplies de pollen viable.

Ceulemans (1972) décrit, dans les anthères observées en microscopie optique, les étapes suivantes de l'androgénèse: formation d'un massif méristématique d'anthère (*initium* d'anthère) au sein duquel se différencient les archéspores, constituant le tissu sporogène; formation du tapis nourricier, méiose et formation des tétrades qui libèrent les microspores; disparition du tapis, par rupture des parois cellulaires; première et deuxième mitose pollinique aboutissant à la formation des deux cellules génératives au sein de la cellule végétative (pollen trinué). Enfin dessiccation de l'assise mécanique, déchirement de l'anthère et libération du pollen.

(ii) Les intermédiaires portent des fleurs femelle-fertiles, à anthères jaune orangé ou brunâtres: celles-ci sont le plus souvent ratatinées ou pliées. Toutes les transitions existent entre anthères non déhiscentes et déhiscentes, avec plus ou moins

Tableau 1.1 : Action des gènes nucléaires de restauration chez Beta vulgaris: stades de blocage lors de la microsporogénèse et de la gamétogénèse mâle.

Type de plante Etat de la ploidie	Stades de blocage	Etat du Tapetum	Références
B. vulgaris 4n = 4x = 36	PRE MEIOTIQUE	a et b	KINOSHITA 1971
B. vulgaris 2x = 18		c	KINOSHITA 1972
B. vulgaris 2x = 18	POST MEIOTIQUE	a	OWEN 1942; ARTSCHWAGER 1947 NAGAO et KINOSHITA 1962
		d	CEULEMANS 1972
B. vulgaris 4n = 4x = 36		a	KINOSHITA 1971; KINOSHITA et al 1978 MIKAMI 1982; KAUL 1988.
2x = 18	MITOSE DE LA MICROSPORE	a	KINOSHITA 1971; KINOSHITA et al 1972.

a= Tapetum anormal; b= Tapetum persistant; c= tapetum détruit tardivement  
d= Evolution variable du tapetum.

Selon KAUL 1988

de pollen, plus ou moins viable. Quand l'anthère s'ouvre il arrive que du pollen soit visible, mais il reste aggloméré et collé à la paroi; celle ci, contrairement au cas des mâle-stériles, apparaît opaque.

Le manque d'uniformité de ce phénotype se retrouve au niveau microscopique, dans la formation du pollen (Ceulemans, 1972). Le développement normal, jusqu'à la méiose, révèle ensuite des dérèglements variés: la dégradation des microspores peut commencer dès le stade tétrade ou ne débiter qu'après la destruction du tapis nourricier, le tapis peut disparaître au cours du développement, ou rester visible, même lorsque le pollen est au bout de son évolution. Dans ce cas, l'avortement de la microspore serait du à la désintégration tardive du tapis (Kinoshita, 1971), signe d'un transfert perturbé des nutriments du tapis, vers les microspores en développement.

(iii) Les plantes mâle-stériles possèdent des fleurs femelles fertiles, dans lesquelles les anthères sont blanches (tôt ou tard brunissantes), ou verdâtres (tôt ou tard brunissantes), ou encore brun foncé. Parfois, les anthères sont "ratatinées", ou pliées, petites ou grandes. Un des critères les plus déterminants, est l'aspect translucide de la paroi de l'anthère. Dans de très rares cas, l'anthère est absente de la fleur et il ne subsiste de l'étamine, que le court filet (Delsalle et Delemme, Etablissement Florimont Desprez, comp.pers. 1989).

L'étude microscopique révèle un comportement comparable à celui des hermaphrodites, jusqu'au stade tétrade, au cours duquel

un comportement anormal se manifeste (Ceulemans, 1972): il se caractérise par une évolution aberrante du tapis nourricier, selon deux voies différentes:

- le tapis devient plasmodial par disparition des parois des cellules tapétales. Le plasmode ainsi formé envahit la loge pollinique repoussant les microspores, qui finissent par dégénérer en même temps que le tapis plasmodial. La dégénérescence de l'ensemble peut être si complète, que la loge pollinique est absolument vide.
- le tapis cellulaire normal persiste au delà de la méiose, puis dégénère après le début de la dégradation des microspores; ce processus est décrit comme rare.

Ces deux types d'évolution du tapis peuvent être observés sur des fleurs proches, dans l'inflorescence du même individu (Kinoshita, 1971).

Une revue bibliographique relative à la classification phénotypique, rend compte de la difficulté à classer les observations et à effectuer une synthèse des différentes publications (Tableau 1.2). En effet, les critères de classification varient fortement selon les auteurs. Certains s'appuient sur des critères macroscopiques: variations de couleur des anthères (Owen, 1945; Nagao et Kinoshita, 1962; Knapp, 1969), déhiscence, ou non déhiscence (Owen, 1945), contenu des loges polliniques (Ceulemans, 1972); ou sur des critères microscopiques: pourcentages de pollen viable (Oldemeyer, 1957; Nagao et Kinoshita, 1962; Ceulemans, 1972). Selon les auteurs, le

Tableau 1.2 : Observations et classifications phénotypiques

OBSERVATIONS		CLASSIFICATIONS							
macroscopique: aspect de l'anthere	microscopique: état du pollen	Owen 1942-1945	Oldemeyer 1957	Nagao et Kinoshita 1962	Bliss et Gabelman 1965	Bolz 1968	Knapp 1969	Kinoshita 1977	Boutin 1984
anthères blanches	Tétrades Létales	mâle	Classes 1 mâle	complè- tement	mâle	Pollen	Classes b stérile	Mâle	Femelle
anthères blanches, verdâtres, brunes.	Pollen Létal	stérile	2 stérile	stérile = C.S.	stérile	stérile	a	stérile	Fe
anthères jaune pâle	Pollen létal avec peu d'exine	semi mâle stérile	3				c		Intermédiaire
anthères jaunes	Pollen létal avec exine bien déve- loppé	type 1	4	semi stérile  type B	partiel- lement mâle fertile	semi  stérile		intermé- diaire	fonctionnellement femelle = IFe
anthères non déhiscentes avec peu de pollen formé	pollen viable:  < 1% 1% à 5%		5 Intermé- diaire				semi stérile		
	5% à 25%	semi mâle stérile	6						
	25% à 75%	type 2	7	semi stérile type A					
			8			pollen fertile			Hermaphrodites = H
déhiscentes remplies de pollen viable	75% à 95% 95% à 100%		9 Fertile	normal	Fertile		e Fertile	Fertile	
		normal	10						

nombre de classes phénotypiques varie de 3 à 10. La classification la plus utilisée, fait intervenir trois groupes: les mâle-stériles ou femelles, les intermédiaires et les mâles-fertiles ou hermaphrodites. Cependant, la classe des intermédiaires ne regroupe pas toujours les mêmes phénotypes; en effet, certains auteurs considèrent comme intermédiaires, les plantes à phénotype instable, pas tout à fait stériles, pas tout à fait fertiles, mais suffisamment fertiles pour donner des descendants en autofécondation (Owen, 1945; Oldemeyer, 1950; Nagao et Kinoshita, 1962; Bliss et Gabelman, 1965; Bolz, 1968; Knapp, 1969). D'autres auteurs, en revanche, considèrent les intermédiaires comme fonctionnellement femelles (Kinoshita, 1977; Boutin, 84).

## 2. LE DETERMINISME GENETIQUE DE LA STERILITE MALE CHEZ *Beta vulgaris*.

### a) Analyse critique des modèles génétiques proposés

Owen 1942: 2 cytoplasmes et 2 gènes dominants de restauration de la fertilité.

La première proposition de modèle explicatif de la stérilité mâle chez *Beta vulgaris*, a été formulée par Owen en 1942 et complétée en 1945; l'ensemble de ces travaux est encore considéré, aujourd'hui, comme référence.

L'intérêt essentiel de ce travail, réside dans la démonstration claire du modèle nucléocytoplasmique de la

stérilité mâle.

L'auteur formule la problématique de la façon suivante:

- si le déterminisme est purement nucléaire, il ne doit pas y avoir de différence dans les descendance de croisements réciproques;
- si le déterminisme est purement cytoplasmique, seule la femelle aura une influence sur la descendance;
- si le déterminisme est nucléocytoplasmique, des différences doivent apparaître dans les descendance de certains croisements réciproques.

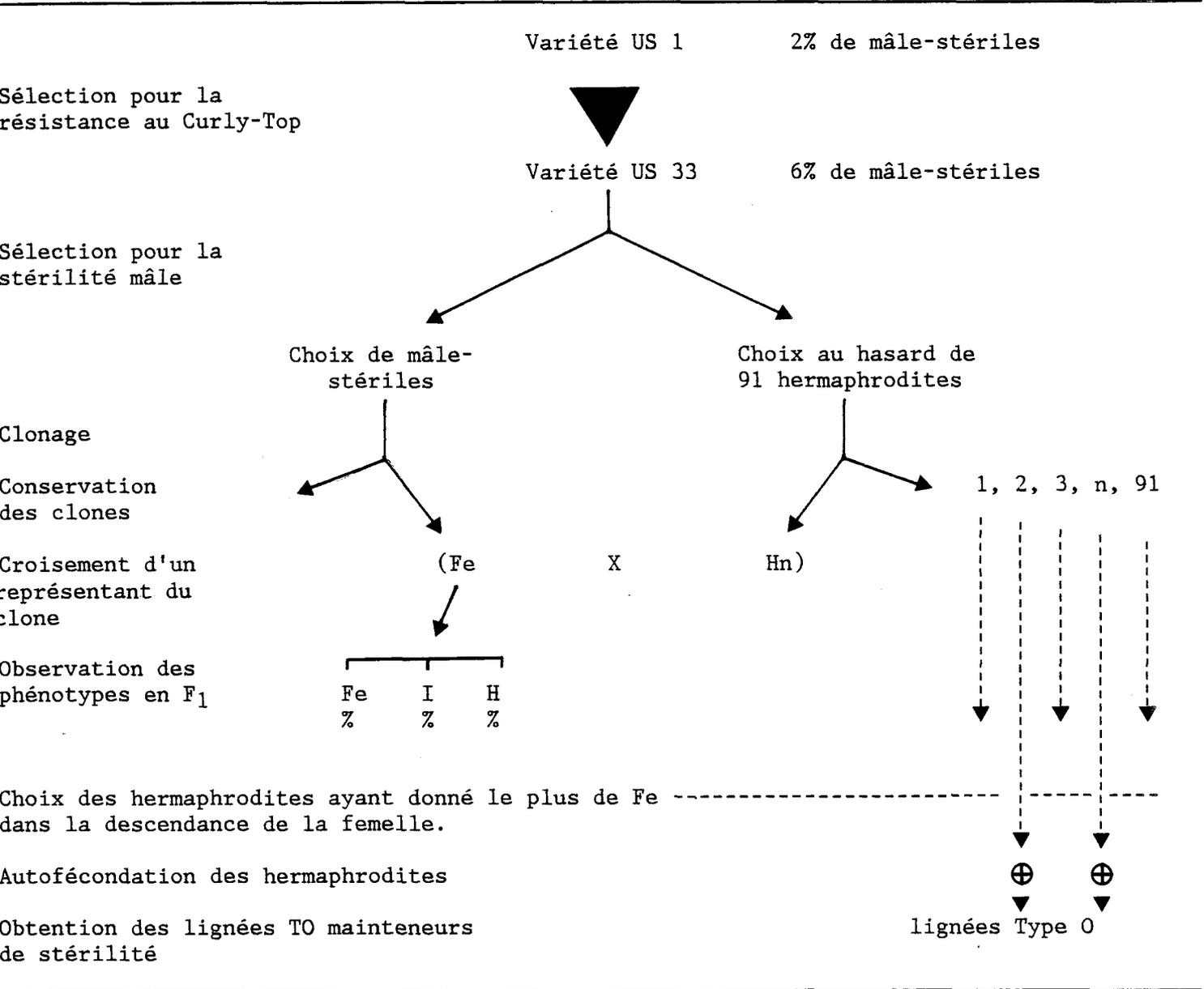
Dans un premier temps Owen a sélectionné, dans des lignées en sélection pour la résistance au Curly Top, de "bon mainteneurs" de stérilité (Fig 1.9A): c'est-à-dire des hermaphrodites produisant un pollen normal et abondant, et qui, croisés avec des femelles, donnent jusqu'à 100% de male-stériles dans la descendance de ces femelles. Autrement dit, les mainteneurs sont des hermaphrodites qui possèdent les mêmes gènes nucléaires de stérilité que les femelles.

Les hermaphrodites, ainsi sélectionnés, ont été utilisés en croisement réciproque (Tableau 1.3) avec des intermédiaires de type 2 (cf. Tableau 1.2).

Les ségrégations réciproques sont nettement asymétriques: la descendance, récoltée sur la plante intermédiaire, ségrège en femelles, intermédiaires et hermaphrodites et, celle récoltée sur

Figure 1.9 . : Hypothèse de Owen (1945).

A : Sélection des mainteneurs de stérilité type 0



B: Hypothèse de Owen et restauration de la fertilité mâle

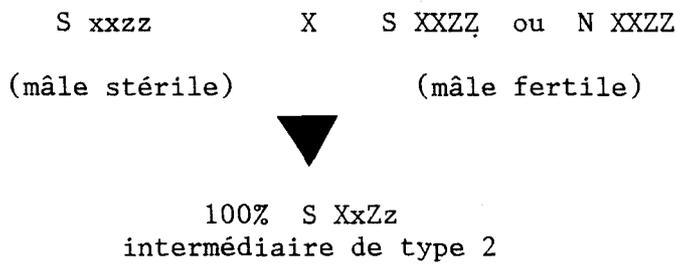


Tableau 1.3: Ségrégations observées dans les descendance de croisements réciproques entre betteraves intermédiaires (type SSa) et hermaphrodites mainteneurs de stérilité.

Parents	Descendants			Total
	Mâles stériles	Intermédiaires	Hermaphrodites	
	%	%	%	
A x clone 181	88	12	0	52
croisement réciproque	0	0	100	111
B x clone 97	33	63	4	137
croisement réciproque	0	0	100	43
C x clone 97	24	56	20	89
croisement réciproque	0	0	100	15
C x clone 178	49	32	19	47
croisement réciproque	0	0	100	22
C x clone 181	25	53	22	60
croisement réciproque	0	0	100	84
D x clone 179	68	32	0	71
croisement réciproque	0	0	100	74
E x clone 181	26	74	0	61
croisement réciproque	0	0	100	119
F x clone 179	46	47	7	81
croisement réciproque	0	0	100	41

A : B : C : D : E : F: Intermédiaires de type 2

clones: 97; 178; 179; 181: mainteneurs de stérilités

Selon OWEN 1945

l'hermaphrodite est uniquement constituée d'hermaphrodites.

De ces résultats, Owen conclut à l'existence de deux types cytoplasmiques: un cytoplasme normal (N) qui, quels que soient les gènes nucléaires qui l'accompagnent, confère à l'individu qui le porte le phénotype hermaphrodite, et un cytoplasme stérile (S) qui, selon le génotype nucléaire, conduit à l'expression de phénotypes femelles, intermédiaires et hermaphrodites.

En ce qui concerne le génotype nucléaire, les résultats sont moins convaincants. Owen constate la grande variabilité du phénotype sexuel et propose un schéma, établissant les relations phénotype/génotype (Tableau 1.4 A).

Il est très difficile de savoir si le modèle de contrôle génétique vient rendre compte de la classification de phénotypes intermédiaires en 2 catégories distinctes, ou si cette classification a été faite arbitrairement, pour justifier le modèle à deux loci (Rohrbach, 1962). Owen lui même mentionne la grande difficulté de classification des phénotypes intermédiaires, qui rend difficile toute définition du rôle de chaque gène.

Sans remettre en cause la grande qualité du travail effectué, qui reste un des plus complets sur le sujet, il est important de mentionner quelques incohérences, dans les conclusions.

Tableau 1.4a: Hypothèse de OWEN (1945):Relation génotype-phénotype

GENOTYPES	PHENOTYPES
S xxzz	: MS : Femelle
S Xxzz ou S xxZz S XXzz ou S xxZZ	: I <sub>1</sub> : Intermédiaire de type 1
S XxZz ou S XXZz ; S XxZZ	: I <sub>2</sub> : Intermédiaire de type 2
S XXXZ	: MF : Hermaphrodite
N....	: MF : Hermaphrodite
cas particulier :	
N xxzz	: MF : Hermaphrodite mainteneur de stérilité.

d'après OWEN 1945

Tableau 1.4.b : Test de conformité des données observées au modèle d'Owen (1945): Ségrégations de Femelles (Fe), semi mâle-stériles de type a et b (I) et Hermaphrodites (H) dans les descendance de plantes de génotype supposé SXxZz pour le mainteneur de stérilité de génotype supposé Naxzz. Test effectué en regroupant I et H: ségrégation attendue selon l'hypothèse: 1:3.

Mère	Père	Descendants				Goodness of feet
		Fe %	I %	H %	n	
n°	n°					1:3
1.538	clone 97	62	36	2	117	<0.001
1.583	" 97	22	54	24	72	>0.05
1.607	" 97	24	72	4	100	>0.05
1.610	" 97	53	41	6	32	<0.001
1.618	" 97	42	34	24	157	<0.001
2.470	" 97	58	38	4	26	<0.001
Total		42	58		504	<0.001

D'après Owen 1945

- Le modèle est en désaccord avec la restauration de la fertilité, observée dans le croisement de femelles, par des hermaphrodites. En effet, selon le modèle, une femelle (Sxxxz), croisée par un hermaphrodite, possédant tous les gènes de restauration à l'état homozygote (SXXZZ), donnera, au mieux, des Intermédiaires de Type 2 (SXxZz) (Fig.1.9B). Cette incapacité théorique de restauration des femelles, en première génération est en opposition avec les résultats de Theurer (1971) qui a sélectionné des hermaphrodites restaurateurs de fertilité, capables de donner, en croisement avec des femelles, des descendance homogènes, entièrement constituées d'hermaphrodites produisant un pollen abondant.

- On constate de fortes distorsions entre résultats attendus et observés. Selon Owen : "les résultats observés sont relativement en accord avec les résultats attendus". Or, le test de conformité des données observées sur des résultats présentés par l'auteur (Owen, 1945), (Tableau 1.4 B) pour vérifier l'hypothèse génétique concernant le génotype intermédiaire, montre que les résultats observés sont nettement en désaccord avec le modèle.

Oldemeyer (1957): plusieurs gènes cytoplasmiques et/ou des gènes nucléaires mineurs de restauration:

Oldemeyer procède à une série d'indexations sur un même pollinisateur, c'est-à-dire qu'il croise différentes sources de femelles, par un même pollinisateur et compare les proportions des phénotypes sexuels, dans leurs descendance. Les différences

enregistrées sont hautement significatives et ne peuvent s'interpréter, uniquement, dans le cadre d'un modèle à deux gènes nucléaires de restaurations.

L'auteur suggère que les mâle-stériles pourraient différer, les uns des autres, par différents facteurs:

- les gènes cytoplasmiques. Ces gènes pourraient être différents par leur nombre ou par leur nature;
- le contenu en gènes nucléaires mineurs de modification. En plus des gènes majeurs définis par OWEN, il est nécessaire d'invoquer ces gènes qui pourraient superposer leur effet et influencer l'expression phénotypique;
- alternativement, on peut envisager le contrôle génétique complexe de la stérilité. Un nombre plus important de gènes dominants et récessifs de restauration, pourrait justifier les ségrégations observées plus complexes que ce que l'on pourrait attendre, dans le cadre d'un modèle dégénique.

Hogaboam (1957): un gène de restauration X; un gène modificateur: Sh.

L'auteur étudie également les relations génotype/phénotype, à partir de croisements, dont les résultats le conduisent à conclure:

- au rôle prédominant de X, qui, à l'état homozygote dominant, est responsable du caractère hermaphrodite, à l'état hétérozygote du caractère intermédiaire et à l'état homozygote récessif du caractère mâle-stérile.

- à l'existence d'un gène de modification Sh, dominant, qui augmenterait la capacité de restauration de X, sans être lui-même restaurateur de fertilité. Selon ce modèle, des génotypes intermédiaires (Xx), pourraient produire du pollen.

Nagao et Kinoshita (1962): confirmation de l'hypothèse nucléocytoplasmique et retour au modèle digénique de OWEN.

Les auteurs réalisent une série de croisements contrôlés, dont les résultats confirment l'hypothèse nucléocytoplasmique et conduisent à rejeter l'hypothèse de la restauration, selon HOGABOAM. La conclusion de ce travail est que le modèle de OWEN reste le plus probable.

Toutefois, des ambiguïtés fortes dans le classement phénotypique de certaines plantes, jugées tantôt Hermaphrodites, tantôt Intermédiaires, ainsi que des ambiguïtés dans l'origine et le génotype de plantes utilisées dans les croisements, hypothèquent lourdement les conclusions de ce travail, pourtant cité fréquemment en référence.

Bliss et Gabelman (1965): des rôles différents attribués à X et Z; contrôle monogénique de la restauration et du caractère intermédiaire.

Toujours dans une hypothèse digénique, les auteurs dissocient la composante liée à la restauration, de la composante liée au caractère intermédiaire.

Les auteurs ont travaillé sur un matériel tout à fait original, constitué de lignées issues de croisements entre la betterave rouge (table beet) qui fournit le cytoplasme, et la betterave sucrière (sugarbeet), mainteneuse de stérilité qui apporte les gènes nucléaires du maintien de la stérilité mâle du cytoplasme Owen.

Les résultats obtenus à l'issue d'une série de croisements de femelles par des hermaphrodites et d'autofécondation simultanée de ces hermaphrodites, peuvent s'expliquer dans le cadre du modèle de OWEN, modifié en attribuant à X et Z, des rôles différents:

- l'allèle dominant X, quand il est présent, restaure la fertilité sur le cytoplasme stérile, quelle que soit la combinaison allélique au locus Z.
- l'allèle Z est responsable du caractère intermédiaire, si le locus X est à l'état homozygote récessif (xx); X était épistatique sur Z.

Ce modèle correspond à une classique épistasie dominante.

Selon cette hypothèse, le phénotype intermédiaire n'est déterminé que par deux génotypes (xxZz; xxZZ), ce qui ne saurait rendre compte de l'extrême variabilité des résultats observés, dans les descendance de croisements de femelles, par différents intermédiaires.

De plus, les auteurs reconnaissent qu'il leur a fallu analyser un grand nombre de croisements, pour en trouver un qui corresponde à l'hypothèse avancée.

Cependant, l'hypothèse d'un locus de restauration épistatique sur le caractère intermédiaire est compatible avec les résultats obtenus par d'autres auteurs (Theurer, 1969; 1971).

Bolz (1968): contrôle digénique de la stérilité mâle: double épistasie récessive.

S'appuyant sur une revue approfondie des résultats présentés dans la bibliographie et sur une série de résultats personnels, Bolz propose le modèle de contrôle de la stérilité mâle détaillé dans le tableau 1.5a.

La stérilité pollinique est héritée de manière monohybride récessive; il existe, au moins, deux paires de gènes indépendants A/a et B/b tels que le phénotype mâle-stérile s'exprime du fait de l'interaction du cytoplasme S avec les 5 génotypes nucléaires suivants: aabb, Aabb, AAbb, aaBb et aaBB; la semi stérilité est déterminée par les génotypes AaBb, AABb, AaBB; enfin, seul le génotype AABB, permet l'expression de la fertilité sur le cytoplasme S.

L'intérêt de ce modèle est multiple;

(i) tout d'abord, il rend compte de la variabilité des résultats observés dans les descendance de croisements de différentes femelles par le même hermaphrodite (Rohrbach, 1965;

Tableau 1.5: Hypothèse de BOLZ (1968): Correspondance Phénotype/Génotype

a : cas général

---

S	aabb		
S	aaBb		
S	aaBB	: classe 3 : pollen stérile :	anthère blanche ; verdâtre ou brun foncé
S	Aabb		
S	AAbb		
S	AaBb		
S	AABb	: classe 2 : semi-stérile, anthères jaunes, oranges ou brunâtres:	déhiscentes ou non
S	AaBB		
S	AABB	: classe 1 : pollen fertile :	anthères jaunes déhiscentes poudreuses.

---

N	----	:	: pollen fertile :
---	------	---	--------------------

---

b : cas particuliers

---

N	aabb	:	: pollen fertile :	mainteneur	:	universel
N	aa--	:		mainteneur	spécifique	des femelles S aa--
N	--bb	:		mainteneur	spécifique	des femelles S --bb

---

d'après BOLZ 1968

Nagao et Kinoshita, 1965; Theurer, 1970).

(ii) Dans les travaux de Owen (1945), Knapp (1955), Nagao et Kinoshita (1962), Bandlow (1964) et Rohrbach (1965), un grand nombre de résultats de croisements contrôlés présentent des ségrégations avec plus de 50% d'individus mâle-stériles; ces résultats, compte tenu de l'hypothèse classique d'une stérilité mâle associée à un génotype homozygote récessif, ne pouvaient être testés que pour des ségrégations attendues de 50% ou de 100%, les distorsions entre résultats attendus et observés s'expliquant par la variabilité du phénotype intermédiaire. Selon l'hypothèse de BOLZ les ségrégations attendues en mâle-stériles, dans les descendance de femelles, peuvent être, selon les génotypes parentaux: 0, 25, 50, 62.5, 75, ou 100%, ce qui permet une correspondance attendue/observée, beaucoup plus acceptable.

(iii): Dans les résultats de Bolz (1968), Nielson et Nemazi (1967) et Bosemark (1972) il apparait (tableau 1.5b) qu'il existe:

- D'une part, ce que les sélectionneurs appellent de "bons mainteneurs" et de "bonnes femelles"; c'est-à-dire des hermaphrodites qui, quelle que soit la femelle avec laquelle ils sont croisés, sont mainteneurs de stérilité (selon BOLZ, ces types 0 ont le génotype Naabb), et des femelles qui, quel que soit le mainteneur par lequel elles sont croisées, donnent 100% de femelles, dans leur descendance (selon Bolz ces femelles ont le génotype Saabb).

- D'autre part, des "couples" (Type 0 / femelle spécifique); c'est-à-dire que certains Type 0 sont bons ou mauvais mainteneurs, selon qu'on les croise avec telle femelle, ou telle autre. De même, certaines femelles sont bien maintenues, selon qu'elles sont croisées par tel mainteneur, ou tel autre: selon BOLZ les Type 0 de combinaisons NaaBb (ou NaaBB) et NAabb (ou NAAAbb) seront respectivement mainteneurs spécifiques des femelles SaaBb (ou SaaBB) et SAabb (ou SAABb).

Cependant, ce modèle présente également de sérieuses limites.

Si, seul le génotype nucléaire (XXZZ) restaure la fertilité sur S, il apparaît que, quels que soient la femelle et l'hermaphrodite utilisés, on peut, au mieux, espérer obtenir des intermédiaires; ce qui est en contradiction avec de nombreux résultats de croisements de femelles par des hermaphrodites donnant une F<sub>1</sub> constituée uniquement d'hermaphrodites (Theurer, 1970).

De plus, selon ce modèle, le résultat attendu de l'autofécondation d'un hermaphrodite, est une descendance homogène, uniquement constituée d'hermaphrodites. Ceci est également contredit par les ségrégations observées dans les descendance en autofécondations d'hermaphrodites (Nagao et Kinoshita, 1962).

Selon cette hypothèse, pour un pollinisateur donné, les ségrégations attendues de femelles et non femelles

(intermédiaires et hermaphrodites), dans les descendance de croisements avec toutes les combinaisons possibles de génotypes femelles (Tableau 1.6 A), sont respectivement de types (1:0), (1:0, 1:1, 3:1), (1:0, 1:1, 0:1), (3:1, 5:3, 1:1), (1:1, 1:3, 0:1) et (0:1). Ces ségrégations attendues, ne rendent pas compte des résultats observés par Nagao et Kinoshita (1962) (Tableau 1.6B) qui, pour un même pollinisateur, obtiennent sur différentes femelles les ségrégations 1:3 et 3:1.

Enfin le modèle propose 3 génotypes intermédiaires; ce qui est encore peu pour rendre compte de la variation observée dans cette catégorie phénotypique.

Knapp (1969): hérédité multigénique de la stérilité mâle.

La publication de ce travail très complet marque, semble-t-il, un tournant dans l'étude de la génétique de la stérilité mâle chez *Beta vulgaris*, puisqu'il s'agit de la dernière étude approfondie, consacrée à la composante nucléaire de ce caractère, chez cette espèce.

Knapp, part du constat qu'il n'y a pas, contrairement à ce que d'autres auteurs affirment (in Rohrbach, 1962), de classes phénotypiques bien marquées, et que, de plus, les résultats obtenus avec des plantes, pourtant très sélectionnées pour leurs caractères mainteneurs ou restaurateurs, peuvent être très variables.

Tableau 1.6 : hypothèse de Bolz.

A: Tableau de gamètes et ségrégations attendues de Femelles (MS) et non femelles (H = Intermédiaires + Hermaphrodites) dans les descendance de femelles de différents génotypes croisées par le même Hermaphrodites sur N;

Génotypes H	Génotypes Fe	aabb		Aabb (aaBb)		AAbb (aaBB)		Aa Bb		AABb (AaBB)		AABB
		Gamètes	ab	ab	Ab(aB)	Ab(aB)	AB	Ab	aB	ab	AB	Ab(aB)
aabb	ab	MS	MS	MS	MS	H	MS	MS	MS	H	MS	H
aAbb (aaBb)	ab	MS	MS	MS	MS	H	MS	MS	MS	H	MS	H
	Ab(aB)	MS	MS	MS	MS	H	MS	H	MS	H	MS	H
aaBb (aAbb)	ab	MS	MS	MS	MS	H	MS	MS	MS	H	MS	H
	aB(Ab)	MS	MS	H	H	H	H	MS	MS	H	H	H
aaBB (AAbb)	aB (Ab)	MS	MS	H	H	H	H	MS	MS	H	H	H
Ségrégations attendues MS: H pour 1 génotype Hermaphrodite		MS:H	MS:H	MS:H	MS:H	MS : H	MS : H	MS : H	MS : H	MS : H	MS : H	MS:H
		1:0	3:1	1:1	0:1	3 : 1	5 : 3	1 : 1	1 : 1	1 : 3	0 : 1	0:1

B: Résultats observés dans les descendance de croisements de différentes femelles par le même hermaphrodite: 192-12 (Nagao et Kinoshita 1962).

Mère N°	Descendants							Goodness of fit	
	MS %	SSb %	SSa %	N %	MS %	(SSa+SSb+N) %	Total	1:3 p	3:1 p
M-19	70	16	11	3	70	30	37	>0.05	<<0.001
M-2	33	38	10	19	33	67	21	>0.05	<<0.001
M-17	23	59	9	9	23	77	22	>0.05	< 0.001
K3-6	73	27	0	0	73	27	22	<<0.001	> 0.05

Ce travail présente les résultats obtenus, en croisant des plantes peu sélectionnées pour la stérilité mâle; il s'agit de vérifier, par un schéma de croisement simple, la répétitivité et la fiabilité des résultats observés.

L'auteur choisit quatre femelles S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub> (Tableau 1.7) pour que S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> d'une part, et S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub> d'autre part, aient respectivement la même mère, donc le même cytoplasme. Ces quatre femelles sont clonées et pollinisées, chacune par quatre hermaphrodites A, B, C et D, également clonés. Chaque croisement est répété six fois sur trois années. Les descendances sont observées deux fois par répétition, à différents moments de la période de floraison (avant et après écimage des plantes); ainsi douze séries d'observations par croisement, à raison de cent descendants dans chaque répétition, ont été observées. Les résultats sont présentés dans le tableau 1.7.

Ces observations conduisent Knapp à conclure que:

- des génotypes divers, peuvent exprimer la stérilité mâle, si le cytoplasme S est présent; un grand nombre de gènes, pouvant entraîner des différences dans le degré de stérilité mâle;
- l'environnement influence l'expression du phénotype.

Sur la base de ces résultats, Knapp conclut: "une analyse du nombre et du fonctionnement des gènes influençant le degré de stérilité mâle chez *Beta vulgaris*, semble peu prometteuse et même impossible."

Tableau 1.7. Résultats de Knapp 1969: variation des pourcentages de femelles observées dans les descendance de croisements de femelles soeurs ( $S_1$ ,  $S_2$ ) et ( $S_3$ ,  $S_4$ ) par quatre hermaphrodites A, B, C et D choisis pour leurs caractères non restaurateurs et non mainteneurs. La descendance de chaque croisement donne lieu à 12 observations; la valeur d'une observation correspond à la moyenne des femelles observées par deux observateurs différents sur une même série de cent plantes.

Croisements	Répétitions (*)												Moyenne des répétitions	Hétérogénéité p
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
$S_1$ X A	17	11	43	57	20	3	39	25	48	44	41	59	34	<<0.001
$S_2$ X A	74	85	87	44	69	65	60	65	86	84	73	82	73	<<0.001
$S_3$ X A	58	37	73	78	74	63	68	66	82	81	79	75	70	<<0.001
$S_4$ X A	70	61	100	100	96	89	93	94	97	93	96	97	91	<<0.001
$S_1$ X B	1	3	9	7	4	5	19	12	7	6	2	54	11	<<0.001
$S_2$ X B	3	2	0	5	0	0	2	0	3	5	1	3	2	(a)
$S_3$ X B	48	38	64	70	58	61	50	49	51	48	60	62	55	<0.001
$S_4$ X B	48	32	55	59	65	46	50	45	55	58	44	46	50	<0.001
$S_1$ X C	12	31	20	39	23	4	25	21	38	39	25	56	28	<<0.001
$S_2$ X C	28	42	24	30	19	30	28	24	30	26	27	46	29	<0.01
$S_3$ X C	31	43	62	77	40	68	63	58	64	58	62	55	57	<<0.001
$S_4$ X C	-	-	74	59	73	95	-	-	84	78	69	76	76	<<0.001
$S_1$ X D	7	15	5	24	4	0	5	3	23	16	5	16	10	<<0.001
$S_2$ X D	24	3	17	16	14	18	19	13	18	12	6	27	15	<<0.001
$S_3$ X D	18	28	42	40	31	21	28	33	27	24	45	30	31	<0.001
$S_4$ X D	53	20	61	67	61	86	53	44	49	42	40	39	51	<<0.001

(a) Effectif attendu insuffisant pour réaliser le test.

(*) Répétition	Année de Croisement	Année et moment de l'observation
1	1961	1962, avant écimage
2	1961	1962, après écimage
3	1962	1963, avant écimage
4	1962	1963, après écimage
5	1963	1964, avant écimage
6	1963	1964, après écimage
7	1961	1965, avant écimage
8	1961	1965, après écimage
9	1962	1965, avant écimage
10	1962	1965, après écimage
11	1963	1965, avant écimage
12	1963	1965, après écimage

D'après KNAPP, 1969

Nous avons voulu affiner l'analyse de ces résultats de croisements, très complets, par une analyse de variance.

L'hétérogénéité entre les différentes répétitions du même croisement (tableau 1.7) a été testée à l'aide du test G (Sokal et Rohlf, 1981 p 731): elle est forte. La question que l'on se pose devant l'hétérogénéité des résultats présentés (tableau 1.7), est celle de l'origine des variations de pourcentages de femelles dans les descendance des différents croisements observés: les différences observées sont-elles d'ordre génétique, ou purement environnementales?

Pour répondre à cette question, il faut évaluer la part de chaque paramètre dans la variation de la fréquence des femelles.

- Les paramètres génétiques: c'est-à-dire, l'influence du père et de la mère.
- Les paramètres environnementaux: c'est-à-dire, l'année à laquelle le croisement a été fait, le temps de stockage des graines, l'année d'observation du phénotype sexuel et, enfin, le moment d'observation, au cours de la floraison: avant écimage et après écimage.

Trois séries de conclusions se dégagent de cette analyse:

(i) il existe un effet environnemental, mais les facteurs en cause ne sont pas identifiés.

L'hétérogénéité observée (tableau 1.7) entre les différentes observations d'un même croisement, montre que l'environnement a un effet sur l'expression du phénotype sexuel; comme annoncé plus haut, les composantes de l'environnement, prises en compte dans

l'étude de Knapp sont: l'écimage, le temps de stockage des graines, l'année d'observation et l'année de croisement (tableau 1.8a).

- Tout d'abord, il n'y a pas d'effet particulier de l'écimage sur le phénotype; c'est-à-dire que la variation de pourcentages de femelles, dans chacune des descendance observées, avant et après écimage, ne suit pas de règle précise. Quel que soit le niveau de comparaison choisi (pour un même pollinisateur, une même mère, une même année de croisement), les fluctuations sont significatives, mais non identifiées dans cette étude.

- Il n'y a pas d'effet année d'observation; ce critère, qui semble le plus typiquement environnemental (il conditionne la vie de l'individu de la graine à la fleur), n'a aucun effet significatif.

- Il n'y a pas d'effet durée de stockage.

- Enfin, le seul critère environnemental qui laisse apparaître un effet, à la limite de la signification, est l'année à laquelle le croisement a été effectué.

L'influence de l'environnement existe, mais une hiérarchisation des causes de la variance montre que l'effet environnemental n'est pas la principale cause de variations du pourcentage des mâle-stériles, dans les descendance.

(ii) l'effet génétique majeur.

L'effet génétique attendu est celui du père, dans la mesure où, dans la plupart des modèles présentés chez *Beta*, (i) les femelles sont supposées génétiquement identiques, pour la

Tableau 1.8.a : Analyse des travaux de Knapps. Analyse des variation dues à divers effets: l'écimage, le temps de stockage, l'année d'observation et l'année de croisements.

Source de variation	Somme des carrés des écarts	ddl	Moyenne des carrés des écarts	F	P
Ecimage	0.005	1	0.005	0.062	0.81
Résiduelle	12.629	156	0.081		
Temps de stockage résiduel	0.205 14.379	3 184	0.068 0.078	0.875	0.455
Année d'observation résiduelle	0.458 14.126	3 184	0.153 0.768	1.989	0.117
Année de croisement résiduelle	0.456 14.128	2 185	0.228 0.076	2.984	0.053

Tableau 1.8.b: Analyse des travaux de Knapps. Analyse des effets paternels,maternels et de leur interaction dans les pourcentages de mâle-stériles des descendance de croisement.

Source de variation	Somme des carrés des écarts	ddl	Moyenne des carrés des écarts	F	P
Père	4.88	3	1.62	10.9	$< 5 \cdot 10^{-3}$
Mère	6.1	3	2.03	13.64	$< 5 \cdot 10^{-3}$
Interaction père-mère	1.34	9	0.15	10.96	$<< 10^{-3}$
Résiduelle	2.34	172	0.014		

stérilité mâle, et (ii) les effets nucléaires restaurateurs, ou mainteneurs du pollinisateur, ont été décrits. Dans les résultats des croisements étudiés, cet effet est fort (tableau 1.8b). Les hermaphrodites utilisés sont plutôt bons mainteneurs (pollinisateur A et C), ou plutôt bon restaurateurs (pollinisateur B et D), quelle que soit la femelle croisée. Il faut cependant noter que l'effet mainteneur, ou restaurateur du pollinisateur est fortement en interaction avec la femelle à laquelle celui-ci est croisé.

Contrairement aux idées communément avancées, l'effet maternel est particulièrement déterminant, il est même supérieur à l'effet paternel. Cependant, on peut se demander s'il s'agit d'un effet cytoplasmique pur, nucléaire, ou nucléaire et cytoplasmique?

La comparaison des variations, observées entre descendance de mères, sur le même cytoplasme ( $S_1$ ,  $S_2$ ), d'une part, et, ( $S_3$ ,  $S_4$ ) d'autre part, montre (tableau 1.8c) que deux femelles issues de la même mère, croisées par le même hermaphrodite, la même année, donnent, dans leurs descendance observées la même année des résultats significativement différents. Ceci reste vrai, quel que soit le pollinisateur choisi.

Il est donc incontestable que le phénotype unique "femelle" correspond à plusieurs génotypes.

Tableau 1.8.c: Résultats de Knapp: Analyse de la variance due au génotype nucléaire maternel: comparaison des % de femelles obtenues sur des femelles ayant le même cytoplasme, croisées par le même père: valeurs obtenues avec 4 pollinisateurs différents.

Pollinisateurs	Source de Variance	Somme des carrés des écarts	ddl	Moyenne des carrés des écarts	F	P
1	-origine maternelle	0.851	1	0.851	41.92	$< 10^{-3}$
	-Mères sur un même cytoplasme	1.173	2	0.587	28.91	$< 10^{-3}$
	-résiduelle	0.893	44	0.020		
2	-origine maternelle	2.562	1	2.562	276.90	$< 10^{-3}$
	-Mères sur un même cytoplasme	0.059	2	0.029	3.19	$< 10^{-3}$
	-résiduelle	0.407	44	0.009		
3	-origine maternelle	1.400	1	1.400	104.73	$< 10^{-3}$
	-Mères sur un même cytoplasme	0.178	2	0.090	6.72	$< 10^{-3}$
	-résiduelle	0.535	40	0.013		
4	-origine maternelle	0.941	1	0.941	82.29	$< 10^{-3}$
	-Mères sur un même cytoplasme	0.273	2	0.137	11.95	$< 10^{-3}$
	-résiduelle	0.503	44	0.011		

Les groupes de femelles soeurs ( $S_1$ ,  $S_2$ ) et ( $S_3$ ,  $S_4$ ) réagissent à un même pollinisateur de façon hétérogène. Cependant, une hiérarchisation des effets par l'analyse de variance, montre que la variation intragroupe est faible devant la variation intergroupe, ce qui signifie que deux femelles ségrégent de façon plus similaire si elles sont issues de la même mère (Figure 1.10). Il est malheureusement impossible de distinguer la part de la variation due à l'information cytoplasmique, de celle due à l'information nucléaire également héritée de la "grand mère".

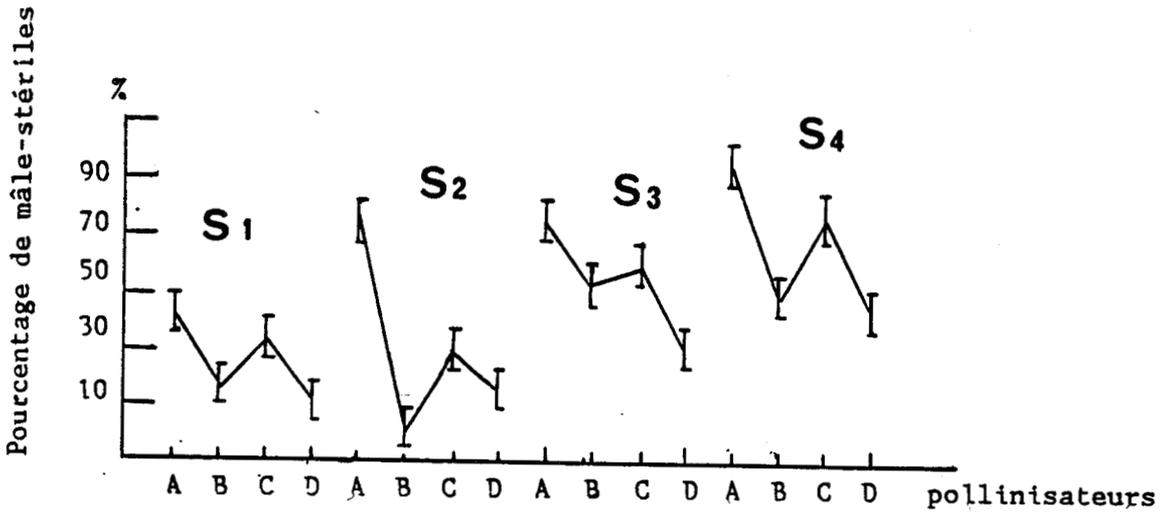
(iii) Un déterminisme génétique à effets complexes.

Un des intérêts de ce type d'analyse est, sans doute, de pouvoir réaliser une hiérarchie des composantes impliquées dans l'expression du phénotype sexuel. Si l'environnement exerce une influence significative, celle-ci reste mineure face à l'influence majeure de la composante génétique.

L'ensemble de ces remarques et de ces observations ne permet pas la proposition d'un modèle génétique synthétique, digénique de stérilité mâle, qui puisse rendre compte des observations mentionnées dans les différents travaux publiés depuis les premiers résultats de Owen (1942): le nombre et le type de gènes, intervenant dans la CMS de la betterave, restent encore inconnus.

Cependant, une synthèse des résultats est possible, au sens où certains résultats sont bien établis aujourd'hui, et sont reproductibles quelles que soient les conditions

Figure 1.10 : Résultats de KNAPP (1969): variations des pourcentages de mâle-stériles dans la descendance des femelles  $S_1$ ;  $S_2$ ,  $S_3$  et  $S_4$  croisées par les hermaphrodites A B C D et observées la même année (1965).



environnementales.

b) Points clés pour un modèle génétique chez *Beta vulgaris*

Parmi les différentes conclusions avancées sur la génétique de la stérilité mâle chez *Beta vulgaris*, un certain nombre de points semblent bien établis.

(i) Le déterminisme nucléocytoplasmique.

Il s'agit du résultat fondamental des travaux de Owen (1942); la stérilité qu'il a découverte et introduite dans les schémas de sélection de la betterave sucrière, est le résultat de l'interaction entre la composante cytoplasmique, transmise par voie maternelle, et la composante nucléaire, transmise de façon biparentale. Les résultats des croisements réciproques complètement déséquilibrés (Tableau 1.3) ainsi que ceux des différents "back-crosses" ne peuvent s'interpréter que dans le cadre d'un déterminisme nucléocytoplasmique. On peut mentionner que la stérilité mâle nucléaire est également connue dans cette espèce (Owen 1952); elle est utilisée en amélioration, dans des programmes de sélection récurrente (Bosemark, 1970; Doney et Theurer, 1978) mais il s'agit d'un mécanisme différent et indépendant du premier (Owen, 1952).

(ii) Plusieurs génotypes femelles.

Parmi toutes les critiques que l'on peut opposer au modèle théorique de Owen, la définition du génotype femelle unique

homozygote récessif, est la plus déterminante. Plusieurs séries de résultats de croisements contrôlés, réalisées par différents auteurs (dont Owen lui même) avec de "bons mainteneurs" sont regroupées dans le tableau 1.9. Les ségrégations, obtenues dans les descendance des femelles, sont significativement différentes; seul un déterminisme polygénique du phénotype femelle avec plusieurs combinaisons génétiques possibles pour le même phénotype, peut rendre compte de l'hétérogénéité des résultats.

(iii) Des processus divers de restauration de la fertilité à action indépendante

Les résultats cités dans la bibliographie concernant *Beta vulgaris*, ainsi que des résultats obtenus chez d'autres espèces (Van Damme, 1984), suggèrent que plusieurs processus génétiques indépendants, peuvent conduire à la restauration de la fertilité, à partir d'une stérilité provoquée par le même réarrangement mitochondrial. Chaque processus mono ou polygénique étant suffisant, à lui seul, pour assurer la restauration de la fertilité (figure 1.11).

- Theurer (1970), tout en mentionnant la grande difficulté qu'il y a à trouver de bons restaurateurs, a pu sélectionner une lignée de betterave rouge (table beet Ruby Queen), possédant à l'état homozygote, un gène dominant Rf de restauration de la fertilité. Le nombre de cas de restauration complète de la descendance de femelles, observés en F<sub>1</sub>, (Tableau 1.10) démontre qu'il existe, au moins, un mécanisme monogénique de restauration

Tableau 1.9 : Variations des fréquences des différents phénotypes Femelles (F), Intermédiaires (I) et Hermaphrodite (H) dans les descendance de différentes femelles croisées par des hermaphrodites clonés.

Auteur	Année	Mère		Père		descendance				Tests	
		Référence	Phénotype	Référence	Phénotype	F %	I %	H %	N	Statistiques (*)	
Owen	1949	85 43	cms	181	H	76	14	10	21	ddl = 4 G(Williams) = 21.53 * p < 0.001	
		85 50	"	"	"	67	20	13	15		
		85 72	"	"	"	100	0	0	20		
		05 47	"	"	"	100	0	0	45		
		05 59	"	"	"	88	12	0	40		
Nagao et Kinoshita	1962	K3 6	cms	192-12	H	73	27	0	22	ddl = 3 G(Williams) = 19.41 * p < 0.001	
		M 19	"	"	"	70	27	3	37		
		M 2	"	"	"	33	48	19	21		
		M 17	"	"	"	23	68	9	22		
			K5 2	"	192-11	H	15	68	17	41	ddl = 2 G(Williams) = 9.63 * p < 0.01
			M 19	"	"	"	3	82	15	40	
			M 2	"	"	"	0	54	46	41	

(\*): la comparaison des descendance est faite en regroupant Femelles / (Intermédiaires et hermaphrodites).

Figure 1.11. Représentation des différents processus indépendants pouvant permettre la restauration de la fertilité chez Beta vulgaris

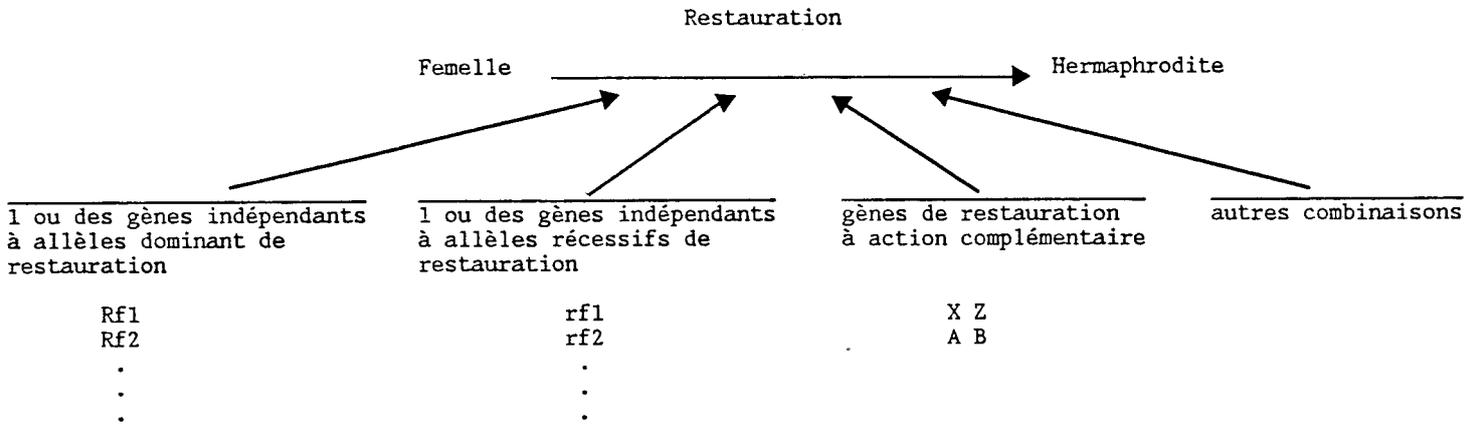


Tableau 1.10 : Résultats de Theurer : Argument en faveur de l'existence d'un gène Rf dominant de restauration de la fertilité: Observation de différentes F<sub>1</sub> du croisement : SLC (Femelle) x US201 (Restaurateur de fertilité) montrant une restauration complète de la fertilité.

Croisement	Phénotypes des descendants		Total
	Mâle stérile	Mâle fertile	
SLC CMS x US201	1	0	113
" "	2	0	32
" "	3	0	30
" "	4	0	38
" "	5	0	131
" "	6	0	12
" "	7	0	38
" "	8	0	46
" "	9	0	96
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>536</b>	<b>536</b>

d'après Theurer 1969

de la fertilité chez *B.vulgaris*.

- La plupart des résultats des croisements de Owen, suggère des mécanismes de restauration complémentaires, la restauration pouvant, dans certains cas, nécessiter plusieurs gènes pour le même mécanisme, chaque gène étant incapable, à lui seul, de réaliser la restauration. C'est le cas du croisement de femelles par des intermédiaires, produisant suffisamment de pollen, pour réaliser le croisement. Les descendances de ces femelles contiennent une part importante d'hermaphrodites; on peut supposer qu'il y a chez la femelle et l'intermédiaire, les gènes nécessaires à la restauration, qui, indépendamment, sont inactifs, mais conjugués peuvent restaurer la fertilité mâle. Ceci est en accord avec les relations d'épistasie ou de complémentarité entre caractère hermaphrodite et intermédiaire: des cas d'épistasie ont été signalés (Bliss et Gabelman, 1965).

- Les résultats de certains croisements de femelles par des hermaphrodites, ou des intermédiaires, donnent, dans les descendances, des ségrégations de femelles/hermaphrodites de type 3:1, 7:1 ou 9:7. Ces ségrégations sont compatibles avec un déterminisme récessif de la restauration (Owen 1945, Nagao et Kinoshita 1962).

*Comment comprendre le "succès" du modèle de Owen et du modèle digénique?*

L'ensemble des modèles génétiques proposés s'inscrit dans le cadre d'un déterminisme digénique de la restauration de la fertilité (Tableau 1.11). La raison principale tient sans doute au mode de sélection des mainteneurs, qui sont choisis, ou rejetés, après indexation sur une femelle possédant la CMS Owen et dont le principe avait été donné par Bolz (1968).

Le schéma de sélection est le suivant (fig 1.9): en première année, les hermaphrodites à tester sont croisés avec une femelle CMS annuelle; dans le même temps, ces hermaphrodites sont clonés et conservés in vitro. En seconde année, les descendance des croisements sont observées pour le phénotype sexuel: si la descendance est uniformément mâle-stérile, alors l'hermaphrodite "Type 0", qui a servi au croisement, sera multiplié végétativement à partir du clone conservé in vitro, et introduit dans un schéma de sélection. Dans le cas contraire, si la descendance ségrège, l'hermaphrodite et son clone in vitro seront éliminés.

La pratique d'un tel programme conduit à la sélection de quelques loci qui permettent le maintien de la stérilité. Il est possible, dans ces conditions, de comprendre pourquoi les résultats de croisement peuvent apparaître cohérents et compatibles, avec un modèle de restauration simple à 1 ou 2 loci.

Tableau 1.11.: Récapitulatif des variations des correspondances génotypes/ phénotypes dans le cadre d'un modèle digénique

GENOTYPES	AUTEURS			
	OWEN 1942	HOGABOAM	BLISS et GABELMAN	BOLZ
AABB	H	H	H	H
AaBB	I <sub>2</sub>	I <sub>2</sub>	H	I
AABb	I <sub>2</sub>	H	H	I
AaBb	I <sub>2</sub>	I <sub>1</sub>	H	I
AAbb	I <sub>1</sub>	H	H	Fe
Aabb	I <sub>1</sub>	I <sub>1</sub>	H	Fe
aaBB	I <sub>1</sub>	Fe	I	Fe
aaBb	I <sub>1</sub>	Fe	I	Fe
aabb	Fe	Fe	Fe	Fe
Caractéristiques	2 gènes à effets cumulatifs codominance partielle	1 gène de restauration dominant 1 gène modifi- cateur	Epistasie dominante	double épistasie récessive avec codominance partielle

3. LE DETERMINISME GENETIQUE DE LA STERILITE MALE CHEZ *Beta maritima*.

a) Analyse de la bibliographie.

La stérilité mâle a été décrite chez *Beta maritima* par différents auteurs.

Nagao et Kinoshita (1962) et Kinoshita et Takahashi (1972) ont trouvé de la stérilité mâle dans une lignée de betterave *Beta maritima*. Selon ces auteurs, il s'agirait d'une stérilité de type nucléaire, déterminée par un gène ms récessif, indépendant des gènes de restauration de la stérilité de Owen. Ils constatent, par ailleurs, que le développement du tapetum ne suit pas la même évolution que celui observé dans la CMS Owen.

Une étude critique de ce travail, nous conduit à remettre en cause la conclusion d'une stérilité nucléaire dans ce cas, pour deux raisons essentielles:

(i) L'analyse génétique réalisée par ces auteurs se fonde sur le résultat de croisements réciproques, pour lesquels les ségrégations des descendances ne présentent pas de différence majeure. Ces croisements réciproques, ont été réalisés entre un Type 0 (H-19) de *Beta vulgaris* et un descendant hermaphrodite de la femelle BM-2 *Beta maritima*.

Les résultats observés et présentés dans le tableau 1.12A montrent que la descendance récoltée sur le type 0 H-19 cultivé

Tableau 1.12: Résultats de Kinoshita (1972): étude de la stérilité mâle découverte chez Beta maritima.

A: croisements réciproques entre hermaphrodites :  
B.maritima issu de femelle et B.vulgaris mainteneur  
de stérilité.

Croisement	Phénotypes des descendants						Total
	H N	SSa	MSIV	MSIII	MSII	Fe MSI	
Bm 2-11 x H 19	70	3	1	0	0	0	74
Réciproque: H 19 x Bm 2-11	41	0	1	0	0	0	42

B : Croisement entre B.maritima femelle (Bm2) et B.vulgaris  
mainteneur de stérilité (H 19): arguments en faveur de la présence  
des allèles de restauration de la fertilité mâle de B.maritima  
chez B.vulgaris.

Croisement	Descendants		Total
	Mâle fertile N + SSa	Mâle stérile MS I - IV	
Bm2 x H 19	Obs: 226	82	308
	Cal: 231	77	308

goodness of fit (3:1)  $X^2 = 0,0046840$  df=1 p= 0,95  
D'après Kinoshita 1962

est entièrement fertile à un intermédiaire près et que celle récoltée sur l'hermaphrodite sauvage Bm 2-13, présente une majorité d'hermaphrodites et quelques intermédiaires.

On peut, en fait, observer que, si conformément à ce qui est dit les ségrégations des descendance des croisements réciproques sont différentes, le fait d'obtenir dans les 2 cas une majorité d'hermaphrodites, peut s'expliquer, pour chaque descendance, dans le cadre d'un déterminisme nucléocytoplasmique.

- La descendance récoltée sur le type 0 H-19, croisé par BM-2-13 est presque entièrement hermaphrodite: H-19 est mainteneur de stérilité de la CMS Owen, ce qui signifie qu'il possède les gènes du maintien de la stérilité du cytoplasme stérile OWEN, mais qu'il a: (i) soit, un type cytoplasmique "normal" ayant une structure telle qu'il ne peut donner de mâle stérile quelle que soit la combinaison nucléaire qui lui est associée; (ii) soit, les gènes de restauration fixés pour son propre cytoplasme. Dans ce cas, quel que soit le pollinisateur avec lequel on le croise, la descendance de cet hermaphrodite sera, au mieux, hétérozygote pour les gènes de restauration, donc probablement entièrement hermaphrodite.

- La descendance de Bm-2-13 croisé par H-19 est pratiquement, totalement hermaphrodite (4 intermédiaires sur un total de 74 plantes observées). Dans ce cas, le fait de ne trouver qu'une majorité d'hermaphrodites dans la descendance, n'est pas surprenant, dans la mesure où, comme cela a été observé (Boutin

1987, cette thèse), les gènes de restauration de la stérilité sauvage, ont pu être fixés, ou conservés, avec de fortes fréquences chez la betterave cultivée. Nos propres résultats montrent que certains mainteneurs de stérilité de Owen peuvent être d'excellents restaurateurs de la fertilité de *Beta maritima* (tableau 1.14). En fait, dans l'étude citée, l'analyse en F<sub>2</sub> d'un croisement BM-2 femelle par H-19 (tableau 1.12B), montre une ségrégation d'hermaphrodites et de femelles de type 3: 1, ce qui montre que le type O H-19 possède, effectivement, les gènes de restauration de *Beta maritima*.

(ii) l'analyse phénotypique révèle la présence, dans une même descendance, de types hermaphrodites, intermédiaires et femelles. L'existence et le nombre de types intermédiaires observés est plutôt le signe d'une stérilité de type nucléocytoplasmique (Owen, 1952) .

Un second travail publié par Coe et Stewart (1977), présente la découverte chez *Beta maritima*, de plantes mâle-stériles sur les côtes anglaises de la Mer du Nord près de Plymouth. Ces auteurs ont déterminé, à l'aide de croisements, que cette stérilité mâle était de nature nucléocytoplasmique. Ils ont également trouvé de bons mainteneurs de cette stérilité, chez des *Beta maritima*, provenant de populations naturelles du Danemark. Les résultats des croisements entre mâle-stériles cultivés et hermaphrodites sauvages, issus des populations danoises, montrent, dans la majorité des cas, des descendance constituées uniquement de mâle-stériles. Ces résultats sont intéressants et montrent

qu'il n'y a pas sélection des gènes de restauration de cytoplasmes stériles (en l'occurrence le cytoplasme stérile de *Beta maritima* des populations anglaises et le cytoplasme stérile de *Beta vulgaris*) si ces cytoplasmes sont absents de la population.

Les dernières études sur *B.maritima*, ont été réalisées sur des plantes stériles d'origine diverses (Hallden *et al.*, 1988), ou sur des plantes "fertiles" et "stériles", issues de populations naturelles bien définies (Boutin *et al.*, 1988); les comparaisons des profils de restriction mitochondriaux, montrent qu'il existe des diverses formes du cytoplasme stérile chez cette espèce, et que ces formes sont toutes différentes de la CMS Owen, ainsi que du type O. Ces aspects moléculaires seront développés au chapitre II.

b) Etude au laboratoire de Lille.

La stérilité mâle a été observée en différents lieux des côtes françaises de la Manche et de la Mer du Nord.

Une première prospection, réalisée en relation avec la maison de sélection Florimont Desprez, a montré l'existence de plantes femelles à des fréquences de l'ordre de 5% dans la baie du Mont St Michel (Varinard, 1983); d'autres populations ont été étudiées plus au nord, dans les estuaires de la Canche (Boutin, 1984), de l'Authie et de la Somme (Dufermont, 1987). Dans la baie de la Canche, une population contenant 60% de femelles, a été étudiée.

Les difficultés mentionnées ci-dessus, pour la connaissance du contrôle génétique de la stérilité mâle chez *Beta vulgaris*, nous ont conduit, après des tentatives infructueuses de croisements, d'une part à limiter nos ambitions quant aux réponses apportées sur le déterminisme génétique et, d'autre part, à prendre d'autres moyens techniques (clonage de plantes, croisement de clones sous tunnel d'isolement) pour réaliser une étude de génétique classique de la stérilité mâle, chez cette espèce. Ces croisements sont en cours, à la Station INRA de Dijon.

c) Résultats discussion.

- Croisements *Beta maritima* X *Beta maritima*

Nous ne disposons pas, à l'heure actuelle, des résultats de croisements réciproques entre différents hermaphrodites, nous permettant de conclure, sans ambiguïté, à la question du type de déterminisme génétique présent chez les plantes que nous avons étudiées. Cependant, nous disposons d'arguments qui vont dans le sens d'un déterminisme nucléocytoplasmique de la stérilité mâle chez les *Beta maritima* que nous avons observées.

Les résultats de fécondation libre, en populations naturelles (Boutin-Stadler, 1987), ainsi que les données de l'analyse moléculaire du DNA mitochondrial, ont établi qu'il existe, dans les populations naturelles que nous avons étudiées, au moins deux types de cytoplasmes:

- un cytoplasme ségrégeant, qui présente un profil de restriction Sall (S) et permet aux individus qui le portent de ne fournir que 2 ou 3 types d'individus (femelles, intermédiaires fonctionnellement femelles, hermaphrodites) dans leur descendance

- un cytoplasme non ségrégeant qui présente un profil de restriction Sall (N) et permet aux individus qui le portent de ne fournir qu'un seul type de descendant: hermaphrodite (Boutin *et al.*, 1987).

Deux croisements réciproques, chacun entre un hermaphrodite ségrégeant (HS, à cytoplasme S) et un hermaphrodite non ségrégeant (HNS, à cytoplasme N), n'ont réussi que d'un côté: seules les HS ont porté des graines alors qu'aucune graine n'était portée par les HNS.

La descendance sur HS a ségrégé avec le pollen des HNS (tableau 1.13) tandis que les descendants des HNS ne donnent, par définition (quel que soit le type de croisement) que des hermaphrodites. Ce type de descendance homogène a été observé en fécondation libre d'une part dans la descendance des mères, et d'autre part, dans la descendance de plusieurs frères de ces HNS. Ainsi, bien que ne disposant pas formellement d'un croisement réciproque, les résultats décrits ci-dessus en rassemblent tous les éléments et fournissent des ségrégations disymétriques. Ainsi les résultats de fécondation libre et les données moléculaires, associées aux résultats des croisements contrôlés, nous permettent de dire que le déterminisme génétique de la stérilité mâle chez *Beta maritima* est, très probablement,

Tableau 1.13 : Résultats de croisements: B.maritima X B.maritima.  
 Mise en évidence de bon mainteneurs de stérilité parmi  
 les hermaphrodites non ségrégeants.

N° de croisement	Mère		Père		Descendants			
	N°	Phénotype	N°	Phénotypes	Fe	IFe	H	N A
2A-1	B52-10	Fe	A46-15	Hns	7	3	1	11
Fécondation libre	A46-	Hns			0	0	80	80
4D-2	B98-49	Fe	B 2-12	Hns	29	5	3	39
Fécondation libre	B 2-	Hns			0	0	27	27

Les plantes des familles A46 et B2 ont donné en fécondation libre des descendance homogènes constituées uniquement d'hermaphrodites.

nucléocytoplasmique.

De plus, les résultats des 2 croisements du Tableau 1.13 montrent que des plantes appartenant à des familles non ségrégeantes, n'exprimant pas, dans les cas observés, la stérilité mâle peuvent se montrer de bons mainteneurs de stérilité. Ces hermaphrodites qui ont, soit les gènes de restauration fixés pour leur propre cytoplasme, soit un cytoplasme "Normal" qui ne peut exprimer la stérilité, possèdent peu de gènes de restauration de la fertilité du cytoplasme des femelles.

Croisements *Beta maritima* X *Beta vulgaris*.

Nous ne disposons pas encore des résultats du croisement réciproque, entre hermaphrodite sauvage sur le cytoplasme S et hermaphrodite cultivé sur le cytoplasme de la CMS Owen; ces croisements sont en cours à la Station INRA de Dijon.

Pour l'instant, les croisements de femelles *Beta maritima* par des hermaphrodites Type 0, mainteneurs de la stérilité chez *Beta vulgaris* (Tableau 1.14 ) montrent que:

- différentes femelles sauvages, issues du même croisement, donc soeurs sur le même cytoplasme, croisées par la même lignée type 0, en isolement sous tunnel, peuvent donner des ségrégations significativement différentes: c'est-à-dire que chez *Beta maritima*, il y a plusieurs combinaisons nucléaires, correspondant au phénotype femelle.

Tableau 1.14 : Résultats de croisements B.maritima X B.vulgaris  
Evaluation des capacités de maintien de la stérilité des  
Types 0 cultivés sur les femelles sauvages.

N° de la femelle	N° du cytoplasme maternel	N° du Type 0	descendants			N
			Fe	IFe	H	
6U-1	B 9	1009	24	0	0	24
6U-4	B 9	1009	11	2	15	28
7U-21	B 9	162	0	3	45	48
20U-7	A32	1004	3	0	29	32
20U-8	A32	1004	3	0	26	29
B31-82	B31	1024	13	1	0	14
A36-16	A36	131	0	10	25	35

- certains hermaphrodites cultivés, mainteneurs de stérilité, croisés avec des femelles sauvages maintiennent bien la stérilité sauvage, mais la plupart, sont de "bons restaurateurs" des femelles sauvages, c'est-à-dire que la descendance de la femelle sauvage est majoritairement hermaphrodite. Cela signifie que les gènes nucléaires, impliqués dans le maintien de la stérilité mâle, sur le cytoplasme OWEN, ne sont pas actifs, ou sont insuffisants pour maintenir la stérilité mâle chez *Beta maritima*. les gènes de restauration de la fertilité de la betterave sauvage sont présents chez la cultivée. Ce dernier point n'est pas surprenant, dans la mesure où les croisements de femelles cultivées par des hermaphrodites sauvages, ont été nombreux, soit pour introduire des caractères de résistance de la sauvage dans la cultivée, soit pour réintroduire de la variabilité génétique dans les lignées cultivées.

Si l'on ajoute à ces résultats, les données de comparaison moléculaire des cytoplasmes (Boutin, *et al.* 1987), on peut dire que la stérilité mâle découverte chez *Beta maritima* est probablement différente de celle utilisée chez *Beta vulgaris*.

#### C.-CONCLUSIONS.

La variabilité des phénotypes sexuels et la grande variabilité génétique qu'elle laisse supposer constituent les traits marquants de la stérilité mâle chez *Beta vulgaris*, *Beta maritima* et un certain nombre d'autres espèces (Kaul, 1988

p.111).

Le contrôle génétique complexe de la stérilité mâle, chez les espèces gynodioïques est supposé depuis longtemps: ce phénomène a conduit certains auteurs à définir deux types de gynodioécie (Correns, 1928): la paragynodioécie, qui caractérise les espèces où la stérilité mâle est à déterminisme simple, et la gynodioécie vraie, qui intéresse les espèces pour lesquelles la stérilité mâle est sous déterminisme génétique complexe. A ce titre, il semble que *Beta maritima* puisse être considérée comme une espèce gynodioïque vraie.

Les modèles de biologie des populations, tournés vers l'explication de l'apparition et du maintien à forte fréquence de la stérilité mâle dans les populations sauvages, supposent un conflit entre noyau et cytoplasme (Cosmides et Tooby, 1981; Gouyon et Couvet, 1985): l'information cytoplasmique est transmise par voie maternelle, l'information nucléaire de façon biparentale; toute mutation du génome cytoplasmique qui permet une meilleure allocation des ressources à la fonction femelle (le fait de ne pas faire de pollen, peut apparaître un bon moyen) sera sélectionnée. Dès lors, toute mutation nucléaire visant à restaurer la fonction mâle sera, à son tour, sélectionnée. Cette vision évolutive de la stérilité mâle va à l'encontre de toute appellation du type "gènes nucléaires de stérilité", qui semble donner au noyau une action stérilisante; en fait, lorsque la stérilité apparaît par mutation de la mitochondrie, l'ensemble des loci nucléaires sont à l'état de gènes mainteneurs de

stérilité, et toute mutation au niveau de ces gènes sera potentiellement restauratrice; cela signifie que l'on identifiera un locus impliqué dans la stérilité mâle, à partir de la mutation restauratrice. En fait, il serait plus correct de parler de gènes nucléaires de restauration et, par analogie avec d'autres études génétiques, d'allèles "sauvages" (dominants ou récessifs) de maintien de la stérilité, et d'allèles restaurateurs (dominants ou récessifs) de la fertilité à ces loci.

Selon cette hypothèse, la stérilité mâle serait le fait de mutations cytoplasmiques sélectionnant des mutations nucléaires restauratrices de la fertilité mâle. Cette idée suggère que des mécanismes générateurs de nouveauté de l'information génétique ont du être sélectionnés, en particulier dans le compartiment mitochondrial, qu'un polymorphisme cytoplasmique doit exister dans les populations où la stérilité existe, et qu'il lui correspond un polymorphisme nucléaire. Probablement, différents mécanismes nucléocytoplasmiques conduisant à la stérilité mâle sont susceptibles d'être rencontrés dans les populations naturelles.

C'est la recherche du polymorphisme cytoplasmique, associée à la recherche de techniques nouvelles de compréhension de la stérilité mâle, qui nous ont conduit à aborder l'étude des aspects moléculaires de la stérilité mâle chez *Beta maritima*.



## CHAPITRE II:

### LES BASES MOLECULAIRES DE LA STERILITE MALE

ET

### LA VARIABILITE CYTOPLASMIQUE CHEZ BETA

Les données de la génétique classique ont établi l'interaction noyau-cytoplasme dans l'expression de la stérilité mâle nucléocytoplasmique. Les techniques de la biologie moléculaire permettent une approche directe des mécanismes cellulaires conduisant à l'expression de la stérilité mâle. Dans ce chapitre, nous présenterons, dans une première partie, les acquis de la biologie moléculaire concernant l'apparition de la stérilité mâle et les réarrangements moléculaires qui la génèrent. A la base de la stérilité mâle, il y a la variation de l'information cytoplasmique, c'est pourquoi nous présenterons les résultats obtenus chez *Beta maritima* concernant le polymorphisme cytoplasmique et sa répartition dans les populations naturelles. La signification de ce polymorphisme sera discutée.

#### A.- LES BASES MOLECULAIRES DE LA STERILITE MALE CHEZ LES PLANTES SUPERIEURES.

La majorité des eucaryotes possèdent deux compartiments contenant de l'information génétique: le noyau et le cytoplasme, ou, plus précisément, le noyau et les organelles contenus dans le

cytoplasme. Chez les plantes supérieures il faut distinguer principalement deux types d'organelles: la mitochondrie et le chloroplaste.

La mitochondrie et le chloroplaste sont essentiels à la vie de la plante puisqu'ils sont le site de la conversion de l'énergie. Leur rôle métabolique fait que tout changement au cours de la vie de l'individu est lié à des changements importants dans le nombre, la structure ou l'activité de l'un des deux organelles. Par exemple le nombre moyen de mitochondries par cellule est compris entre 110 et 140 (Ward *et al.*, 1981); il peut atteindre  $10^3$  dans les cellules de cotylédon (in Lonsdale *et al.*, 1988).

Bien que les mitochondries et les chloroplastes contiennent leur propre DNA spécifique, la synthèse d'un organelle fonctionnel nécessite l'action coordonnée des informations du noyau et de l'organelle; par exemple la mitochondrie ne code que 10% de l'information nécessaire à son fonctionnement (Leaver *et al.*, 1985).

#### 1. ORGANISATION DU GENOME CHLOROPLASTIQUE.

Le chloroplaste est, aujourd'hui, l'organelle le mieux connu pour les mécanismes de sa biogénèse et le nombre de protéines de structures codées par sa propre information: 150 chez le tabac (Umesono et Oseki, 1987). Les ouvrages de référence en ce domaine existent depuis longtemps et sont complétés par des ouvrages plus

récents (Gilham, 1978; Kirk et Tilney-Basset, 1978; Palmer, 1985; Crouse *et al.*, 1985).

La cellule de la feuille contient plusieurs milliers de copies, toutes identiques, du DNA chloroplastique (ctDNA). Le nombre de chloroplastes par cellule varie ainsi que le nombre de copies du chromosome chloroplastique dans chaque chloroplaste: de 20 à 200 copies (in Palmer, 1987). L'organisation des gènes du chloroplaste apparaît comme un mélange de modèles nucléaires eucaryotes et procaryotes: l'expression des gènes chloroplastiques est nettement de type eucaryote mais toutes les séquences de régulation essentielles (site promoteur, site d'accrochage des ribosomes) sont identiques à celles des eubactéries. Le chloroplaste, contrairement à la mitochondrie, possède le code génétique universel.

Le génome chloroplastique est porté par un chromosome unique, circulaire, de poids moléculaire compris entre 120 et 217 Kb (Whitfeld et Bottomley, 1983; Crouse *et al.*, 1985; Palmer, 1985). Chez *Beta vulgaris* la taille du génome est de 147.3 Kb (Brears *et al.*, 1986) ou 148.5 Kb (Kishima *et al.*, 1986). L'autre caractéristique du chromosome du chloroplaste est la présence systématique d'une séquence inversée répétée. Les seules exceptions connues appartiennent à la famille des Légumineuses (Koller et Delius, 1980; Chu et Tewari, 1982; Palmer *et al.*, 1987).

Les variations de taille du génome sont associées aux variations de taille de la séquence répétée qui peut englober une partie plus ou moins importante du ctDNA. On observe que plus le ctDNA du chloroplaste est grand, plus la séquence inversée répétée est grande, donc plus la zone de recombinaison est importante, ce qui contribue à la stabilité du génome chloroplastique.

Pourtant, ce qui différencie le génome chloroplastique du génome mitochondrial des plantes, c'est l'évolution "rapide" de la séquence primaire (Palmer, 1985; Palmer *et al.*, 1987) et la très grande stabilité de sa structure secondaire du ctDNA (Lonsdale *et al.*, 1988).

La mitochondrie reste moins bien connue. Son étude commencée plus tardivement sera exposée plus en détail.

## 2. CARACTERISTIQUES DE L'INFORMATION MITOCHONDRIALE.

Les mitochondries sont présentes chez la plupart des organismes eucaryotes, bien que plus de mille espèces de protozoaires et quelques champignons, n'en possèdent pas (Cavalier-Smith, 1987). Le génome mitochondrial des Métazoaires est connu pour sa remarquable uniformité en taille (15 à 17 Kb) et en structure: il forme un cercle unique. Chez les autres organismes unicellulaires et pluricellulaires la taille et la structure du génome mitochondrial peuvent varier extraordinairement. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, algue

unicellulaire, le chromosome est linéaire et d'une taille de 15.8 Kb (Boer et Gray, 1988 cités dans Lonsdale *et al.*, 1988). La structure linéaire se rencontre chez d'autres organismes: *Tetrahymena thermophila* (Morin et Cech, 1986), la levure *Candida rhagii* (Kovac *et al.*, 1984). Chez les champignons, le génome mitochondrial est circulaire, de taille variant de 19 à 176 Kb (Clark-Walker *et al.*, 1981).

Le génome mitochondrial des plantes supérieures est de taille très variable, comprise entre 200 et 2400 Kb (Ward *et al.*, 1981). La complexité de l'organisation semble proportionnelle à la taille du génome.

a) Organisation de l'information mitochondriale.

le génome mitochondrial est constitué de trois types de molécules: des plasmides circulaires (i), des plasmides linéaires (ii) et le chromosome principal circulaire, encore appelé cercle maître .

(i) Les plasmides circulaires, encore appelés minicercles, sont fréquemment associés au génome mitochondrial des plantes supérieures (voir revue Sederoff, 1984; Pring et Lonsdale, 1985). Leur taille varie de 1.3 Kb (Pring *et al.*, 1981) à 2.3 Kb (Chase et Pring, 1985). Ils peuvent prendre des formes multimériques par recombinaison homologue (Dale, 1981; Abbott *et al.*, 1985). Ils ont parfois été associés à des types cytoplasmiques particuliers: par exemple, chez *Beta vulgaris*, le minicercle "a" est

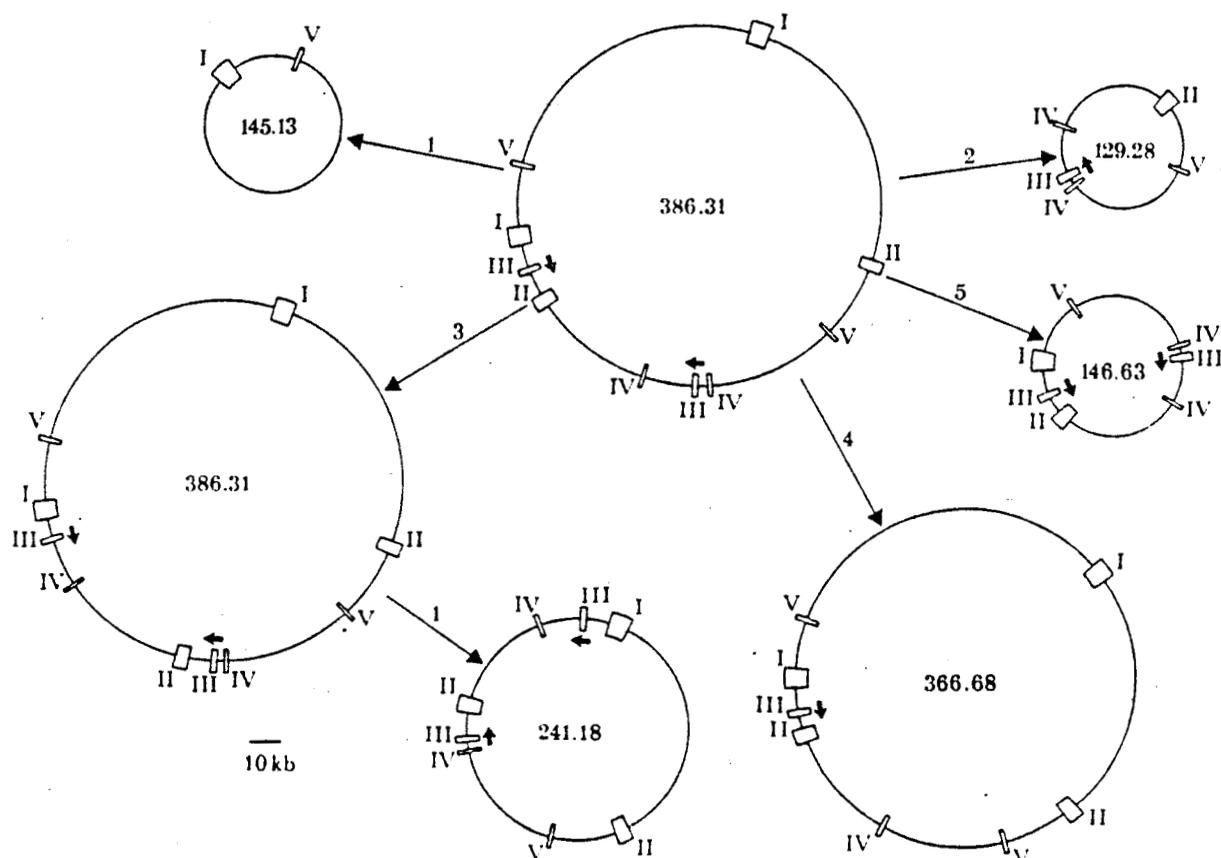
caractéristique du cytoplasme "sterile" et les minicercles "c" et "d" le sont du cytoplasme "fertile" (Powling, 1981; Hansen et Marker, 1984; Thomas, 1986, Duchenne, 1987). Cependant, le rôle actif des minicercles dans la stérilité n'a jamais été démontré.

(ii) Les plasmides linéaires d'une taille variant entre 2.1 Kb et 11.4 Kb ont été identifiés chez 6 espèces de plantes supérieures (pour revue voir Lonsdale *et al.*, 1988), dont deux seulement chez les Dicotylédones (Palmer, 1984; Pannenbecker *et al.*, in prep cf annexe 3). Les caractéristiques principales de leur organisation sont la présence aux extrémités de séquences inversées répétées ainsi que de protéines associées à la partie 5' terminale. L'hérédité de ces plasmides est surprenante, l'expression dans la descendance maternelle serait le résultat de l'interaction nucléocytoplasmique (Kemble *et al.*, 1986; 1988): dans le genre *Brassica*, dans la descendance d'un croisement ou dans les clones issus de la fusion de protoplastes, à partir de plantes ou de cellules à mitochondries de type  $M_1(-)$  ne contenant pas le plasmide, et de plantes ou cellules à mitochondries  $M_2(+)$  qui le contiennent, il apparaît, avec des fréquences non négligeables, des plantes à mitochondries  $M_1(+)$  ou  $M_2(-)$ . Kemble *et al* (1986) expliquent ces résultats par le passage de la mitochondrie par la voie paternelle et la régulation nucléaire différentielle de l'expression du génome mitochondrial (chromosome et plasmides): le noyau pourrait permettre la réplication du plasmide paternel et bloquer celle du chromosome mitochondrial paternel.

Dans le cas de *Brassica* (Kemble *et al.*, 1986), de *Beta maritima* (Pannenbecker, in prep) et de *Sorghum bicolor* (Chase et Pring, 1986), aucune homologie de séquences n'existe entre le chromosome principal et les plasmides. En revanche, chez le maïs les séquences terminales des plasmides S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> présentent une homologie avec le chromosome principal, ce qui a pour conséquence de permettre des recombinaisons entre ces deux parties du génome mitochondrial conduisant à la linéarisation du chromosome principal (Schardl *et al.*, 1984; Schardl et Lonsdale, 1985).

(iii) Le chromosome mitochondrial proprement dit a été cartographié chez 10 espèces différentes (voir pour revue Lonsdale *et al.*, 1988). Le génome du maïs constitue le plus gros génome (570 Kb), pour lequel la carte de restriction a été faite (Lonsdale *et al.*, 1984). La particularité de ces chromosomes circulaires est qu'ils contiennent, au moins, une séquence répétée. Chez le maïs et le blé, ces séquences répétées sont inversées, c'est à dire qu'elles n'ont pas la même direction de lecture sur le chromosome: elles génèrent des formes isomères. La carte de restriction montre une organisation multicirculaire du génome: chaque cercle subgénomique dérive du maître cercle par recombinaison entre les séquences répétées (Fig 2.1). Il est également démontré que le maître cercle et tous les cercles subgénomiques peuvent former des multimères par recombinaison intermoléculaire.

Fig. 2.1.: Organisation du génome de *Beta vulgaris* CMS



The mitochondrial genome of sugar beet. Physical mapping studies with overlapping cosmid clones have identified the circles illustrated. In addition to the two isomeric forms of master circle which result from recombination between the single pair of inverted repeats (III), recombination between the pairs of direct repeats leads to the formation of the smaller subgenomic circles. Many other circular forms arising from both intra- and intermolecular recombination events between repeats can be predicted but are not illustrated.

D'après Brears *et al.* 1988

- b) variation de la structure secondaire et conservation de la séquence primaire du mtDNA, ou comment générer de la nouveauté génétique tout en préservant ses gènes.

La complexité de l'organisation du génome se retrouve dans la complexité des profils de restriction pour lesquels la stoechiométrie des bandes correspondant aux fragments de restriction varie en fonction des recombinaisons entre séquences répétées (Lonsdale, 1984; Quetier *et al.*, 1985), certains fragments peuvent être amplifiés en fonction de leur présence sur plusieurs cercles subgénomiques.

L'organisation du génome mitochondrial ne peut être visualisée comme une structure rigide mais plutôt comme un système dynamique où un mélange complexe de sous-unités génomiques existe (Lonsdale *et al.*, 1988). Les taux de recombinaison inter- et intra-moléculaires sont déterminés par les longueurs des séquences homologues et par la nature des séquences répétées proprement dites (De Zamaroczy *et al.*, 1983).

Le génome mitochondrial apparaît plus stable dans sa structure primaire que le génome chloroplastique. La preuve de ce phénomène a été apportée par la comparaison de la région située entre les gènes tRNA<sup>Pro</sup> et tRNA<sup>Trp</sup> du chloroplaste de blé avec les séquences observées, pour la même région, sur le ctCNA du tabac et de *Marchantia*, ainsi que sur le mtDNA du blé et du maïs (Shinozaki *et al.*, 1986; Ohyama *et al.*, 1986; Marechal *et al.*,

1987). Les séquences observées sur les DNA mitochondriaux de blé et maïs ne divergent que de 7%, alors que celles de la mitochondrie et du chloroplaste du blé divergent de plus de 50 %; ceci a été confirmé par l'observation d'une divergence importante entre les séquences homologues de différents chloroplastes.

La conclusion, dans le cas de figure présenté, est que la séquence chloroplastique, présente dans la mitochondrie, est la relique d'une très ancienne séquence transférée dans la mitochondrie. Le transfert aurait eu lieu avant la divergence du maïs et du blé. Ainsi la séquence de ctDNA transférée aurait été préservée d'une évolution rapide de sa structure primaire alors que, dans le même temps, la copie de cette séquence, restée dans le chloroplaste, aurait pu diverger.

Quelle peut-être la cause de la différence d'évolution de la structure primaire? La mitochondrie et le chloroplaste ont tous deux des séquences répétées et des mécanismes de recombinaisons tout aussi actifs dans les deux cas. En fait, il semble que la différence vienne du fait que les mitochondries, contrairement aux chloroplastes, ont la capacité de fusionner (Stevens, 1981; pour revue voir Lonsdale *et al.*, 1988). Les expériences de fusion de protoplastes donnent des résultats clairs à ce sujet: la fusion de cellules de différentes espèces de tabac (Belliard *et al.*, 1979), pétunia (Young et Hanson, 1987) et *Brassica* pour lesquelles les profils de restriction des ctDNA et mtDNA sont connus, conduisent à des cytoplasmes chimériques contenant les organelles de chacun des deux parents. L'analyse des profils de

restriction des ctDNA et mtDNA des plantes régénérées montre, à quelques exceptions près, que les cellules ont les fragments de restriction mitochondriaux des deux parents avec, en plus, de nouveaux fragments recombines. Il y a recombinaison mitochondriale qui ne peut se comprendre que par contact des deux génomes. Dans le cas du chloroplaste, l'hybride a la copie de l'un des deux parents. Un seul cas de recombinaison chloroplastique a été observée chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Lemieux et Lee, 1987).

Cette capacité à fusionner ou non est essentielle pour l'évolution des deux génomes et la compréhension de mécanismes tels que l'apparition de la stérilité mâle ou la réversion fertile vers stérile et *vice versa*.

A chaque division cellulaire, ou à chaque formation des gamètes, il y a un échantillonnage des organelles. Si une mutation apparaît dans le chloroplaste, et si cette mutation est intéressante pour le chloroplaste, le nombre d'organelles portant cette mutation va augmenter dans la cellule, et peut, par simple effet de tirage au sort, devenir la copie unique dans un ovule, et donc dans l'individu issu de la fécondation de ce gamète et sa descendance. En revanche, dans le cas de la mitochondrie, il peut y avoir mutation, mais la remise en contact de l'information par fusion de différentes mitochondries permet la correction par recombinaison inter-molécules. Ainsi, la mitochondrie possède la double capacité de générer de la nouveauté par duplication de séquence de son DNA (création de gènes chimériques) et de

conserver la séquence primaire de ses gènes par recombinaison.

Un bon exemple du lien qui peut exister entre cette capacité à générer de la nouveauté tout en gardant intacts ses gènes et la stérilité mâle est donné par l'étude de la stérilité mâle nucléocytoplasmique sur le cytoplasme T du maïs et sera développé plus loin (chap2 A4).

### 3. Localisation des gènes cytoplasmiques de stérilité dans la mitochondrie.

Quatre séries d'arguments permettent de situer les gènes cytoplasmiques responsables de la stérilité mâle dans la mitochondrie.

-Les croisements: Rhoades (1950) a été le premier à proposer que le facteur responsable de la stérilité mâle devait se situer au niveau de la mitochondrie et non du chloroplaste. Il a pour cela utilisé le gène *iojap* provoquant la déficience chlorophyllienne chez le maïs, et montré que la cms est indépendante de la présence ou de l'absence des chloroplastes.

-L'analyse des profils de restriction et, par la suite, l'analyse du polymorphisme des fragments de restriction (abréviation anglaise RFLP) des DNA mitochondriaux et chloroplastiques ont permis de montrer qu'il existe systématiquement des différences entre les mitochondries de plantes à cytoplasmes fertiles et stériles ou appartenant à des systèmes nucléocytoplasmiques différents, et peu ou pas

de différences au niveau du chloroplaste. Ceci a été observé chez le maïs entre les cytoplasmes N, T, S et C (Pring et Levings, 1978; Levings et al., 1979), chez le blé (Quetier et Vedel, 1977), chez *Beta vulgaris* (Powling, 1981; 1982), chez *Brassica napus* (Vedel et al., 1982; Vedel et Mathieu, 1983) chez *Petunia hybrida* (Kool, 1983), *Sorghum vulgare* (Pring et al., 1979), *Vicia faba* (Boutry et Briquet, 1981), *Plantago lanceolata* (Rouwendal et al., 1987) et *Thymus vulgaris* (Belhassen, 1989).

-La fabrication de cybrides par la fusion de protoplastes de plantes fertiles et stériles a permis la régénération de plantes fertiles et stériles contenant indépendamment le chloroplaste de l'un ou l'autre parent (Belliard, 1979).

-L'observation des révertants fournit le dernier argument en faveur du rôle de la mitochondrie dans la stérilité mâle. Chez le maïs la réversion d'un cytoplasme stérile vers la fertilité s'est accompagnée de modifications du DNA mitochondrial uniquement (Levings et al., 1980).

#### 4. LA STERILITE MALE SUR LE CYTOPLASME T DU MAIS.

La stérilité mâle cytoplasmique T du maïs est probablement le système le mieux connu aujourd'hui, sinon le seul réellement identifié et documenté.

Son étude et sa présentation ont pour but de permettre:

-de mieux comprendre le fonctionnement de la stérilité mâle au niveau moléculaire,

- de mieux comprendre les mécanismes qui peuvent conduire à son apparition,
- de repérer les ambiguïtés à lever pour conclure à l'implication de certains gènes: l'observation partielle du génome (profils de restriction du mtDNA ou RFLP ou RNA ou protéines) peut conduire à des conclusions fausses.

a) Fonctionnement de la stérilité mâle sur le cytoplasme T du maïs

Il existe chez le maïs 3 ou 4 systèmes de stérilité mâle nucléocytoplasmique: 3 types où la stérilité mâle a été observée: cytoplasmes C, T, S, 1 type où la stérilité n'a jamais été observée: cytoplasme N. Ces différents systèmes sont identifiés depuis longtemps: le cytoplasme T (Texas) a été étudié en 1944 (Rogers et Edwardson, 1952), le cytoplasme S (USDA) a été découvert par Jenkins et utilisé en sélection par Jones (Jones *et al.*, a et b 1957), enfin le cytoplasme C a été découvert par Beckett (1971) dans une source de maïs brésilien.

Ces 3 types cytoplasmiques ont été séparés les uns des autres par croisement réciproque. Les gènes de restauration actifs sur chacun d'eux sont différents (Laughnan et Gabay-Laughnan, 1983). Le plus utilisé des systèmes est la stérilité Texas. Cependant la sensibilité de ce cytoplasme à la toxine du champignon *Helminthosporium maydis* limite son utilisation. Cependant, cette sensibilité a permis, de façon indirecte, une meilleure compréhension des mécanismes pouvant provoquer la stérilité mâle.

(i) Organisation du génome

Le génome du cytoplasme N du maïs est estimé à 570 Kb (Lonsdale *et al.*, 1984). Il contient 6 séquences d'ADN répété, respectivement de poids moléculaire égale à 1, 2, 4, 10, 12 et 14 Kb. 5 de ces séquences sont impliquées dans des phénomènes de recombinaison intra-moléculaire par appariement des régions homologues. Cette possibilité de recombinaison intra-moléculaire génère la diversité observée parmi les cytoplasmes du maïs: diversité entre les groupes (Pring et Levings, 1978) et à l'intérieur des groupes (Levings et Pring, 1977; Mac Nay *et al.*, 1983; Pring *et al.*, 1987).

Plusieurs événements de recombinaison ont conduit à la construction d'un gène chimérique: le gène URF T13 (Dewey *et al.*, 1986; Wise *et al.*, 1987a). URF est l'abréviation anglaise de Unknown reading frame.

- Le premier événement de recombinaison correspond à l'assemblage de différentes parties du gène rDNA 26S: en effet, la région codante du gène URF T13 possède 87% d'homologies avec la région bordant l'extrémité 3' du rDNA 26S et 58 bp d'homologies parfaites avec le gène rDNA 26S lui-même (Dewey *et al.*, 1986); cet assemblage code pour une protéine d'environ 13 KDa (Wise *et al.*, 1987b).

- le second événement de recombinaison serait la duplication d'une séquence de 5 Kb située à l'extrémité 5' du gène ATP6; cette séquence porte la région promoteur de la transcription du gène ATP6 (Kennell *et al.*, 1987). C'est donc le promoteur de

l'ATP6 qui va permettre la transcription de la séquence URF T13 et de la séquence voisine ORF 25 (ORF: traduction anglaise de Open reading frame).

(ii) Les produits de transcription, de traduction et la sensibilité à *Helminthosporium maydis*.

La transcription du gène conduit, en première étape, à la synthèse d'une molécule de mRNA de 3,9 Kb, qui, après maturation, donne un transcript de 1,8 Kb (Kennell *et al.*, 1987). Les gènes permettant la maturation de ce mRNA sont, pour l'essentiel, des gènes nucléaires. La traduction du mRNA de 1,8 Kb qui contient un site d'initiation de traduction, permet la synthèse d'un polypeptide de 12961 Da (environ 13 KDa), (Wise *et al.*, 1987b).

Le gène URF T13 joue un rôle important dans l'hérédité maternelle de la stérilité mâle et de la sensibilité aux toxines de certains pathogènes fongiques. Les lignées ou espèces de maïs portant le cytoplasme T sont très sensibles à différents pathogènes: *Cochliobolus heterostrophus*, *Phyllosticta maydis*, (Ulstrup, 1972). Tous ces pathogènes ont en commun de synthétiser une série de produits toxiques du type beta polyketols (Suzuki *et al.*, 1983; Danko *et al.*, 1984) et affectent de façon très spécifique les mitochondries de cytoplasme T (Yoder, 1973).

L'action de la protéine chimérique serait celle d'une protéine membranaire comme le suggère la présence d'une région

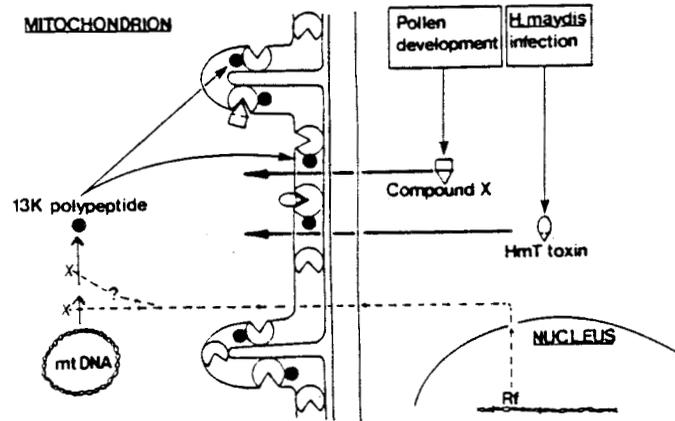
hydrophyle et d'une région hydrophobe. Le fait que cette protéine interfère avec la protéine fongique, suggère un rôle dans la modification de la perméabilité de la membrane interne de la mitochondrie. Ce modèle présenté dans la figure 2.2 a été proposé pour la première fois par Forde et Leaver (1979).

(iii) Réversion et restauration.

Des révertants de cytoplasme T ont été découverts. La réversion au niveau cytoplasmique, conduit, soit à la non transcription de la région URF T 13, soit à la synthèse d'une protéine tronquée par arrêt prématuré de la traduction (Wise *et al.*, 1987b). Dans chaque cas, le cytoplasme T révertant perd simultanément son caractère de stérilité, la protéine 13 KDa et sa sensibilité à la toxine (Wise *et al.*, 1987b; Rottman *et al.*, 1987).

La restauration de la fertilité mâle, par les gènes nucléaires sur le cytoplasme T, est déterminée par l'action de deux gènes de restauration nucléaire Rf1 et Rf2 (Duvick *et al.*, 1961; Snyder et Duvick, 1969). La présence de ces gènes de restauration entraîne une réduction de la synthèse de la protéine 13 KDa (Forde et Leaver, 1980), par action au niveau de la maturation des transcrits majeurs de la protéine (Dewey *et al.*, 1986). Ces gènes ont une action extrêmement spécifique sur la maturation de ce mRNA particulier et n'ont pas d'action sur d'autres gènes. Par exemple, la transcription et la maturation du mRNA du gène ATP6, qui porte le même site promoteur que URF T13,

Fig.2.2.: Modèle explicatif de l'action de la protéine 13000 Mr sur la membrane interne de la mitochondrie du cytoplasme stérile T du maïs et de l'interaction avec la toxine de *Helminthosporium maydis*.



D'après Forde et Leaver 1979

ne sont pas affectées par la présence des gènes Rf1, Rf2 (Kennell *et al.*, 1987).

b) Limites de l'analyse de la structure moléculaire du mtDNA en relation avec la stérilité mâle.

La connaissance de ces phénomènes nous a convaincu de vigilance dans les déductions que nous pourrions faire entre la génétique de la stérilité mâle et l'analyse moléculaire du mtDNA. Nous devons, en particulier, tenir compte des faits suivants.

- Sur un même cytoplasme il peut y avoir recombinaison sans que cela conduise à la stérilité mâle: cela signifie que des profils de restriction différents ou des résultats de profils de RFLP différents ne correspondent pas, nécessairement, à des systèmes nucléocytoplasmiques différents (Levings et Pring, 1987; Sisco *et al.*, 1985; Pring *et al.*, 1987).

- des protéines différentielles peuvent être observées dans les différents groupes nucléocytoplasmiques sans que cela soit lié à la stérilité mâle: par exemple, la protéine 21KDa observée sur les cytoplasmes S et C, et absente sur le cytoplasme T, ne joue apparemment aucun rôle dans l'expression de la stérilité mâle.

- les transcripts hybridés par la même sonde peuvent appartenir à des processus de maturation de mRNA codant pour des protéines tout à fait différentes. Par exemple, la sonde de l'ATP6 s'hybride sur les mRNA correspondant à la maturation du mRNA de l'ATP6, mais également, du mRNA de URF T13. L'hybridation est possible parce que les deux gènes possèdent le site promoteur



de l'ATP6. Ainsi, les profils d'hybridation en Northern blot très complexes donnent l'impression d'une maturation différente du mRNA de l'ATP6 sur les cytoplasmes N, T et T restauré. La première conclusion a été de dire que le gène ATP6 était probablement modifié, or, le séquençage du gène ATP6 sur les cytoplasmes N et T ne montre qu'une différence de 9 bp (Kennell *et al.*, 1987) qui n'entraîne pas de modification notable de la transcription, de la traduction et de l'activité de l'ATP6 (Kennell *et al.*, 1987).

En fait, il est nécessaire pour conclure à des systèmes de stérilité nucléocytoplasmiques différents, de repérer les produits de transcription et de traduction différentiels entre femelle (sur cytoplasme A) et hermaphrodite (sur cytoplasme B), puis d'observer l'action des gènes de restauration, en comparant les produits de transcription et de traduction entre femelles et hermaphrodites sur le même cytoplasme (sachant malgré tout que des gènes non impliqués dans la restauration peuvent influencer les quantités de transcripts dans la mitochondrie). C'est ce type d'analyse qui sera réalisée sur *Beta* au cours du programme post-doctoral accepté par la C.E.E. (annexe 2).

Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes limités à la mise en évidence de la variabilité de l'information cytoplasmique dans les populations naturelles de *Beta maritima*.

B.- LE POLYMORPHISME CYTOPLASMIQUE CHEZ *Beta maritima*.

L'apparition de la stérilité mâle est liée à la variation du génome cytoplasmique, ce qui suggère qu'à l'intérieur des populations gynodioïques le polymorphisme cytoplasmique existe.

Une première étude dans les populations naturelles de *Beta maritima* a permis la mise en évidence de deux types d'hérédité maternelle: ségrégeants et non ségrégeants (Boutin *et al.*, 1987). Le type ségrégeant est constitué de plantes femelles (Fe), intermédiaires fonctionnellement femelles (IFe) et hermaphrodites (H) susceptibles de donner une descendance hétérogène constituée de femelles, intermédiaires et hermaphrodites. Le type non ségrégeant est constitué de plantes hermaphrodites donnant une descendance homogène hermaphrodite. Dans cette première étude il a été possible d'associer au type ségrégeant un profil de restriction mitochondrial S et au type non ségrégeant un profil de restriction N. Aucune variabilité n'a été observée au niveau du DNA chloroplastique.

Cet état génétique des populations de *Beta maritima* nous a amené à nous poser une série de questions: le DNA mitochondrial est-il la seule composante cytoplasmique variable et n'y a-t-il que deux types mitochondriaux? La correspondance caractère ségrégeant/cytoplasme (S) et caractère non ségrégeant/cytoplasme (N) est elle systématique? Autrement dit, est-il possible de trouver des plantes ségrégeantes sur (N): le cytoplasme "normal" ou fertile existe-t-il ou s'agit-il d'un cytoplasme stérile ayant

fixé tous ses gènes de restauration? Dans le même point de vue, existe-t-il des plantes non ségrégeantes sur (S)?

Une étude plus approfondie de l'information cytoplasmique permet de répondre à certaines de ces questions.

- Il existe une variabilité cytoplasmique forte dans les populations de *Beta maritima*: trois niveaux de polymorphisme cytoplasmique ont pu être observés. Tout d'abord au niveau de la présence ou de l'absence d'un plasmide linéaire de 10.4 Kb (a), ensuite, au niveau du mtDNA lui même, 5 génotypes différents ont pu être observés (b) et enfin, au niveau du ctDNA, 3 génotypes différents ont pu être déterminés (c).

- La relation génotype mitochondrial et caractère ségrégeant, non ségrégeant n'est pas stricte (b). Un certain nombre de familles jugées ségrégeantes pour le phénotype sexuel, sont sur cytoplasme de type N ( $N_1$  et  $N_2$ ), ce qui tendrait à prouver que parler de cytoplasme "normal" ou "fertile" est un abus de langage et qu'il serait plus correct de parler de cytoplasme stérile pour lequel les gènes nucléaires, nécessaires à sa restauration, ont été fixés. Il reste cependant à lever l'hypothèse d'une stérilité nucléaire, bien que la présence de plantes femelles, intermédiaires femelles et hermaphrodites dans ces familles (N) ségrégeantes soit plutôt le signe d'un déterminisme nucléocytoplasmique de la stérilité (Owen, 1952). En revanche toutes les plantes jugées non ségrégeantes, sont sur cytoplasme de type N, ce qui montre, comme l'a observé Theurer chez *Beta vulgaris* (1971), que la fixation des gènes de restauration à l'état homozygote est un phénomène rare.

a) Le plasmide linéaire.

A linear 10.4 Kb plasmid in the mitochondria of *Beta  
maritima*.

Pannenbecker G , Saumitou-Laprade P, Maggouta F, Jean R,  
Michaelis G.

Article en préparation pour Mol Gen Genet.

TITLE

A LINEAR 10.4 Kb PLASMID IN THE MITOCHONDRIA  
OF BETA MARITIMA

INTRODUCTION.

Mitochondria of higher plants are known to contain extrachromosomal plasmids (for review see Lonsdale *et al.*, 1988). Circular plasmids or minicircular DNAs (Pring and Lonsdale, 1985; Sederoff, 1984) have been described in 8 different species (Lonsdale *et al.*, 1988; Shikanai *et al.*, 1987) including sugar beet (Hansen and Marcker, 1984; Powling, 1981; Thomas, 1986) and wild beet (Mikami *et al.*, 1985; Hallden *et al.*, 1988). The linear plasmids are a second form of extrachromosomal molecules within mitochondria. These autonomously replicating molecules have been described in filamentous fungi (Garber *et al.*, 1986; Kistler and Leong, 1986; Samac and Leong, 1988) and in higher plants (Kemble and Thompson, 1982; Levings and Sederoff, 1983; Paillard *et al.*, 1985; Palmer *et al.*, 1983). The main characteristic features of these molecules are their terminal inverted repeats of variable length and proteins covalently attached to the 5' ends.

Looking for alternatives to the Owen male sterile cytoplasm used for sugar beet breeding programs (Owen, 1942), several natural populations of *Beta maritima* L. (wild beet) located in

the French estuaries of the English Channel were studied. The analysis revealed the occurrence of male fertile and male sterile plants in the same population. One population exhibiting a high frequency of sterile plants has been investigated in more details. Mitochondrial and chloroplast DNA restriction patterns were compared. Mitochondrial DNA was shown to differ between fertile and sterile *Beta maritima* plants (Boutin *et al.*, 1987). These new cytoplasms were characterized as being different from the *B. vulgaris* sterile and fertile cytoplasms described by Owen (1942; 1945).

Further investigations on cytoplasmic variability within *B. maritima* populations have permitted us to discover a second variation of the mtDNA restriction pattern. This variation is due to an extrachromosomal mitochondrial plasmid-like molecule.

The purpose of this paper is to present a molecular description of this mitochondrial plasmid. In addition, its distribution among the different populations, the relation with cytoplasmic male sterility, the transmission to progeny, and its stability in sterile tissue culture has been analyzed.

## MATERIAL AND METHODS

### *Plant material*

*Beta vulgaris* (L) ssp. *maritima* Arcang. (wild beet):

The first seed stock ( $G_1$  generation) was collected from plants ( $G_0$  generation) belonging to three natural populations located in estuaries on the French coast of the English Channel. Two populations, named A and B, were located in the Canche estuary (near the town of Etaple, south of Boulogne-sur-Mer), and the third one in Somme estuary (near the town of Le Crotoy, south-west Abbeville). The  $G_1$  generation then, consists in several open pollinated progenies. Plants belonged to one of three sexual phenotypes characterized by female, intermediate-female or hermaphrodite flowers (Boutin *et al.*, 1987). Progenies were classified in two groups according to the sexual phenotypes of the offsprings: segregating progenies with females, intermediate females and hermaphrodites, and non segregating progenies only composed of hermaphrodites plants. Plants belonging to segregating families were supposed to possess a sterile cytoplasm whereas plants originating from non-segregating families are supposed to possess a fertile one (Boutin *et al.*, 1988). The information concerning the origin of the plants were kept. The families are labeled by the number of the  $G_0$  mother-plants, and the plants of one family by additional numbers. For example, plant Canche A 104-7 is the  $G_1$  plant number 7 issued from the plant number 104 of the Canche A population. Plants from the  $G_1$  generation were used for biochemical analysis.

One or several individuals per family were analyzed. A total of 61 families was checked for the presence or absence of the plasmid. Twenty-two families originating from the Canche A population, 17 from the Canche B population, and 22 from the Somme population. Seeds were harvested from open pollinated plants of the G<sub>1</sub> generation cultivated in the experimental garden of the University of Lille. These seeds have been used to establish sterile tissue cultures.

*Beta vulgaris* (L) ssp. *Vulgaris* (sugar beet):

The male fertile Clone 0027Y1 (0-type) and the cytoplasmic male sterile clone 0008X1 (CMS-type) were kindly provided by Kleinwanzlebener Saatzucht AG, Einbeck (FRG).

*Isolation of mitochondria and purification of mtDNA*

Mitochondria were isolated from 200g of green leaves from *B.maritima* and *B.vulgaris* according to the method of Boutry and Briquet (1982) with the following modifications. The discontinuous sucrose gradient was replaced by a step gradient of 30% and 42% percoll. The 30% percoll phase included a continuous gradient (0 to 10%) of polyvinylpyrrolidone 25000 (Dy *et al.* 1985). Centrifugation was performed at 20 000 rpm during 15 minutes in a Sorvall SS 34 rotor. The purified mitochondria were collected at the interface of the percoll gradient, diluted, and pelleted by centrifugation at 9000 rpm during 10 minutes in a Sorvall HB4 rotor. After DNase I treatment during 1 hour at 0°C, the mitochondria were lysed with a mixture of sarcosyl and 0,5% SDS, and digested with proteinase K (100µg/ml) at 37°C for 1

hour. The DNA was purified by centrifugation in a discontinuous CsCl gradient according to Kolodner and Tewari (1975).

#### *Restriction and gel electrophoresis of DNA*

Restriction endonuclease digestions were carried out under conditions suggested by the suppliers. DNA was electrophoresed in agarose slab gels buffered with 40 mM Tris-HCl, 20 mM Na Acetate, 2 mM EDTA, 18 mM NaCl, pH 8.

#### *Cloning of DNA*

The plasmid DNA was separated from the high molecular weight mtDNA by electrophoresis in agarose gels and isolated by electro-elution. The internal EcoRI fragments were cloned in the *E. coli* vector pUC 19. *E. coli* was transformed as described by Maniatis *et al.*, (1982).

#### *Southern hybridization*

After electrophoresis in agarose gels, the DNA was transferred to nitrocellulose filters (Schleicher & Schuell) according to Southern (1975). The probes were labeled with [ <sup>32</sup>P]-dATP by nick translation (Rigby *et al.*, 1977).

#### *Sterile tissue culture*

In a first step, seeds were sterilized overnight in 10% domestos, a commercial disinfectant, washed at least 6 times with sterile water and dried at room temperature overnight. In a second step, the seeds were sterilized in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during 4 hours and dried overnight between two layers of sterile paper. The

sterilized seeds were sown on sterile medium containing the growth substances (Nagata and Takebe, 1971).

## RESULTS

### *Detection of the mitochondrial plasmid*

Mitochondria were isolated from male sterile and fertile *Beta vulgaris* and *Beta maritima* plants. After DNA extraction undigested mtDNA was electrophoresed in agarose gels and visualized by ethidium bromide staining. All extracts contained the high molecular weight mitochondrial DNA. In addition a second discrete band was observed in the extracts of some *Beta maritima* plants (Fig 1, lane 2 and 4). This novel band migrated with an electrophoretic mobility corresponding to that of a linear 10.4 kb DNA molecule. The band was absent from chloroplast extracts (Fig.2, lane 2). Resistance to RNase, sensitivity to DNase and co-purification with mtDNA extracted from DNase-treated organelles demonstrated that the plasmid band consists of DNA molecules of mitochondrial origin. The plasmid has been found in male sterile and fertile wild beets, but it is lacking from the sugar beets we have analyzed so far.

Upon digestion with Sall the high molecular weight mtDNA and the plasmid are converted into a series of fragments. Three bands at about 5.6 kb, 3.1 kb and 1.5 kb were observed in those extracts containing the plasmid (Fig.2). From the staining of the fragments it is concluded that the plasmid copy number is higher than that of the main mitochondrial genome. The plasmid was lost when mitochondrial extracts were treated with phenol for

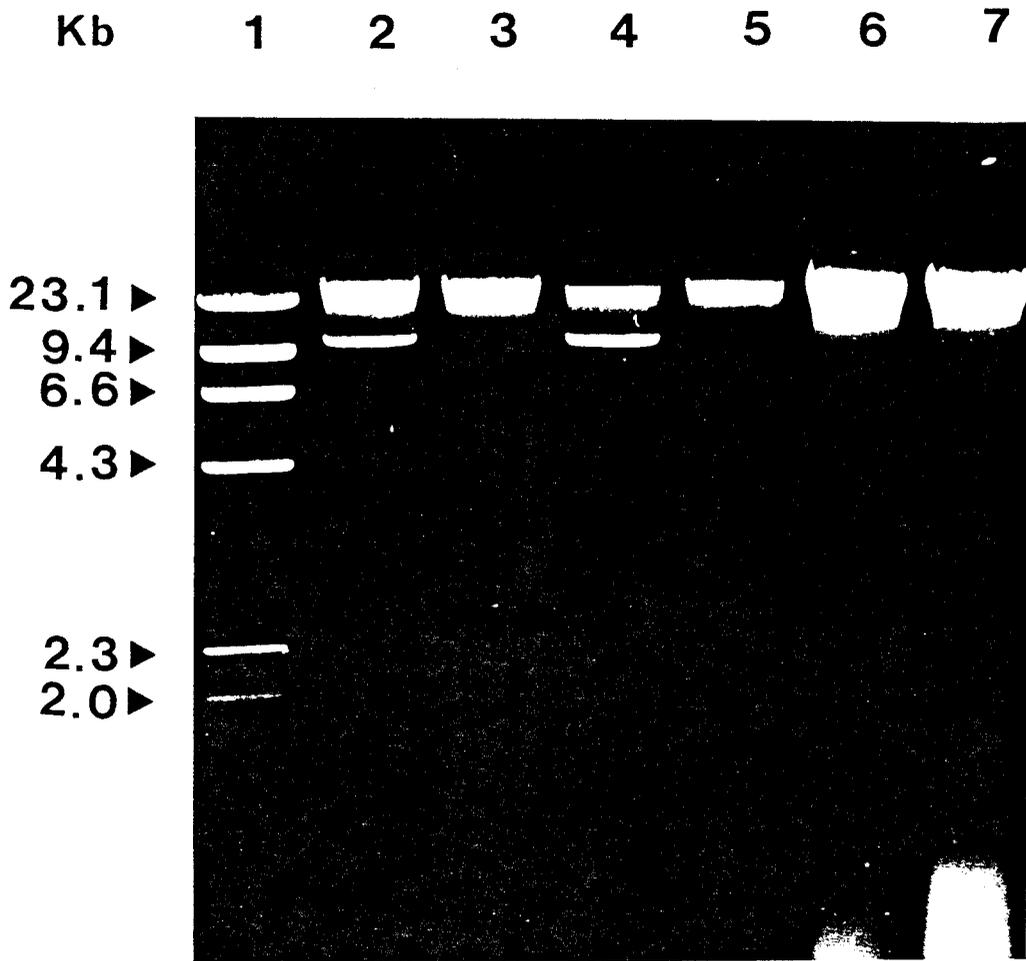


Fig 1. Agarose gel electrophoretic analysis of non restricted mitochondrial DNA isolated from percoll gradient purified mitochondria treated by DNaseI, in different accessions of *B.maritima* and *B.vulgaris*. Lane 1 contains a Hind III digest of Lambda phage as molecular weight marker. Lane 2 contains *B.maritima* fertile S77 (Somme population) ; Lane 3 contains *B.maritima* fertile S83 (Somme population) ; Lane 4 contains *B.maritima* sterile A 104-7 (Canche A population) ; Lane 5 contains *B.maritima* sterile A 103-31 (Canche A population) ; Lane 6 contains *B.vulgaris* sterile S KWS clone 0008X1 ; Lane 7 contains *B.vulgaris* fertile N cytoplasm KWS clone 0027Y1.

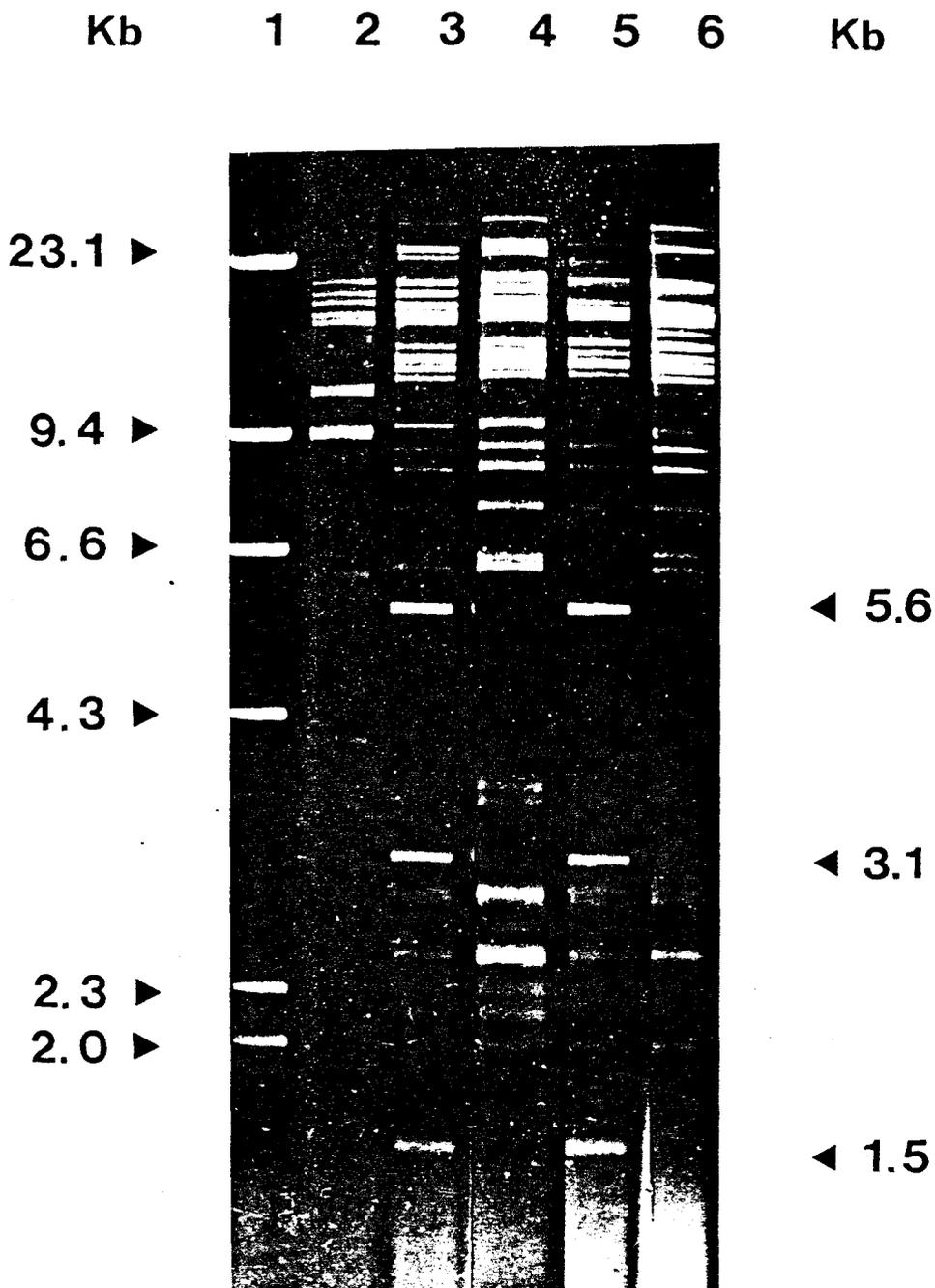


Fig 2. Electrophoretic analysis in 0.7% agarose gel of Sal I digested mitochondrial DNA isolated from percoll gradient purified mitochondria in different *B.maritima* plants. Lane 1 contains a Hind III digest of Lambda phage as molecular weight marker ; Lane 2 contains the Sal I digest of chloroplast DNA from fertile A 40 *B.maritima* (Canche A population) as a control: Lane 3 to 6 contain *B.maritima* mitochondrial DNA : Lane 3 sterile A 104-7 (Canche A population); Lane 4, A 103-31 sterile (Canche A population), Lane 5 fertile A 40 (Canche A population) and Lane 6, fertile B 15 (Canche B population). Arrows denote the bands corresponding to the plasmid digests: the molecular weight of each band corresponding to a plasmid fragment is given.

deproteinization indicating an association between protein and the plasmid.

*Physical map of the plasmid*

Plasmid DNA was purified from agarose gels by electroelution. The physical structure of the plasmid has been studied by restriction fragment analysis. The sum of the three fragments generated by SaII digestion is about equal to 10.4 kb, the apparent size of the undigested molecule. The same result was obtained with four other restriction endonucleases. The number of fragments produced by single digestions with the same two enzymes. All these results point to a linear structure of the plasmid and a size of 10.4 kb.

The results obtained by various single and double digestions of purified plasmid DNA are summarized in Fig.3. The physical map includes 15 restriction sites produced by five enzymes. To verify the map the four internal EcoRI fragments were cloned in the pUC19 vector and used as hybridization probes.

The terminal 1.1 kb EcoRI fragment was isolated from an agarose gel and used as a hybridization probe. Homology with both the 4.3 kb and 0.7 kb ClaI fragments indicates a repeated sequence on each end of the plasmid. This terminal repeat is equal or shorter than 0.7 kb because the internal 5.5 kb ClaI fragment didn't hybridize.

*Distribution of the linear plasmid in three natural populations of Beta maritima*

Plants from 61 different families originating from three

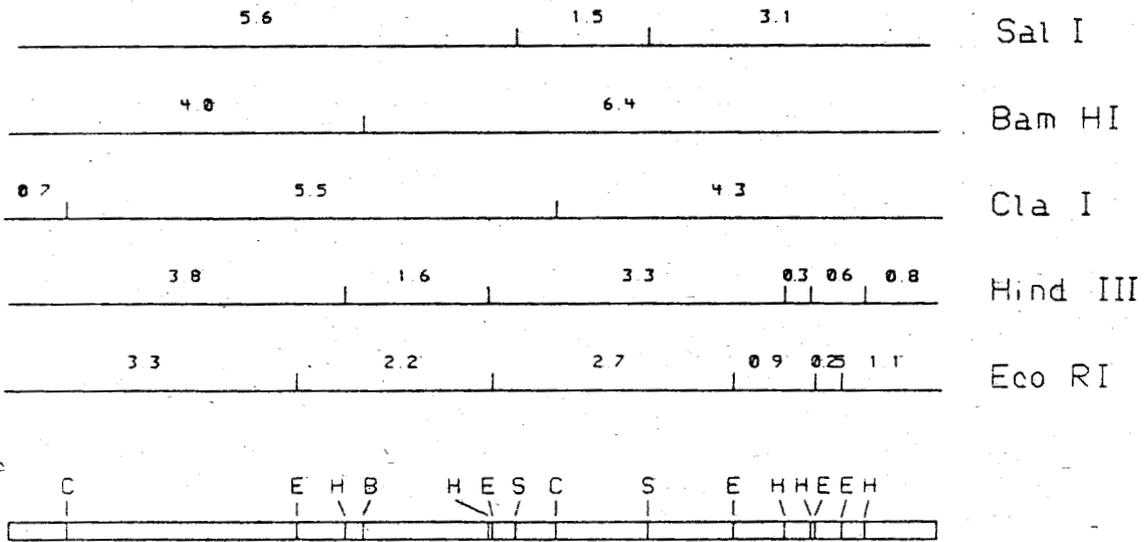


Fig 3 Restriction map of linear *B.maritima* mitochondrial DNA plasmid.  
a: Isolated plasmid DNA was treated with 5 different restriction enzymes, the size of each fragment in Kilobase pairs is indicated.  
b: An idealistic map checked by double digestion and southern blot hybridization is proposed.

populations of wild beets have been checked for cytotype N or S and the presence (+) or absence (-) of the mitochondrial plasmid. The linear molecule has been found in each of the three populations studied (Table 1). Plants lacking the plasmid were rare or absent. The plasmid is not linked to cytotype N or S. As a consequence four different cytotypes can be distinguished: N+, N-, S+, S-. All four cytotypes were detected among progenies of the Canche A population.

*Is the plasmid transmitted to progeny?*

To determine the pattern of inheritance of the 10.4 kb linear plasmid we analyzed 25 tissue cultures derived from sterilized seeds (Table 2). The seeds were collected from six different G1 plants. Mitochondria were prepared from the sterile cultures. Undigested mtDNA was separated in agarose gels, transferred to nitrocellulose, and analyzed for presence of the plasmid by hybridization with a plasmid-specific probe. The ethidium bromide staining was not sensitive enough to detect the plasmid in these experiments. The progenies of four families are homogeneous with respect to presence or absence of the plasmid. In the B16-13 progeny one culture is lacking the plasmid whereas only one positive culture is found in the B3-18 progeny. These results can be explained by plasmid instability or exceptions from maternal inheritance. The second possibility is supported by a preliminary analysis of reciprocal crosses between *Beta maritima* with plasmid and *Beta vulgaris* without plasmid. The plasmid has been detected in some plants of both hybrid progenies.

Table 1: Distribution of the plasmid [presence (+) or absence (-)] among the different cytoplasmic types fertile (N) and sterile (S) in three natural populations of the French coast of the English Channel

Population	Mitochondrial DNA type				sample size
	N		S		
	+	-	+	-	
Canche A	7	1	12	2	22
Canche B	2	4	11	0	17
Somme	20	1	1	0	22
Total	29	6	24	2	61

Table 2: Plasmid stability in sterile tissue culture obtained by germination of sterilized seed and distributions in maternal progenies

G <sub>1</sub> plant		G <sub>2</sub> plant	
Identification number	cytotype	+	-
A 103-20	S	0	3
A 32-2	S	1	0
A 89-7	S	3	0
B 5-17	N	6	0
B 16-13	N	5	1
B 3-18	N	1	3
B 52-12	S	3	0

+ : presence of the 10.4 Kb plasmid  
- : absence of the 10.4 Kb plasmid

## DISCUSSION

This 10.4 Kb linear molecule is the second linear plasmid found in dicotyledons.

Up to now, the linear plasmids have been observed in 4 species among the higher plants (Lonsdale, 1988). The most documented are the linear S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub> plasmids from the S cytoplasm of maize (Schardl *et al.*, 1984 and 1985). The R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> linear plasmids are known in maize on the RU cytoplasm (Weissinger *et al.*, 1982), and D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> on *Zea diploperennis* (ZD) cytoplasm (Timothy *et al.*, 1983). Two linear plasmids have been described on *Sorghum bicolor* cytoplasm (Pring *et al.*, 1982; Chase and Pring, 1983). Up to now the single linear plasmid observed in dicotyledons, is the 11.3 Kb plasmid discovered in *Brassica* (Palmer *et al.*, 1983). The strong association between the occurrence of this plasmid and CMS has been discussed (Chetrit *et al.*, 1984; Erickson *et al.*, 1986; Kemble *et al.*, 1986) but the absence in *B. ogura* CMS demonstrated that this plasmid is not required for expression of male sterility (Turpen *et al.*, 1987). The abundance of this linear plasmid varies from one-tenth of to ten times the main mitochondrial genome and appears to be determined by the nuclear genotype (Palmer *et al.*, 1983; Kemble *et al.*, 1986); the most recent interesting feature reported about this molecule is the extreme instability in protoplast fusion systems (Kemble, 1988) and the non strictly maternal inheritance (Erickson, in prep.).

The new 10.4 Kb linear plasmid found in *B. maritima* appears to be quite different from the 11.3 KB linear *Brassica* plasmid. The

*Brassica* plasmid restriction map (Palmer, 1983) differs for the location of the HindIII and EcoRI restriction sites and for Sall restriction sites which do not exist in *Brassica*.

Other plasmids, which are however circular plasmid, have been already described in *Beta vulgaris* (Powling, 1981) and in wild beets (Mikami *et al.*, 1985; 1986). From a phylogenic point of view the distribution of some plasmids has been correlated with modifications observed in the mtDNA and/or the ctDNA restriction pattern (Pring and Levings III, 1978; Mikami *et al.*, 1985); in wild beet species coming from different origins (Mikami *et al.*, 1985; 1986) have observed several groups according to the distribution of low molecular weight DNA bands (1.1 Kb to 1.5 Kb); this classification was generally in agreement with the one based upon restriction endonucleases patterns of mtDNA and ctDNA. But in the case of the *B. maritima* linear molecule, no correlation between fertile and sterile cytoplasm or between sterile and fertile phenotype has been observed; the plasmid appears as well in female as in hermaphrodites.

Cytoplasmic polymorphism exists at the within population level. The géographical distribution didn't show significant differences among the populations studied: high frequencies was found for the plasmid in populations from the two estuaries which are distant from 30 Km from each other, indicating a relatively wide distribution of this molecule among the populations of the French coast of the English Channel. Up to now, this molecule has never been described in the other *B.maritima* accessions which are molecularly analysed in previous investigations (Mikami *et al.*, 1985, 1986; Hallden *et al.*, 1988); nevertheless this doesn't mean

that the molecule is not present. This absence of the plasmid in these studies could be due to the DNA purification procedure: in a previous study (Boutin *et al.*, 1987), the plasmid was not observed due to the phenol extraction. This critical step has been replaced by centrifugation through a discontinuous CsCl gradient. This disappearance of the molecule with the phenol purification step is an argument for the proteins linked to one or both ends of the DNA molecule, but the reason for the persistence of these proteins after the proteinase-K treatment remains unknown.

The inheritance of this molecule is not strictly maternal as mentioned in *Brassica* (Erickson in prep). It happens that the plasmid appears or disappears in a progeny which becomes segregating for the presence or absence of the molecule. In these conditions the question remains opened: how one can be sure of mitochondrial location of the plasmid? Different arguments are in favour of a mitochondrial location: (i) the molecule is co-purified with the main mtDNA exclusively; it has never been observed in ctDNA preparations even when the chloroplasts were isolated from the same leave preparation used for the mitochondria preparation which contains the plasmid; (ii) the molecule resist to the DNaseI treatment applied before the lysis step, which indicates that the DNA molecule is protected by a membrane or proteins capsid.

Seedlings obtained by seed germination after a strongly sterilizing procedure and a subsequent sterile *in vitro* culture without antibiotics or fungicides retain the plasmid information in most cases: so it is established that the molecule is

transmitted by the seeds themselves and not by outside contamination (soil, fungi, aphids, ...).

Reciprocal crosses have been realized between hermaphrodites with and without the plasmid and would permit to evaluate the transmission of the plasmid by pollen and to precise a possible nuclear control of mitochondrial DNA replication as suggested in *Brassica* (Kemble *et al.*, 1988). If this hypothesis is verified, then this linear plasmid could be a good model for studies on the interactions between nuclear and mitochondrial information.

#### SUMMARY

Linear plasmid DNA molecule was detected in preparation of mitochondrial DNA from *Beta maritima* cytoplasmic male-sterile and fertile plants. This molecule exhibits a molecular size of 10.4 Kb, and is the second linear plasmid discovered in Dicotyledons. The comparison of the restriction maps of the 10.4 Kb *Beta maritima* plasmid and the 11.3 Kb *Brassica* plasmid indicated that the two molecules are different.

The plasmid appears to be stable in sterile cultures obtained by germination of sterilized seeds but it can be lost or gained in some maternal progenies: this plasmid appears to be transmitted by seed but not strictly maternal inherited.

REFERENCES

- Boutin V, Pannenbecker G, Ecke W, Schewe G, Saumitou-Laprade P, Jean R, Vernet Ph, Michaelis G (1987) Cytoplasmic male sterility and nuclear restorer genes in a natural population of *Beta maritima*. *Theor Appl Genet* 73:625-629
- Boutin V, Saumitou-Laprade P, Valero M, Vernet Ph (1988) Gynodioecy in *Beta maritima*. *Oecologia Plantarum* 9:61-66
- Chase CD, and Pring DR (1986) Properties of the linear N<sub>1</sub> and N<sub>2</sub> plasmid-like DNAs from mitochondria of cytoplasmic male sterile *Sorghum bicolor*. *Pl Mol Biol* 6:53-64
- Chetrit P, Mathieu C, Vedel F, Pelletier G and Primard C (1984) Mitochondrial DNA polymorphism induced by protoplast fusion in cruciferae. *Theor Appl Genet* 68:1-6
- Dufermont E (1987) Structure spatiale et gynodioecie chez *Beta maritima*: utilisation de marqueurs moleculaires (allozymes et plasmide mitochondrial) et phénotypique (stérilité mâle), dans l'étude du régime de la reproduction au sein de plusieurs populations. Diplome d'Etudes Approfondies. Paris-Sud University, Orsay center
- Erickson L, Grant I, Beverdsdaf W (1986) Cytoplasmic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.) 2. The role of a mitochondrial plasmid. *Theor Appl Genet* 72:151-157
- Garber RC, Lin JJ and Yoder OC (1986) Mitochondrial plasmids in *Cochliobolus heterostrophes*. In extrachromosomal elements in lower eukaryotes (RB Wickner, A Hennebush, AM Lambowitz, IC Gunsalus and A Hollaeuder Eds pp105-118 Plenum New York
- Halldén C, Bryngelsson I and Bosemark NO (1988) Two new types of cytoplasmic male sterility found in wild *Beta* beets. *Theor Appl Genet* 75:561-568
- HirochiKa H, Nakamura K, Sakaguchi K (1984) A linear DNA plasmid from *Streptomyces rochei* with an inverted terminal repetition of 614 bases pairs. *EMBO J* 3:761-766
- Kemble RJ, Thompson RD (1982) S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub>, the linear mitochondrial DNAs present in a male sterile line of maize, possess terminally attached proteins. *Nucleic Acid Res* 10:8181-8190

- Kemble RJ, Carlson JE, Erickson LR, Sernyk JL, Thompson DJ (1986) The *Brassica* mitochondrial plasmid and large RNAs are not exclusively associated with cytoplasmic male sterility. *Mol Gen Genet* 205:183-185
- Kemble RJ, Barsby TL, Yarrow SA (1988) Transformation of plant mitochondria with mitochondrial DNA plasmids via protoplast fusion. *Mol Gen Genet* 213:202-205
- Kistler HC and Leong SA (1986) Linear plasmid like DNA in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *Conglutinaus*. *J Bacteriol* 167:587-593
- Kolodner R, Tewari KK (1975) The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants. *Biochim Biophys Acta* 402: 372-390
- Levings CS III and Sederoff RR (1983) Nucleotide sequence of the S<sub>2</sub> mitochondrial DNA from the S cytoplasm of maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:4055-4059
- Lonsdale DM, Brears T, Hodge TP, Melville SE and Rottmann WH (1988) The plant mitochondrial genome: homologous recombination as a mechanism for generating heterogeneity. *Phil Trans R Soc Lond B* 319:149-163
- Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J 1982 "Molecular cloning: Laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New-York
- Mikami T, Kishima Y, Sugiura M, Kinoshita T (1985) Organelle genome diversity in sugar beet with normal and different sources of male sterile cytoplasm. *Theor Appl Genet* 71: 166-171
- Mikami T, Harada T, Kinoshita T (1986) Heterogeneity of circular mitochondrial DNA molecules from sugar beet with normal and male sterile cytoplasm. *Current Genet* 10: 695-700
- Owen FV (1942) Male sterility in sugarbeets produced by complementary effect of cytoplasmic and mendelian inheritance (abstr). *Am J Bot* 29:692
- Owen FV (1945) Cytoplasmic inherited male sterility in sugarbeets. *J Agric Res* 71:423-440.
- Paillard M, Sederoff RR and Lewings CSIII (1985) Nucleotide sequence of the S<sub>1</sub> mitochondrial DNA from S cytoplasm of maize *EMBO J* 1125-1128
- Palmer JD, Shields CR, Cohen DB, Orton TJ (1983) An unusual mitochondrial DNA plasmid in the genus *Brassica*. *Nature (London)* 301: 725-728

- Powling A (1981) Species of small DNA molecules found in mitochondria from sugar beet with normal and male sterile cytoplasms. *Mol Gen Genet* 183: 82-84
- Pring DR, Levings III CS, Hu WWL, Timothy DH (1977) Unique DNA associated with mitochondria in the S type cytoplasm of male sterile maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 2904-2908
- Pring DR, Conde MF, Schertz KF; Levings III CS (1982) Plasmid-like DNAs associated with mitochondria of cytoplasmic male sterile sorghum. *MOL Gen Genet* 186: 180-184
- Pring DR and Lonsdale DM (1985) Molecular biology of higher plant mitochondrial DNA *Int Rev Cytol* 97:1-46
- Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C and Berg P 1977 Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113:237-251
- Samac DA and Leong SA (1988) Two linear plasmids in mitochondria of *Fusarium solani* f.sp. *Cucurbitae*. *Plasmid* 19:57-67
- Schardl CL, Lonsdale DM, Pring DR and Rose KR (1984) Linearization of maize mitochondrial chromosomes by recombination with linear episomes. *Nature Lond* 301:292-296
- Schardl CL, Lonsdale DM (1985) Mitochondrial DNA rearrangements associated with fertile revertants of S type male sterile maize. *Cell* 43:361-368
- Sederoff RR (1984) Structural variation in mitochondrial DNA. *Adv Genet* 22:2-108
- Shikanai T, Yang ZQ and Yamada Y (1987) Properties of the circular plasmid-like DNA B1 from mitochondria of cytoplasmic male sterile rice. *Plant Cell Physiol* 28 (7) 1243-1251
- Southern EM 1975 Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-517
- Timothy DH, Levings CS III, Hu WWL and Goodman HH (1983) Plasmid-like mitochondrial DNAs in *Diploperennial tevsinte*. *Maydica* 28:139-149
- Turpen T, Garger SJ, Marks MD and Grill LK (1987) Molecular cloning and physical characterization of a *Brassica* linear mitochondrial plasmid. *Mol Gen Genet* 209:227-233
- Weissinger AK, Timothy DH, Levings CS III, Hu WW and Goodman MM (1982) Unique plasmid like mitochondrial DNAs from indigenous maize races of Latin America. *Proc Natu Acad Sci USA* 79:1-5

b) Le polymorphisme mitochondrial.

CMS in *Beta* ssp: mitochondrial variability in populations revealed by southern blot analysis.

Saumitou-Laprade P, Rouwendal G, Cuguen J, Krenz F, Michaelis G.

Article en préparation pour Theor Appl Genet.

TITLE

CMS IN *BETA* spp: MITOCHONDRIAL VARIABILITY IN POPULATIONS  
REVEALED BY SOUTHERN BLOT ANALYSIS

INTRODUCTION

Cytoplasmic male sterility (CMS) is a common feature found in many plant species that results in the lack of functional pollen production (reviewed by Pring and Lonsdale, 1985; Hanson and Conde, 1985; Kaul, 1988). This trait has proved its usefulness in emasculating the female parent of hybrid crosses (Edwardson, 1970; Pearson, 1981; Hanson and Conde, 1985). In *Beta vulgaris*, this phenomenon has received much attention due to its use in commercial production of hybrid sugar beet seeds and, up to now, the only male sterile cytoplasm used is the one discovered by Owen (1942; 1945).

Using genetic arguments, Rhoades (1950) was the first who suggested that mutated mitochondria might induce CMS in maize. Further investigations confirmed that the cytoplasmic component causing male sterility was localized in the mitochondria (see for a review Hanson and Conde, 1985) and not in the chloroplast (Leaver and Gray, 1982; Clark *et al.*, 1985). In *Zea mays* (Pring *et al.*, 1977; Levings and Pring *et al.*, 1977), in *Beta vulgaris* (Powling, 1981), in *Sorghum bicolor* (Conde *et al.*, 1982), in

*Petunia* (Boeshore *et al.*, 1983), in *Oryza sativa* (Shikanai *et al.*, 1987), in *Plantago lanceolata* (Rouwendal *et al.*, 1987) and in *Beta maritima* (Boutin *et al.*, 1987) comparisons of mitochondrial genomes of sterile and fertile plants by restriction digestion revealed differences in number and size of fragments. Differences have also been observed in the plasmids contents (see for a review Lonsdale *et al.*, 1988) but not strictly related to CMS. Differences also exist at the RNA level in maize (Walker *et al.*, 1987), in sunflower (Siculella and Palmer, 1988), and in *Plantago lanceolata* (Rouwendal, 1987). Finally differences between sterile and fertile plants have been observed in translation products of isolated mitochondria (Boutry and Briquet, 1982; Boutry *et al.*, 1984; Abbot and Fauron, 1986).

Intraspecific variability of the mitochondrial genome has been mentioned in a lot of species among fertile and sterile cytoplasms (Hanson and Conde, 1985; Siculella and Palmer, 1988) but also among different sterile cytoplasms: cytoplasms C, T, S in *Zea mays* (Levings, 1983) and cytoplasms R and P in *Plantago lanceolata* (Rouwendal *et al.*, 1987). Moreover, within a sterile cytoplasm, differences have been found: in CMS maize (Pring *et al.*, 1987) 5 accessions of the C group are not molecularly identical; in *Sorghum* (Bailey-Serres *et al.*, 1986) cytoplasmic genotypes are classified in eleven groups on the basis of the mtDNA restriction profiles.

Male sterility in *Beta maritima* (the wild beet) has been mentioned in different accessions (Oldemeyer, 1957; COE and Stewart, 1977; Hallden *et al.*, 1987; Boutin *et al.*, 1987). More

recently, molecular studies (Mikami *et al.*, 1985; Hallden *et al.*, 1988; Boutin *et al.*, 1987 ) showed differences at the mtDNA restriction profile level: these sources of *Beta maritima* CMS were identified as being different from the OWEN CMS source (Hallden *et al.*, 1988; Boutin *et al.*, 1988) and seem to be different from each other. Nevertheless no genetic study allows to conclude that the CMS systems are different in *B. maritima* and *B. vulgaris*.

Some natural populations of *Beta maritima* are reported to be gynodioecious (Coe and Stewart, 1977; Boutin *et al.*, 1988) consisting in the co-occurrence of male sterile and male fertile plants in the same population (Darwin, 1877). In some species, all populations are gynodioecious but the frequencies of male steriles can be highly different among populations. For example, in *Thymus vulgaris*, frequencies of females vary from 5 to 95% (Dommée *et al.*, 1978), in *Plantago lanceolata* from 8 to 22% (Van Damme, 1983). On the other hand in *B. maritima*, one natural population located on the French coast of the Channel showed 60% of female plants (Boutin *et al.*, 1987); but this is not a general feature of the species: not all the *B. maritima* populations documented are gynodioecious (Coe and Stewart, 1977; Dufermont unpublished).

Finally it is interesting to emphasize that the variability of the mitochondrial genome is well documented among agricultural lines or accessions from geographical distinct area (Mikami *et al.*, 1985; Hallden *et al.*, 1987; Boutin *et al.*, 1987; Palmer,

1988), and that very few is known on the polymorphism at the within population level.

The study of mitochondrial variability in the *Beta maritima* populations requires mitochondrial specific probes which reveal variability. This initial step was reached by using different heterologous probes and by isolating an homologous probe showing high variability in the mitochondrial genome of *Beta vulgaris* ssp (*vulgaris* and *maritima*). We describe here the mitochondrial variability revealed by this new probe (pBv4) between different wild and cultivated beet accessions. The homologous pBv3, pBv4 probes associated with the heterologous probes *atp 6*, *atp 9* and *cox1*, *cox 2* allow to distinguish between five different mitochondrial genotypes found in the Canche estuary. The probes pBv4, *atp 6* and *cox 2* were used to screen the cytoplasmic polymorphism in three different *B. maritima* populations of the French Channel coast. The correspondence, on the one hand, between segregating progenies and sterile cytoplasms and, on the other hand, between non segregating progenies and fertile cytoplasms (Boutin *et al.*, 1987; 1988) will be checked and discussed. Finally the evolutionary significance of this mitochondrial polymorphism will be discussed with molecular arguments and arguments from theoretical biology which may actually be not very dissimilar.

## MATERIAL AND METHODS

### *Plant material:*

The original *Beta maritima* seeds were collected on individual plants from five natural populations located on the French coast of the English Channel: in the Canche estuary near the town of Etaples in 1970 and 1984 and in the Somme estuary near the towns of Le Hourdel in 1970 and Le Crotoy in 1986. These sampled plants were classified according to cytotype by the analysis of the sexual phenotype of their progeny as described in Boutin *et al.* (1987).

The *Beta vulgaris*: lines II AMS, MS5 (both CMS) and II AOT (fertile) were originating from the collection of the Foundation for Agricultural Plant Breeding.

### *Isolation of mitochondria and purification of mtDNA*

Mitochondrial DNA was isolated from 200g of green leaves from *B. maritima* and *B. vulgaris* according to Boutry and Briquet (1982) with some modifications. The final purification of the mitochondria was performed by centrifugation on a discontinuous gradient of 30% percoll -containing a 0-10% linear gradient of polyvinylpyrrolidone 25000 (top to bottom) - on top of a 42% percoll layer. Following centrifugation for 15 min at 20 000 rpm in a Sorvall SS 34 rotor, the purified mitochondria were collected from the interface of the 30% and 42% layers and pelleted by centrifugation at 9000 rpm for 10 min in a Sorvall HB4 rotor. The pellet was treated with DNase I ( $100\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ ) for 1

hour at 0°C. The mitochondrial suspensions were brought to 2% sarcosyl, 0.5 SDS and 100µg/ml<sup>-1</sup> proteinase K and incubated at 37°C for 1 hour. The DNA was purified by centrifugation through a discontinuous CsCl gradient as described by Kolodner and Tewari (1975).

#### *Cloned DNA*

The mitochondrial genes used as probes were those coding for atpase subunits 6 (Dewey *et al.*, 1985a), 9 (Dewey *et al.*, 1985b), cytochrome c oxidase subunits 1 (Isaac *et al.*, 1985), 2 (Fox and Leaver, 1981), 3 (Hiesel *et al.*, 1987) and apocytochrome b (Dawson *et al.*, 1984). The homologous probes pBv3 and pBv4 were isolated from a pUC19-library of EcoRI-digested *B. vulgaris* MS5 mtDNA (Yanisch-Perron C *et al.*, 1985).

#### *Isolation of total DNA*

Total DNA was isolated as described by Dellaporta *et al.* (1983).

#### *Restriction and gel electrophoresis of the DNA*

Restriction enzymes from various manufacturers were used as recommended except for the digestion of total DNA, where twice the recommended amount of enzyme was used during a 2 hour incubation period. In addition the restriction reaction buffer was supplemented with spermidine to 2.5 mM.

#### *Southern blotting and hybridization*

After fractionation of restriction fragments on 0.8% agarose

gels in 40 mM Tris-acetate, pH 7.8, 1 mM EDTA and 0.5 g.ml<sup>-1</sup> EtBr, the DNA in the gel was depurinated and denatured by successively soaking the gel for 5 min in 0.25 M HCL and twice for 15 min in 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl. Finally, the gel was equilibrated twice for 10 min in the blotting solution (1 M NH<sub>4</sub>Ac) before capillary transfer of the DNA onto nitrocellulose (Kafatos *et al.*, 1979). After overnight transfer the filter was baked for 2 hours at 80°C in vacuum.

Plasmid DNA to be used as probe was isolated as described by Birnboim and Doly (1979) and modified by Maniatis *et al.* (1982). This DNA was labeled with digoxigenine-dUTP without prior linearization by restriction endonuclease digestion. The resulting probe was hybridized and the hybrids detected as suggested by the manufacturer (Boehringer Mannheim) with slight modifications: the stringent wash after the hybridization was performed twice for 15 min at 50°C and the incubation of the filter with anti-digoxigenin antibody-conjugate was preceded by a blocking step.

## RESULTS

### *Restriction analysis*

Previous studies (Boutin *et al.* 1987; Pannenbecker *et al.* in prep) have showed that a Sall restriction pattern polymorphism exists in natural populations of *Beta maritima* from the French coast of the English Channel. The S and N profiles were found to be associated, respectively, with the segregating and non

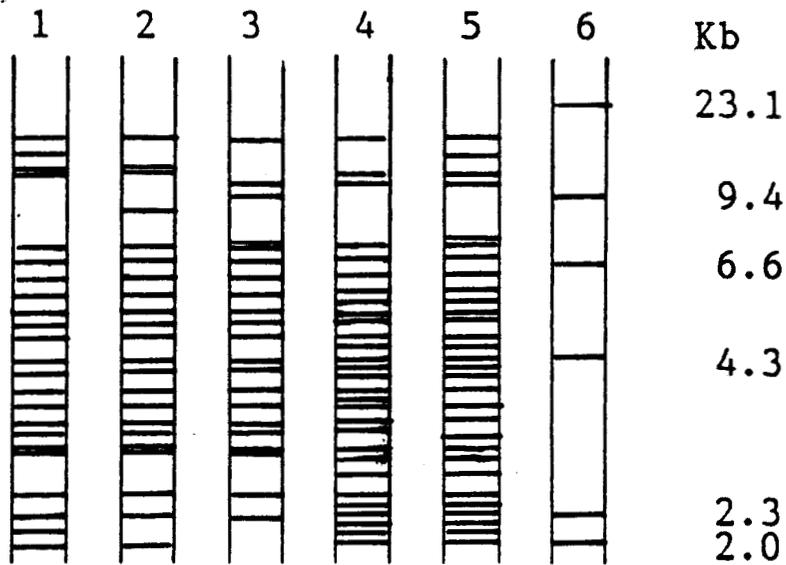


Fig.1. *EcoRI* digests of mitochondrial DNA from various *Beta maritima* (B.m.) and *Beta vulgaris* (B.v.) plants. 1 B.m. mtDNA type N1: S77 hermaphrodite non segregating plant from Somme A population; 2 B.m. mtDNA type N3: S33 non segregating plant from Somme A population; 3 B.m. mtDNA type S1: A104 segregating plant from Canche A population; 4 B.v. mtDNA: line II AMS (CMS), from the collection of the Foundation for Agricultural Plant Breeding population; 5 B.v. mtDNA: AOT (fertile) from the collection of the Foundation for Agricultural Plant Breeding population; 6 Lambda DNA digested with HindIII as marker.

segregating characteristics of the progenies. These profiles were found to be different from the sterile and fertile *SaI*I restriction patterns of *Beta vulgaris*.

*Eco*RI digested mitochondrial DNA, isolated from purified mitochondria, shows differences between the six different groups of plants (Fig 1). The segregating (sterile) *Beta maritima* plant *S*<sub>1</sub> (Fig 1 lane 4) can be separated from the *Beta vulgaris* CMS (Fig 1 Lane 5) discovered by Owen (1942). The non segregating (fertiles) *Beta maritima* plants can be separated in three different cytotypes: the *N*<sub>1</sub> cytotype (Fig 1 Lane 1), the *N*<sub>2</sub> cytotype (Lane 2) and the *N*<sub>3</sub> cytotype (Lane 3). Subtle, but clear, differences were also observed between *N*<sub>1</sub>, *N*<sub>2</sub> and *N*<sub>3</sub> in the *Sma*I restriction profiles (data not shown). For these two restriction enzymes, *N*<sub>1</sub>, *N*<sub>2</sub> and *N*<sub>3</sub> appear to be all different from the fertile *Beta vulgaris* O Type (Lane 6).

Thus, according to the mitochondrial restriction sites variations, three fertile and one sterile cytoplasms were observed among the different accessions of *Beta maritima* plants in populations from the French coast of the English Channel.

#### *Southern blot analysis*

*Validity of the mitochondrial probes.* There are two reasons for the use of probes for characterization of cytoplasmic types in population genetic studies. Firstly, the easiness of total DNA preparations compared to the pure mtDNA preparations. Secondly, the low amount of plant material (2 g of leaves) required for

biochemical analysis, compared to the high amount of plant material (200 g of leaves) needed for mtDNA restriction pattern analysis. Nevertheless before applying probes on total DNA from a large sample of plants, a preliminary verification of mitochondrial specificity of probe homology is required. That is why, in a first step, we have compared the hybridization patterns for each probe hybridized on purified mtDNA with that on total DNA.

For each of the eight probes *cyb*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *atp 6*, *atp9* *pBv3* and *pBv4*, the hybridization patterns are similar for purified mtDNA and total DNA (data not shown).

*The variability in Beta ssp.* In the different *Beta* accessions that we have compared, the *cyb* and *cox3* probes (Table 1) do not show any variability. Only one restriction profile has been observed for each probe among the different *B. maritima* and *Beta vulgaris* families checked. On the contrary, the six other probes used, revealed some variability in the hybridization patterns (table 1). The *cox1* probe, the *atp6* probe, the *atp9*, the *pBv3* probe show two different hybridization patterns, the *cox 2* probe shows three different hybridization patterns. Finally the *pBv4* probes shows five different hybridization patterns.

The results obtained by restriction analysis and southern blot analysis were concordant and allowed us to discriminate between seven different groups (table 1). The *Beta maritima* segregating plants can be separated into two different cytotypes

Table 1 : Mitochondrial variation in *Beta* ssp. as revealed by southern blot analysis of *Eco*RI digested mtDNA.

Probes	Molecular weight of hybridizing fragments (kbp)	Hybridization patterns of the different cytotypes							
		<i>B.maritima</i>					<i>B.vulgaris</i>		
		N1	N2	N3	S1	S2	OT	MS	
<i>cyb</i>	2.0	+	+	nd	+	+	+	+	
<i>cox3</i>	5.0	+	+	nd	+	+	+	+	
<i>cox1</i>	1.7	+	+	nd	+		+	+	
	2.7					+			
<i>atp6</i>	4.1	+	+	+	+		+		
	2.9					+		+	
<i>atp9</i>	1.1							+	
	1.1, 3.8, 10.0	+	+	+	+	+	+		
<i>pBv3</i>	0.7, 1.3, 1.7	+	+	nd	+		+	+	
	0.7, 2.9					+			
<i>cox2</i>	1.5, 2.0	+	+	+	+		+		
	1.7, 2.0							+	
	3.0, 6.7					+			
<i>pBv4</i>	3.2, 7.2		+				+		
	5.4							+	
	3.2, 3.9	+			+				
	3.2					+			
	3.2, 4.4			+					

+: Présence of a particular hybridization pattern

nd : not determined

N<sub>1</sub>: cytotype observed in progenies of *Beta maritima* families harvested in Canche A and Canche B populations in 1984 and in Somme estuary populations in "Le Hourdel" in 1970 and in Somme A in 1986.

N<sub>2</sub>: cytotype observed in progenies of *Beta maritima* families harvested in Canche B populations in 1984.

N<sub>3</sub>: cytotype observed in progenies of *Beta maritima* families harvested in Canche B population in 1984 and in Somme A population in 1986.

S<sub>1</sub>: cytotype observed in segregating progenies of *Beta maritima* families harvested in Canche A and Canche B populations in 1984 and in Somme A population in 1986.

S<sub>2</sub>: cytotype observed in segregating progenies of *Beta maritima* families harvested in Canche estuary in 1970.

TO: *Beta vulgaris* maintainer of sterility "OWEN Type"

CMS: *Beta vulgaris* CMS.

S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub> by southern blot analysis.

*Correspondence between restriction analysis and southern blot analysis.*

The probes which differentiate between male fertile (non segregating) plants and male sterile (segregating) plants are not always the same (Table 1). The cultivated CMS Owen presents patterns which are different from cultivated fertile O Type for the *cox 2*, *atp6*, *atp9* and *pBv4* probes even though the wild segregating S<sub>1</sub> plants differ from all the different N types by *atp6* and S<sub>2</sub> by *cox 2*, *atp9*, *pBv3* and *pBv4* but not *atp6*. This suggests that recombinational events are not the same for S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> and for CMS Owen.

Concerning the different N groups (Table 1), the *B. maritima* N<sub>2</sub> group shows the same hybridization patterns as the *Beta vulgaris* O Type; nevertheless the Eco RI restriction profiles have been showed to be different. The wild N types are separated by the *pBv4* hybridization patterns. The *pBv4* probe seems to hybridize in a region of mtDNA characterized by high recombinational rate. This *pBv4* probe allowed us to identify, at least 5 different types in the *Beta* ssp (data not published). This probe will be a very convenient one for checking mitochondrial polymorphism in natural populations of *B. maritima* or in seed collections of *B. vulgaris*.

*Populations analyses using pBv4, atp6 and cox 2 probes*

*The population polymorphism. Three populations were studied:*

the Canche A and the Canche B populations studied in 1984 (Boutin, 1988) and the Somme population studied in 1986. The classification of 56 families from the populations (table 2 and 3) shows that cytoplasmic polymorphism exists at the within population level. The distribution of the cytotypes in the three populations is different. In Canche A, the two cytotypes ( $N_1$  and  $S_1$ ) were observed over the 21 families checked and the  $S_1$  type is the most abundant. In Canche B all four cytotypes  $N_1$ ,  $N_2$ ,  $N_3$  and  $S_1$  were present among 14 families checked. The  $S_1$  type still is the most abundant. In the Somme population, three cytotypes ( $N_1$ ,  $N_3$ ,  $S_1$ ) were present but there is only one  $S_1$  family in the 22 families analysed. Except the  $N_2$  cytoplasm, all the cytotypes are present in more than one population.  $N_1$  and  $S_1$  are present in the three populations. However the proportions of  $S_1$  and  $N_1$  cytoplasms are different among these three populations (Table 2).

*The non strictly correspondence between phenotype and cytotype.* The last important feature in the molecular analysis of populations is the occurrence of segregating families with the  $N_1$  and  $N_2$  cytotypes (table 3). The Canche A hermaphrodite plant A-12 produced in its progeny, obtained by open pollination, a segregation of females, intermediate females, and hermaphrodites. The intermediate A-16 produced a segregating progeny of intermediate females and hermaphrodites. The hermaphrodites A-40 and B-5, classified as being non segregating, according to the  $G_1$  hermaphrodite progeny, led in the  $G_2$  generation to a segregation of a few intermediate females and a majority of hermaphrodites. The three segregating plants A-12, A-16 and A-40 all possess the

Table 2 : Distribution of the different *Beta maritima* mtDNA types in three natural populations located in two estuaries of the French coast of the English Channel.

Populations	mtDNA types			
	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>
Canche A	7	0	0	14
Canche B	2	1	2	9
Somme A	16	0	4	1
Total	25	1	6	24
Total N/S		32		24

Table 3 : Classification of the *B.maritima* families located in three natural populations from two estuaries of the French coast of the English Channel according to the cytotype, and the correspondence rates between cytoplasmic characteristics (fertile/sterile cytoplasm) and the segregation characteristics of sexual phenotypes in the progenies.

Populations	mtDNA types			
	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>
Canche A	A11 A12* A16* A18 A40* A78 A88	-	-	A1 A76 A7 A84 A38 A89 A45 A103 A50 A104 A55 A105 A70 A106
Canche B	B16 B21	B5*	B13 B15	B9 B58 B19 B63 B31 B70 B50 B98 B57
Somme A	S1 S67 S5 S70 S11 S72 S12 S73 S22 S77 S26 S78 S38 S84 S49 S100	-	S33 S40 S46 S53	S65
Correspondence Cytoplasm/Segregation	Fertile/non segregating 32 / 28		Sterile/segregating 24 / 24	

(\*) segregating plants showing a "fertile" N mtDNA .

- A12: hermaphrodite plant whose progeny segregated in G1  
giving : 2 Fe; 1 IFe; 4 H
- A16: Intermediate female plant whose progeny segregated in G1  
giving : 0 Fe; 3 IFe; 23 H
- A40: hermaphrodite plant whose progeny segregated in G2  
giving : 0 Fe; 2 IFe; 34 H
- B5 : hermaphrodite plant whose progeny segregated in G2  
giving : 0 Fe; 3 IFe; 50 H

N<sub>1</sub> cytoplasm, whereas the hermaphrodite B-5 possess the N<sub>2</sub> cytoplasm.

#### DISCUSSION

Non radioactive probe analysis is the most convenient technique for the characterization of cytoplasmic variation in population studies: because of the easiness of the use of total DNA preparations and because of the low amount of leave material which does not require destruction of the plant analysed. The three probes *atp6*, *cox 2* and *pBv4* have been proved to be specific of mitochondrial information and to be sufficient for a characterization of the cytoplasmic polymorphism at the within population level in *B. maritima*.

Two new cytoplasmic male sterile sources in *B. maritima* have been found. Previous investigations of *B. maritima* CMS sources from Morocco and Turkey (Mikami *et al.*, 1985; Hallden *et al.*, 1988) and the French coast of the Channel (Boutin *et al.*, 1987) using molecular analysis have shown differences between the wild and cultivated cytoplasmic male sterility. The two CMS sources found in *B. maritima* described in this paper are different from the cultivated CMS from the restriction analysis point of view. Nevertheless the mtDNA differences observed, are not sufficient to conclude to a new CMS system in *B. maritima*. In maize C cytoplasm (Pring *et al.*, 1987), different cytoplasmic groups have been identified by molecular analysis; but the genome reorganization appeared to be independent of the CMS trait. In

the same way, the differences observed among the fertile cytoplasms N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub> was not proved to be correlated to CMS. Previous crosses with restorers and maintainers of Owen male sterility used as pollen parents have shown differences in progenies of S<sub>1</sub> *B. maritima* females and *B. vulgaris* females (Boutin *et al.*, 1988). Reciprocal crosses between hermaphrodites on S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> and Owen cytoplasm plants would permit, in a next future, to give an unambiguous answer.

The segregating plants found in N<sub>1</sub> cytoplasm show that the correlation between N cytoplasm and non-segregation is not perfect. This could be due to a nuclear male-sterility in wild beet like the one discovered in *B. vulgaris* (Owen 1952), but in the case of *B. vulgaris*, intermediate females never appeared in mendelian male-sterility system. According to Owen studies the occurrence of intermediate females in progenies is "a relatively sure diagnosis of the cytoplasmic inheritance". The segregating progeny of A 16 was composed of females, intermediate females and hermaphrodites. So the concept of "Normal" cytoplasm which never give male sterility whatever the nuclear information, has probably to be moderated or even revised.

*The cytoplasmic polymorphism at the population level is high.* Two components of the polymorphism organization have to be considered: the spatial organization (i) and the temporal organization of the polymorphism (ii). (i) The mitochondrial polymorphism at the within population level is high: this is well indicated by the four different cytotypes observed among the 14

families checked in population Canche B. This population was also known for its high amount of male sterile plants: 60% of females and 12% of intermediate females (Boutin *et al.*, 1988). Moreover the differences among the different populations studied is pointed out by the differences of the mitochondrial genotypes: for example, the S<sub>1</sub> profile is present in each of the three population studied, but frequencies of this cytoplasm are highly different among populations. (ii) The most surprising feature is the variation of the cytoplasmic types organization with time: it seems to be a rapid cytoplasmic "turn over" in natural populations of *B. maritima*: the S<sub>2</sub> cytoplasm collected in the Canche estuary in 1970 was not present among the 35 families checked from the two Canche populations studied in 1984. The S<sub>2</sub> cytoplasm has probably disappeared from the populations checked. Nevertheless, plants with an S<sub>2</sub> profile have been collected on the English coast of the Channel in 1982. The S<sub>1</sub> type is the most abundant in Canche A and Canche B populations, but a single S<sub>1</sub> family has been observed among the 22 families checked in the Somme population. Is the S<sub>1</sub> cytoplasm disappearing or appearing in the Somme population? Investigation of other populations in the Somme estuary will lead to an answer.

Populations have to be considered from a dynamic point of view concerning their content of cytoplasmic types (Gouyon and Couvet, 1985) . The non equilibrium processes revealed by population genetic studies (Belhassen *et al.*, 1989) are corroborated by this molecular study of the mitochondrial genome in *Beta maritima*

REFERENCES

- Abbot AG, Fauron CMR (1986) Structural alterations in a transcribed region of the T-type cytoplasmic male sterile maize mitochondrial genome. *Curr Genet* 10:777-783
- Bailey-Serres J, Dixon LK, Liddell AD, Leaver CJ (1986) Nuclear-mitochondrial interactions in cytoplasmic male-sterile sorghum. *Theor Appl Genet* 73:252-260
- Belhassen E, Trabaud L, Couvet D, Gouyon PH (1989) An example of non equilibrium processes: gynodioecy of *Thymus vulgaris* L. in burned habitats. *Evolution in press*
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acid Res* 7/1513-1523
- Boeshore ML, Lifshitz I, Hanson MR, Izhar S (1983) Novel composition of mitochondrial genomes in *Petunia* somatic hybrids derived cytoplasmic male sterile and fertile plants. *Mol Gen Genet* 190:459-467
- Boutin V, Pannenbecker G, Ecke W, Schewe G, Saumitou-Laprade P, Jean R, Vernet Ph, Michaelis G (1987) Cytoplasmic male sterility and nuclear restorer genes in a natural population of *Beta maritima*. *Theor Appl Genet* 73:625-629
- Boutin V, Jean R, Valero M, Vernet Ph (1988 b) Gynodioecy in *Beta maritima*. *Oecologia Plantarum* (in press)
- Boutin V, Jean R, Valero M, Vernet Ph (1988 b) La stérilité chez la betterave maritime. In: Variabilité génétique cytoplasmique et stérilité mâle cytoplasmique (ed Bervillé A) Les colloques de l'INRA 45:257-268
- Boutry M, Briquet M (1982) mitochondrial modifications associated with cytoplasmic male sterility in faba beans. *Eur J biochem* 127: 129-135
- Boutry M, Faber AM, Charbonnier M, Briquet M (1984) Microanalysis of plant mitochondrial protein synthesis products: detection of variant polypeptides associated with male sterility. *Plant Mol Biol* 3:445-452
- Clark EM, Izhar S, Hanson MR (1985) Independant segregation of the plastid genome and cytoplasmic male sterility in *Petunia* somatic hybrids. *Mol Gen Genet* 199:440-445

- Coe GE, Stewart D (1977) Cytoplasmic male sterility, self fertility and monogermness in *Beta maritima* L. J Am Soc Sugarbeet Techn 19:257-261
- Conde MF, Pring DR, Schertz KF, Ross WM (1982) Correlation of mitochondrial DNA restriction endonuclease patterns with sterility expression in six male sterile sorghum cytoplasms. Crop Sci 22:536-539
- Darwin CR (1877) The different forms of flower on plants of the same species. Murray London
- Day DA, Neuberger N, Douce R 1985 Interaction between glycine decarboxylase...
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) Aplant DNA minipreparation: version II. Plant Mol Biol Rep 1:19-21
- Dommée B, Assouad MW, Valdeyron G (1978) Natural selection and gynodioecy in *Thymus vulgaris* L. Bot J Linnean Soc 77:17-28
- Dawson AJ, Jones VP, Leaver CJ (1984) The apocytochrome b gene in maize mitochondria does not contain introns and is preceded by a potential ribosome binding site. EMBO J 3:2107-2113
- Dewey RE, Levings CS III, Timothy DH (1985a) Nucleotide sequences of ATPase subunit 6 of maize mitochondria. Plant physiol 79:914-919
- Dewey RE, Schuster AM, Levings CS III, Tymotheny DH (1985b) Nucleotide sequences of F<sub>0</sub>-atpase proteolipid (subunit 9) gene of maize mitochondria. Proc Natl Acad Sci USA 82:1015-1019
- Dufermont E (1987) Structure spatiale et gynodioecie chez *Beta maritima*: utilisation de marqueurs moleculaires (allozymes et plasmide mitochondrial) et phénotypique (stérilité mâle), dans l'étude du régime de la reproduction au sein de plusieurs populations. Diplome d'Etudes Approfondies: Paris-Sud university Orsay center
- Edwardson JR (1970) Cytoplasmic male sterility. Bot Rev 36: 341-420
- Fox TD, Leaver CJ (1981) The *Zea mays* mitochondrial gene coding cytochrome oxidase subunit II has an intervening sequence and does not contain TGA codons 26:315-323
- Gouyon PH, Couvet D (1985) Selfish cytoplasm and adaptation: variation in the reproductive system of thyme. In: Structure and functioning of plant populations (ed Haeck J, Woldenhorp JW) pp299-319. North-Holland, Amsterdam Oxford New York
- Hallden C, Bryngelsson I and Bosemark NO (1988) Two new types of cytoplasmic male sterility found in wild *Beta* beets. Theor Appl Genet 75:561-568

- Hanson MR, Conde MF (1985) Functioning and variation of cytoplasmic genomes: lessons from cytoplasmic nuclear interactions affecting male fertility in plants. *Int Rev Cytol* 94:214-245
- Hiesel R, Shobel W, Schuster W, Brennicke A (1987) The cytochrome oxidase subunit I and III genes in *Oenothera* mitochondria are transcribed from identical promoter sequences. *EMBO J* 6:29-34
- Isaac P, Jones VP, Leaver CJ (1985) The maize cytochrome c oxidase subunit I gene: sequence, expression and rearrangement in cytoplasmic male sterile plants. *EMBO J* 4:1617-1623
- Kafatos FC, Jones CW, Efstratiadis A (1979) determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucl Acid Res* 7:1541-1552
- Kaul MLH (1988) Male sterility in higher plants. *Monographs in Theor Appl Genet*: 1005 pp
- Kolodner R, Tewari KK (1975) The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants. *Biochim Biophys Acta* 402: 372-390
- Leaver CJ, Gray MW (1982) Mitochondrial genomic organization and expression in higher plants. *An Rev Plant Physiol* 33:373-402
- Levings CS III, Pring DR (1977) Diversity of mitochondrial genomes among normal cytoplasms of maize. *J Hered* 68:350-354
- Levings CS III (1983) The plant mitochondrial genome and its mutants. *Cell* 32:659-661
- Lonsdale DM, Brears T, Hodge TP, Melville SE and Rottmann WH (1988) The plant mitochondrial genome: homologous recombination as a mechanism for generating heterogeneity. *Phil Trans R Soc Lond B* 319:149-163
- Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J 1982 "Molecular cloning: Laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New-York
- Mikami T, Kishima Y, Sugiura M, Kinoshita T (1985) Organelle genome diversity in sugar beet with normal and different sources of male sterile cytoplasms. *Theor Appl Genet* 71: 166-171
- Oldemeyer RK (1957) Sugarbeet male sterility. *J Am Soc Sugarbeet Techn* 9:381-386
- Owen FV (1942) Male sterility in sugarbeets produced by complementary effect of cytoplasmic and mendelian inheritance (abstr). *Am J Bot* 29:692

- Owen FV (1945) Cytoplasmic inherited male sterility in sugarbeets. *J Agric Res* 71:423-440.
- Owen FV (1952) Mendelian male sterility in sugarbeets. *Proc Am Sugarbeet Techn* 10:124-132
- Palmer JD (1985) Evolution of chloroplast and mitochondrial DNA in plants and algae. In *Monograph in evolutionary biology:molecular genetics* (ed. RJ MacIntyre), pp.131-240. New York and London: Plenum Press
- Palmer JD (1988) Intraspecific variation and multicircularity in *Brassica* mitochondrials DNA. *Genetics* 118:341-351
- Pearson (1981) Nature and mechanisms of cytoplasmic male sterility in plants: a review. *Hort Science* 16:482-487
- Powling A (1981) Species of small DNA molecules found in mitochondria from sugar beet with normal and male sterile cytoplasms. *Mol Gen Genet* 183: 82-84
- Pring DR, Levings III CS, Hu WWL, Timothy DH (1977) Unique DNA associated with mitochondria in the S type cytoplasm of male sterile maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 2904-2908
- Pring DR , Lonsdale DM (1985) Molecular biology of higher plant mitochondrial DNA *Int Rev Cytol* 97:1-46
- Pring DR, Lonsdale DM, Gracen VE, Smith AG (1987) Mitochondrial DNA duplication/deletion events and polymorphism of the C group of male sterile maize cytoplasms. *Theor Appl Genet* 73:646-653
- Rhoades MH (1950) Gene induced mutation of a heritable cytoplasmic factor producing male sterility in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 36:634-635
- Rouwendal GSA, Van Damme JMM, Wessels JGH (1987) Cytoplasmic male sterility in *Plantago lanceolata* L.: differences between male sterile cytoplasms at the DNA and RNA level. *Theor Appl Genet* 75:59-65
- Shikanai T, Yang ZQ, Yamada Y (1987) Properties of the circular plasmid-like DNA B1 from mitochondria of cytoplasmic male sterile rice. *Plant Cell Physiol* 28 (7) 1243-1251
- Siculella L, Palmer JD (1988) Physical and gene organization of mitochondrial DNA in fertile and male sterile sunflower. CMS associated alterations in structure and transcription of the *atp A* gene. *Nucl Acid Res* 16(9):3787-3799
- Southern EM 1975 Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-517

- Stevens B (1981) Mitochondrial structure. In The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*, life cycle and inheritance (ed. JN Strathern, EW Jones and JR Broach) pp.471-504 New York: Cold Spring Harbor Laboratory
- Van Damme JMM (1983) Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. II. Inheritance of three male sterility types. *Heredity* 50:253-273
- Walker NH, Qin J, Abbott AG (1987) Northern hybridization analysis of mitochondrial gene expression in maize cytoplasm with varied nuclear backgrounds. *Theor Appl Genet* 74:531-537
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119

c) Le polymorphisme chloroplastique.

Chloroplast DNA polymorphism within and among populations of  
*Beta maritima*.

Saumitou-Laprade P, Pannenbecker G, Vernet Ph., Michaelis G.

Courte communication en préparation pour Théor Appl Genet.

TITLE

CHLOROPLAST DNA POLYMORPHISM WITHIN AND AMONG  
POPULATIONS OF BETA MARITIMA

INTRODUCTION

The discovery of new sources of cytoplasmic male sterility is an important feature for commercial production of hybrids. In *Beta vulgaris* the single source of CMS available for breeding programs is the one found by Owen (1942, 1945). New sources of CMS have been discovered in different accessions of *Beta maritima* (the wild beet) from different geographical origins (Oldemeyer, 1957; Coe and Stewart, 1977; Boutin *et al.*, 1987; Halldén *et al.*, 1988). Some of these CMS sources have been proved to be different from the OWEN's CMS for the mitochondrial restriction profiles (Mikami *et al.*, 1985; Boutin *et al.*, 1987; Halldén *et al.*, 1988) and in some cases for the chloroplast DNA restriction profiles (Mikami *et al.*, 1985; Halldén *et al.*, 1988).

The study of *Beta maritima* populations located on the French coast of the English channel has shown the co-occurrence of male fertile and sterile cytoplasmic types within the same population (Boutin *et al.*, 1987). The sexual polymorphism has been corroborated by the cytoplasmic polymorphism revealed by molecular analysis at different levels. The first polymorphism level was observed at the main mitochondrial chromosome level:

two different Sall restriction patterns have been associated with the segregating and non-segregating sexual characteristics of the progenies. The *Beta maritima* mtDNA profiles are different from those observed in *Beta vulgaris* (Boutin *et al.*, 1987). The second level of cytoplasmic polymorphism was given by the presence or the absence of a 10.4 Kb DNA linear plasmid described in *Beta maritima* plants (Pannenbecker in prep). It has been shown that the occurrence of this plasmid is not connected with the male sterility. The study of the chloroplast DNA provides a third level of cytoplasmic polymorphism in *Beta maritima*.

The purpose of this paper is to present the different restriction profiles of *Beta maritima* chloroplast DNA digested by the endonuclease HindIII. Two chloroplast types have been observed among plants within two natural populations of the French Atlantic coast (in the Canche estuary), already shown to be polymorphic for mitochondrial and plasmid DNA. A third type has been characterized in a male-sterile family originating from a different natural population of the French Atlantic coast.

#### MATERIALS AND METHODS

##### *Plant material*

*Beta vulgaris* (L) *ssp maritima* Arcang (wild beet): the original seed stock was collected in three natural populations from the French Atlantic coast. The two populations Canche A and Canche B have been described previously in Boutin *et al.*, (1987) and in Pannenbecker *et al* (in prep). The third population was

located in Mont-Saint-Michel bay (Varinard, unpubl.). The sexual characteristics and the mitochondrial DNA characteristics are analysed in Boutin *et al.* (1987) and Saumitou-Laprade (in prep) and the 10.4 linear plasmid characteristics are presented in Pannenbecker *et al.* (in prep). The characteristics of the studied plants are summarized in table 1.

*Beta vulgaris* (L) *ssp vulgaris* (sugar beet) clone no.0008X1, male sterile, was kindly provided by Kleinwanslebener Saatzucht AG, Einbeck (FRG).

#### *Isolation of chloroplast DNA.*

Chloroplasts isolation and DNA purification from these chloroplasts were performed according to the method previously described (Boutin *et al.*, 1987).

#### *Restriction and gel electrophoresis of DNA.*

Restriction endonuclease digestions were carried out under conditions suggested by the suppliers. The DNA was electrophoresed on 0.7% agarose slab gel buffered with 40 mM Tris-HCl, 20 mM Na-acetate, 2 mM EDTA, 18 mM NaCl, pH8.0.

### RESULTS AND DISCUSSION

The chloroplast DNA preparations from *B.maritima* show three different restriction profiles when they are digested by the *HindIII* restriction enzyme (Fig 1). The ctDNA restriction profile type 1 (lanes 2 and 4) differs from the restriction profiles type 2 (lane 3) and type 3 (Lane 5) by, at least, one 2.45 Kb band

Table 1 : Distribution of the three restriction types of the chloroplast DNA in 9 different plant families characterized by: their geographical origin, Population Canche A, Canche B, and Mont St Michel; by their mitochondrial genotype : N and S and the presence (+) or absence (-) of the mitochondrial linear plasmid

Plant material		Mitochondrial information		Chloroplast information
Population	Ref	mtDNA	Plasmide	ctDNA
Canche A	A 40	N	+	type 1
	A 46-2	N	+	1
	A 78	N	-	1
Canche B	B 3	N	-	1
	B 9	S	+	type 2
Canche A	A 1-8	S	+	2
	A 89	S	+	2
	A 103	S	-	2
Mont St Michel		S	-	type 3

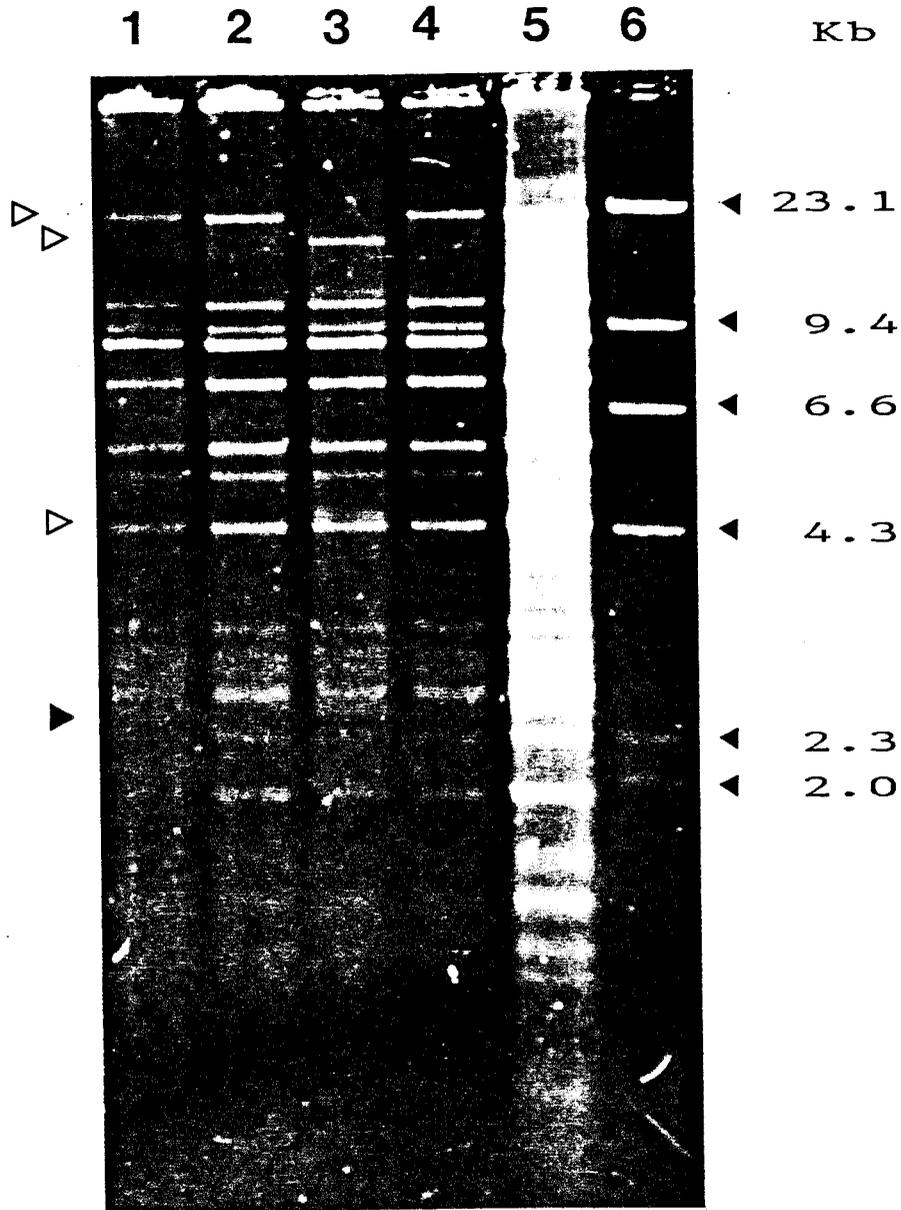


Fig.1. *Hind*III digests of chloroplast DNA from various *Beta maritima* (*B.m.*) and *Beta vulgaris* (*B.v.*) plants. 1 *B.v.* from KWS cytoplasmic male sterile (=female) clone 0008X1; 2 *B.m.* ct DNA type 1: A40 hermaphrodite non segregating plant with plasmid (N+) from Canche A population; 3 *B.m.* ct DNA type 2: A1-8 segregating plant with plasmid (S+) from Canche A population; 4 *B.m.* ct DNA type 1: B 13 non segregating plant without plasmid (N-) from Canche B population; 5 *B.m.* ct DNA type 3: segregating plant without plasmid (S-) from Mont-Saint-Michel population. 6 Lambda DNA digested with *Hind*III as marker; (▶▶) arrow shows the difference between (N) and (S) cytotypes: ctDNA (type 1) and ct DNA (types 2 and 3). (▷▷) arrows show the differences between S cytotypes: ctDNA type 2 and ctDNA type 3.

(Fig. 1 black arrow). The type 2 differs from the type 3 by an additional *Hind III* restriction site in the bigger fragment (fig 1 white arrows) which is divided into two fragments (fig 1 lane 3). No difference has been observed between the restriction profile type 3 of *Beta maritima* and the restriction profile from the *Beta vulgaris* sterile clone. Nevertheless these two types are different for the mitochondrial *SalI* restriction pattern (data not shown). The 3.5Kb *HindIII* fragment specific for the fertile N chloroplast DNA (Mikami *et al.*, 1984) was never observed in the different types analysed: the *Beta maritima* types are different from the *Beta vulgaris* fertile type.

The restriction profile type 1 is observed in plants from Canche A and Canche B having the N+ and N- (table 1) mitochondrial genotype. The type 2 is observed in plants from Canche A and Canche B having the S+ and S- mitochondrial genotype. The type 3 is only observed in plant from the Mont-Saint-Michel bay having the S- mitochondrial genotype.

In the nine families checked, the chloroplast DNA type 1 seems to be associated with the N mitochondrial genotype and the chloroplast types 2 and 3 seem to be associated with the S mitochondrial genotype.

The *Beta maritima* populations were known to be in different ways polymorphic for their mitochondrial types (Boutin *et al.*, 1987; Pannenbecker *et al.*, in prep; Saumitou-Laprade, in prep), but they are also in different ways polymorphic for their chloroplast DNA types. The chloroplast DNA is known to be stable in structure and size (Palmer, 1987; 1988). Nevertheless intraspecific variation in restriction sites has been described

in *Lycopersicum* (Palmer and Zamir, 1982), in *Pisum* (Palmer et al., 1985), in *Zea mays* (Doebley et al., 1987) and in *Brassica* (Palmer et al., 1988). In *Lupinus texensis* the chloroplast DNA variability has been observed within as well as between wild populations (Banks and Birki, 1985).

In *Beta vulgaris*, the plastid DNA restriction patterns were found to be almost identical (Frietzsche et al., 1987) but our results have shown a variability of chloroplast DNA information of *Beta maritima* plants at the within population level. This suggests that chloroplast DNA polymorphism is probably more important than expected in the *Beta vulgaris* ssp.

#### SUMMARY

A chloroplast DNA polymorphism has been observed in *Beta maritima* natural populations. Three HindIII restriction profiles have been identified among plants from populations of the French coast of the English Channel. Two ctDNA types were observed in the same population and seem to be associated with the two different male-sterile and male fertile-cytotypes.

REFERENCES

- Banks JA, Birky CW (1984) Chloroplast DNA diversity is low in a wild plant, *Lupinus texensis*. Proc Natl Acad Sci USA 82:6950-6954
- Boutin V, Pannenbecker G, Ecke W, Schewe G, Saumitou-Laprade P, Jean R, Vernet Ph, Michaelis G (1987) Cytoplasmic male sterility and nuclear restorer genes in a natural population of *Beta maritima*. Theor Appl Genet 73:625-629
- Coe GE, Stewart D (1977) Cytoplasmic male sterility, self fertility and monogermness in *Beta maritima* L. J Am Soc Sugarbeet Techn 19:257-261
- Doebley J, Renfroe W, Blandon A (1987) Restriction site variation in the *Zea* chloroplast genome. Genetics 117: 139-147
- Fritzsche K, Metzloff M, Hagemann R (1987) Comparative restriction endonuclease analysis and molecular cloning of plastid DNAs from wild species and cultivated varieties of the genus *Beta*L. Theor Appl Genet 74:589-594
- Halldén C, Bryngelsson I and Bosemark NO (1988) Two new types of cytoplasmic male sterility found in wild *Beta* beets. Theor Appl Genet 75:561-568

Mikami T, Shinozaki K, Sugiura M, Kinoshita T (1984)  
Characterization of chloroplast DNA from sugar beet with  
normal and male sterile cytoplasms. Jpn J Genet 59:497-504

Mikami T, Kishima Y, Sugiura M, Kinoshita T (1985) Organelle  
genome diversity in sugar beet with normal and different  
sources of male sterile cytoplasms. Theor Appl Genet 71:  
166-171

Oldemeyer RK (1957) Sugarbeet male sterility. J Am Soc Sugarbeet  
Techn 9:381-386

Owen FV (1942) Male sterility in sugarbeets produced by  
complementary effect of cytoplasmic and mendelian inheritance  
(abstr). Am J Bot 29:692

Owen FV (1945) Cytoplasmic inherited male sterility in  
sugarbeets. J Agric Res 71:423-440.

Palmer JD, Zamir D (1982) Chloroplast DNA evolution and  
phylogenetic relationships in *Lycopersicum*. Proc Natl Acad  
Sci USA 79: 5006-5010

Palmer JD, Jorgensen RA, Thompson WF (1985) Chloroplast DNA  
evolution in *Pisum*: patterns of change and phylogenetic  
analysis. Genetics 109:195-213

Palmer JD (1987) Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *Am Nat* 130:S6-S29

Palmer JD (1988) Intraspecific variation and multicircularity in *Brassica* mitochondrials DNA. *Genetics* 118:341-351

### C.- CONCLUSION

L'étude de la stérilité mâle et de son fonctionnement au niveau des gènes permet de donner une vision assez nouvelle du mécanisme. En effet, si au niveau de l'individu, la stérilité mâle apparaît comme la perte d'une fonction (la dénomination "mâle-stérile" est claire à ce sujet), en revanche, au niveau du gène, elle constitue un mécanisme actif. Il s'agit de la création d'une nouvelle unité de fonction, d'un nouveau gène mitochondrial qui amène l'information nucléaire à réagir, non pas pour compenser une fonction déficiente ou perdue, mais pour annuler les effets d'une action du génome mitochondrial.

D'un point de vue évolutif, la relation stérilité mâle et variabilité élevée du génome mitochondrial peut donc se comprendre à la lumière du modèle du conflit nucléocytoplasmique (Cosmides et Tooby, 1981). Le génome cellulaire se compose de différents compartiments d'information génétique. La sélection agit sur chaque compartiment pour modifier le phénotype dans une voie qui augmente la transmission de ses propres gènes. En ce qui concerne la stérilité mâle, l'information mitochondriale qui bloque l'androgénèse, favorisant ainsi la voie femelle, est sélectionnée. La présence de cette information permet ensuite la sélection de gènes nucléaires qui restaurent la fonction mâle (Gouyon et Couvet, 1985). Il s'agit du modèle de la "Reine Rouge" (Van Valen, 1973) transposé au niveau cellulaire: chaque compartiment génétique de la cellule doit évoluer aussi vite qu'il le peut pour survivre.

Ce point de vue dynamique du génome pourrait être une explication de la sélection chez la mitochondrie d'aptitude moléculaire à générer rapidement de la nouveauté génétique. Selon Lonsdale *et al.* (1988) le taux de variation relativement élevé du génome mitochondrial pourrait être permis par la capacité des mitochondries à fusionner (Stevens, 1981).

Nos conclusions ne peuvent aller au delà de la description du polymorphisme cytoplasmique intra- et inter- populations. Nous n'avons pas pu, jusqu'à présent, définir plus de deux systèmes nucléocytoplasmiques différents dans les populations étudiées. En plus des deux systèmes nucléocytoplasmique mis en évidence chez *Beta vulgaris* (Type 0 et CMS Owen), nous n'avons mis en évidence qu'un seul système différent chez *Beta maritima* (cytoplasme ségrégeant S1). En ce qui concerne le cytoplasme N, la faiblesse des remaniements mitochondriaux, ainsi que l'absence des résultats de croisements réciproques (Type 0 X non ségrégeant), en cours actuellement, ne permettent pas de conclure à deux systèmes nucléocytoplasmiques différents, en ce qui concerne la stérilité mâle.

Cependant nous disposons désormais des moyens techniques adaptés à l'étude des populations de *Beta maritima*: la caractérisation du génotype cytoplasmique par la technique des sondes froides permet de tester des effectifs importants. Les sondes que nous possédons sont spécifiques de l'information mitochondriale et permettent de différencier les génotypes mitochondriaux.

L'utilisation de ces marqueurs devrait nous permettre d'étudier, en détail, la répartition de l'information cytoplasmique entre et dans les populations de betteraves sauvages, et de vérifier un point intéressant, apparu dans nos résultats, à savoir le "turn over" des cytoplasmes dans les populations.



## CONCLUSION GENERALE

L'analyse des données acquises sur la stérilité mâle chez *Beta vulgaris*, au cours des 40 années de son utilisation dans la sélection de la betterave sucrière, nous a permis d'en préciser les traits marquants chez cette espèce. Concernant le déterminisme génétique de la stérilité mâle utilisée pour la production d'hybrides, le fait incontestable est la nature nucléocytoplasmique du phénomène. Cependant l'analyse en détail des observations de croisements montre une grande variabilité des résultats. Le fait important reste que la cause principale de la variabilité est de nature génétique. La classification des différents effets génétiques montre que l'effet maternel est prépondérant. La nature de l'interaction noyau/cytoplasme apparaît extrêmement complexe. Le nombre de gènes et de mécanismes génétiques impliqués dans la restauration de la fertilité est probablement important: plus important que ne le laissent paraître les modèles digéniques publiés dans la littérature. Ce type d'observation n'est pas réellement nouveau, dans la mesure où, la complexité du déterminisme génétique de la stérilité mâle a été observée chez plusieurs espèces gynodioïques comme *Plantago lanceolata* (Van Damme, 1983) et *Thymus vulgaris* (Belhassen, 1989).

La stérilité mâle découverte dans les populations de *B.maritima* des estuaires de la Mer du Nord, est très probablement nucléocytoplasmique, et très probablement différente de la

stérilité mâle utilisée chez *B.vulgaris*. Ceci nous permet de penser qu'il existe au moins trois systèmes nucléocytoplasmiques dans le groupe *B.vulgaris* (*B.vulgaris* L.ssp. *vulgaris*, *B.vulgaris* L. ssp. *maritima* Arcang.). En effet, en plus des deux systèmes identifiés chez *B.vulgaris* (CMS et Type 0), nous avons montré qu'il existe un système S et un système N chez *B.maritima*. Nous avons pu déterminer que le système S sauvage est différent des systèmes CMS et Type 0 cultivés. Les systèmes nucléocytoplasmiques N et S identifiés chez *B.maritima* sont différents l'un de l'autre mais nous n'avons pas d'arguments actuellement pour comparer le Type 0 cultivé et le Type N sauvage.

Il semble qu'il soit correct de parler, pour ces 3 grands types cytoplasmiques, de systèmes nucléocytoplasmiques de stérilité, et cela, même en ce qui concerne le type 0, ou type "fertile" ou "non ségrégeant" ou "normal". La découverte de plantes ségrégeantes sur des cytoplasmes de type N (N<sub>1</sub> et N<sub>2</sub>) nous semble un bon argument pour dire qu'il n'existe pas de cytoplasme "fertile", c'est-à-dire un cytoplasme sur lequel la stérilité ne peut s'exprimer. Ce qui est déterminant c'est l'adéquation ou l'inadéquation des génomes cytoplasmiques et nucléaires: dans un certain environnement nucléaire un cytoplasme apparaîtra fertile alors que dans un autre environnement nucléaire il sera jugé ségrégeant. Ce type de situation a été observé par André Bervillé et son équipe à Dijon (Bonnavent 1989) qui ont retrouvé dans une variété cultivée de betterave de jardin (Garden Beet Crapaudine Semaphor) toutes les caractéristiques

cytoplasmiques (mtDNA, ctDNA et plasmides) de la CMS de la betterave sucrière. Ce qui est intéressant c'est que cette variété de betterave de jardin n'a jamais révélé de stérilité mâle auparavant; les croisements effectués entre des plantes de cette variété et le Type 0 mainteneur de la stérilité de la betterave sucrière ont permis d'obtenir des descendance ségrégeantes en seconde génération.

L'inconvénient de ce type de phénomène est qu'il rend impossible toute caractérisation non équivoque d'un type cytoplasmique par le phénotype sexuel ou les caractéristiques sexuelles des descendance. L'extrapolation type non ségrégeant de la descendance vers type N cytoplasmique, n'est pas possible systématiquement. Elle entraîne une perte d'informations cytoplasmiques importante puisque d'une part, le classement original N/S à partir de l'observation des phénotypes des descendance a pu être affinée en types cytoplasmiques  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $N_1$ ,  $N_2$ ,  $N_3$ , et que d'autre part, dans deux cas au moins, le classement de certaines familles jugées S sur la base d'observations de descendance ségrégeantes a du être modifié en  $N_1$  ou  $N_2$  sur la base des données moléculaires.

Ce type d'observation renseigne, d'un point de vue pratique, sur la façon d'aborder l'étude génétique de la stérilité mâle. Deux aspects doivent, obligatoirement, être abordés: l'étude des descendance de croisements contrôlés ou de fécondation libre, et la caractérisation moléculaire du cytoplasme. L'un, utilisé sans tenir compte de l'autre, conduit à une vision tronquée des

mécanismes et à des conclusions fausses. Cela est vrai, comme nous venons de le montrer, de l'utilisation des croisements seuls, mais c'est également vrai des études moléculaires "en aveugle" qui ne s'appuient pas sur une connaissance des caractéristiques sexuelles des plantes et de leur descendance. Par exemple, la façon quasi indiscutable, de considérer le cytoplasme de type moléculaire "normal", systématiquement, comme cytoplasme mâle fertile, vient de la non prise en compte des caractéristiques sexuelles des plantes. En ce qui nous concerne, nous avons été amenés à modifier l'ordre dans lequel il convient d'utiliser les deux méthodes. L'accès à des techniques moléculaires de caractérisation simples du cytoplasme, fait qu'il est plus efficace de différencier les plantes d'une population, d'abord par l'outil moléculaire, et ensuite d'utiliser les variants observés pour tester leur comportement en croisements contrôlés.

L'analyse du polymorphisme cytoplasmique par les méthodes moléculaires nous a permis de caractériser trois niveaux de polymorphisme dans le cytoplasme de *B.maritima*.

Un premier niveau est donné par la découverte d'un plasmide linéaire de 10.4 Kb. Ce plasmide est dit mitochondrial dans la mesure où il est copurifié avec la mitochondrie. Cependant son hérédité n'est pas de type maternel strict: c'est-à-dire, que les descendances maternelles ne sont pas homogènes en ce qui concerne sa présence ou son absence. Des résultats préliminaires du

croisement réciproque de *B. vulgaris* (Type 0 sans plasmide) par *Beta maritima* (A41: Type non ségrégeant sauvage avec plasmide) montrent la présence du plasmide chez des descendants récoltés sur le type 0. Le même type d'observation a été fait chez *Brassica* (Kemble *et al.*, 1986; Kemble: com pers 1988), à partir de l'étude de l'autre plasmide linéaire découvert jusqu'à présent chez les Dicotylédones (Palmer, 1984). L'explication donnée à ce phénomène, si l'on exclut l'hypothèse d'une transmission infectieuse, est celle du passage du plasmide et de la mitochondrie par la voie paternelle. Il y aurait un contrôle nucléaire différentiel de la réplication du chromosome mitochondrial paternel qui serait bloquée, et de la réplication du plasmide qui serait possible. La transmission paternelle de la mitochondrie est connue chez les gymnospermes en particulier (Neale *et al.* 1986). Chez les angiospermes, elle n'a pas été établie de façon certaine. Ce plasmide peut constituer un bon modèle d'étude des relations qui existent entre le génome nucléaire et le génome cytoplasmique; cependant, son hérédité d'apparence nucléocytoplasmique le rend difficile à utiliser comme marqueur de l'information cytoplasmique en populations.

Les cinq types mitochondriaux différenciés par l'utilisation des sondes mitochondriales constituent le second niveau de polymorphisme. Les données préliminaires que nous avons permettent de penser que le contenu des populations varie en types et en proportions de chaque type mitochondrial.

Enfin, les trois types chloroplastiques différents

constituent le troisième niveau du polymorphisme cytoplasmique. La variation du ctDNA est intéressante dans la mesure où elle nous donne accès au marquage du second compartiment de l'information cytoplasmique. Du fait de son organisation moléculaire plus simple l'étude du ctDNA permet de reconstituer les événements mutationnels qui séparent les différents variants et de réaliser une étude phylogénétique des plantes en populations. Ce type d'étude semble d'autant plus réalisable que nos données ainsi que celles obtenues par d'autres groupes (Lumaret comm pers) vont dans le sens d'un polymorphisme chloroplastique relativement important au niveau intrapopulation.

Les différentes observations contenues dans la bibliographie et dans nos résultats, vont dans le sens des deux modèles qui ont guidé notre travail. En ce qui concerne le conflit nucléocytoplasmique, les mécanismes moléculaires de la stérilité, décrits chez *Zea mays* montrent que la stérilité mâle est un mécanisme actif du génome mitochondrial. La stérilité mâle ne correspond pas à la perte d'une information génétique. Au départ, dans le génome mitochondrial, elle correspond à la création d'une nouvelle unité de fonction génétique.

L'étude que nous avons menée nous conduit à penser qu'une bonne compréhension de la stérilité mâle et de son maintien dans les populations de *B.maritima* passe par une étude approfondie des génomes nucléaires et cytoplasmiques. L'analyse du génome cytoplasmique apparaît, aujourd'hui, comme la plus accessible. La comparaison, au niveau des produits de synthèse (protéines), des

mRNA et du mtDNA portant l'information génétique devrait nous permettre de comparer la stérilité mâle active chez *B.vulgaris* et celle active sur S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> de *B.maritima* (programme CEE, post-doctorat: annexe 1). Cette comparaison devrait nous permettre de donner une signification au polymorphisme révélé par les sondes que nous avons utilisées, et d'accéder à de nouvelles sondes utilisables en populations. Nous devrions pouvoir connaître quelles différences révélées par les sondes sont liées à un mécanisme de stérilité mâle.

La caractérisation du génome nucléaire est, pour l'instant, moins accessible. Le marquage des gènes nucléaires de restauration par les marqueurs RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) n'est pas envisageable dans un futur proche. La méthode de préparation de l'ADN total que nous possédons (chap.2 B, b) nous donne accès à l'ADN nucléaire: il ne nous manque "que" les sondes! Des programmes de cartographie du génome nucléaire de *B.vulgaris* sont en cours dans différents laboratoires publics et privés et permettent d'espérer disposer (un jour) des marqueurs RLFP spécifiques des gènes de restauration. Cependant, la technique de marquage RLFP nucléaire peut fournir très rapidement de nombreux marqueurs de l'information nucléaire (plus nombreux et plus fiables que les marqueurs enzymatiques).

Nous disposons, dans l'immédiat, de sondes spécifiques de l'information mitochondriale, parmi lesquelles 5 ont révélé un polymorphisme chez *B.maritima*. Ces sondes vont nous permettre de caractériser précisément les variations de l'information

mitochondriale aux niveaux intra et inter populations dans un même estuaire et entre différents estuaires ainsi que de suivre l'évolution du contenu en type cytoplasmique des populations au cours du temps. Ceci est d'autant plus important que les populations de *B.maritima* apparaissent et disparaissent plus ou moins rapidement en fonction des conditions climatiques. Cette instabilité des populations suggère une étude de leur dynamique d'apparition et d'extinction au niveau de la métapopulation que pourrait constituer un estuaire: de quoi sont constituées les populations qui se succèdent au cours du temps dans un même estuaire et comment la gynodioécie est-elle influencée par ce turn over ?

Ce sont ces deux volets que nous sommes en mesure de développer pour comprendre comment de la molécule à la métapopulation, la stérilité mâle peut se maintenir chez *Beta maritima*.



REFERENCES

- Abbot AG, O'Dell M and Flavell RB (1985) Quantitative variation in components of the maize mitochondrial genome between tissues and between plants with different male-sterile cytoplasms. *Pl Molec Biol* 4:233-240
- Abbot AG, Fauron CMR (1986) Structural alterations in a transcribed region of the T-type cytoplasmic male sterile maize mitochondrial genome. *Curr Genet* 10:777-783
- Allard RW (1953) A gene in lima beans, *Phaseolus lunatus* pleiotropically affecting male sterility and seedling abnormality. *Proc Amer Soc Hort Sci* 69:467-471
- Bailey-Serres J, Dixon LK, Liddell AD, Leaver CJ (1986) Nuclear-mitochondrial interactions in cytoplasmic male-sterile sorghum. *Theor Appl Genet* 73:252-260
- Bandlow G (1964a) Die Pollensterilität von *Beta vulgaris* und deren Arbastarden sowie ihre Verwertung in der Zuckerrübenzüchtung I. *Z Pflanzenzücht* 52:209-240
- Beckett JB (1971) Classification of male-sterile cytoplasms in maize (*Zea mays*). *Crop Sci* 11:724-727
- Belhassen E (1989) Etude évolutive du système reproductif de *Thymus vulgaris*. Analyse écologique, génétique et moléculaire de la stérilité male. Thèse de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
- Belhassen E, Trabaud L, Couvet D, Gouyon PH (1989) An example of non equilibrium processes: gynodioecy of *Thymus vulgaris* L. in burned habitats. *Evolution in press*
- Belliard G, Vedel F and Pelletier G (1979) Mitochondrial recombination in cytoplasm hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. *Nature* 281:401-403
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acid Res* 7/1513-1523
- Bliss FA, Gabelman WH (1965) Inheritance of male sterility in beets, *Beta vulgaris* L. *Crop Sci* 5:403-406
- Boeshore ML, Lifshitz I, Hanson MR, Izhar S (1983) Novel composition of mitochondrial genomes in *Petunia* somatic hybrids derived cytoplasmic male sterile and fertile plants. *Mol Gen Genet* 190:459-467
- Bolz G (1968) Monohybride Vererbung der plasmatisch-genisch bedingten Pollensterilität bei *Beta vulgaris* L. *Z Pflanzenzücht* 60:219-234

- Childers WR, McLennan HA (1960) Inheritance studies of a completely male sterile character in *Medicago sativa* L. *Can J Genet Cytol* 2:57-65
- Chu N, Tewari KK (1982) Arrangement of the ribosomal RNA genes in chloroplast DNA of the leguminosae. *Mol Gen Genet* 186:23-32
- Clark EM, Izhar S, Hanson MR (1985) Independent segregation of the plastid genome and cytoplasmic male sterility in *Petunia* somatic hybrids. *Mol Gen Genet* 199:440-445
- Clark-Walker GD, McArthur CR and Daley DJ (1981) Does mitochondrial DNA length influence the frequency of spontaneous petite mutants in yeast? *Curr Genet* 4:7-12
- Coe GE, Stewart D (1977) Cytoplasmic male sterility, self fertility and monogermness in *Beta maritima* L. *J Am Soc Sugarbeet Techn* 19:257-261
- Conde MF, Pring DR, Schertz KF, Ross WM (1982) Correlation of mitochondrial DNA restriction endonuclease patterns with sterility expression in six male sterile sorghum cytoplasms. *Crop Sci* 22:536-539
- Cosmides LM, Tooby J (1981) cytoplasmic inheritance and intragenomic conflict. *J Theor Biol* 89:83-129
- Correns C (1928) Bestimmung, Vererbung und Verteilung des Geschlechts bei den höheren Pflanzen. *Handb Vererbungswiss* 2:1-138
- Cortessi HA (1967) Investigations made into male sterile beets. *Euphytica* 16:425-432
- Crouse EJ, Schmitt JM, Bohnert HJ (1985) Chloroplast and cyanobacterial genomes, genes and tRNAs: a compilation. *Plant Mol Biol Rep* 3:43-89
- Dale RMK, Duesing JH and Keene D (1981) Supercoiled mitochondrial DNAs. *Proc Natn Acad Sci USA* 78:4453-4457
- Danko SJ, Kono Y, Daly JM, Suzuki Y, Takeuchi S, McCrery DA (1984) Structure and biological activity of a host-specific toxin produced by the fungal corn pathogen *Phyllosticta maydis*. *Biochemistry* 23:759-766
- Darwin CR (1877) The different forms of flower on plants of the same species. Murray London
- Dawson AJ, Jones VP, Leaver CJ (1984) The apocytochrome b gene in maize mitochondria does not contain introns and is preceded by a potential ribosome binding site. *EMBO J* 3:2107-2113
- Day DA, Neuberger N, Douce R 1985 Interaction between glycine decarboxylase
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant mol Biol Reporter* 1:19-21
- Dewey RE, Levings CS III, Timothy DH (1985a) Nucleotide sequences of ATPase subunit 6 of maize mitochondria. *Plant physiol* 79:914-919

- Bonavent JF (1989) Recherche de l'origine de la stérilité mâle cytoplasmique Owen de la betterave sucrière par l'étude des ADN chloroplastiques et mitochondriaux. Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes
- Bosemark N.O. (1972) Studies of cytoplasmic male sterility in Sugar beet. Report of an I.I.R.B. joint study I.I.R.B., 5 (4):232-257
- Boutin V (1984) Variabilité cytologique et génétique de la stérilité mâle chez *Beta maritima*. Mémoire de D.E.A. Université de Lille
- Boutin V, Pannenbecker G, Ecke W, Schewe G, Saumitou-Laprade P, Jean R, Vernet Ph, Michaelis G (1987) Cytoplasmic male sterility and nuclear restorer genes in natural population of *Beta maritima*. Theor Appl Genet 73:625-629
- Boutin V, Saumitou-Laprade P, Valero M, Vernet Ph (1988) Gynodioecy in *Beta maritima*. Oecologia Plantarum 9 (1):61-66
- Boutin V, Jean R, Valero M, Vernet Ph (1988) La stérilité chez la betterave maritime. In: Variabilité génétique cytoplasmique et stérilité mâle cytoplasmique (ed Bervillé A) Les colloques de l'INRA 45:257-268
- Boutin-Stadler V (1987) Sélection sexuelle et dynamique de la stérilité mâle dans les populations de betteraves sauvages, *Beta maritima* L. Thèse de l'université des sciences et techniques de Lille Flandre Artois.
- Boutry M, Briquet M (1982) mitochondrial modifications associated with cytoplasmic male sterility in faba beans. Eur J biochem 127: 129-135
- Boutry M, Faber AM, Charbonnier M, Briquet M (1984) Microanalysis of plant mitochondrial protein synthesis products: detection of variant polypeptides associated with male sterility. Plant Mol Biol 3:445-452
- Brears T, Schardl CL and Lonsdale DM (1986) Chloroplast genome organisation in sugar beet and maize. Pl Mol Biol 6:171-177
- Cavalier-Smith T (1987) Eucaryotes with no mitochondria. Nature Lond 326:332-333
- Ceulemans E (1972) Etude de l'origine et de la nature de la stérilité-mâle cytoplasmique chez la betterave sucrière. Thèse de Doctorat. Université catholique de Louvain
- Chase CD and Pring DR (1985) Circular plasmid DNAs from mitochondria of *Sorghum bicolor*. Pl Molec Biol 5:303-312
- Chase CD, and Pring DR (1986) Properties of the linear N<sub>1</sub> and N<sub>2</sub> plasmid-like DNAs from mitochondria of cytoplasmic male sterile *Sorghum bicolor*. Pl Mol Biol 6:53-64
- Chetrit P, Mathieu C, Vedel F, Pelletier G and Primard C (1984) Mitochondrial DNA polymorphism induced by protoplast fusion in cruciferae. Theor Appl Genet 68:1-6

- Dewey RE, Schuster AM, Levings CS III, Timothy DH (1985b) Nucleotide sequences of F<sub>0</sub>-atpase proteolipid (subunit 9) gene of maize mitochondria. Proc Natl Acad Sci USA 82:1015-1019
- Dewey RE, Levings CS III, Timothy DH (1986) Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm. Cell 44:439-449
- Dommeé B, Assouad MW, Valdeyron G (1978) Natural selection and gynodioecy in *Thymus vulgaris* L. Bot J Linnean Soc 77:17-28
- Doney DL, Theurer JC (1978) Reciprocal recurrent selection in sugarbeet. Field Crops Research 1:173-181
- Dufermont E (1987) Structure spatiale et gynodioecie chez *Beta maritima*: utilisation de marqueurs moléculaires (allozymes et plasmide mitochondrial) et phénotypique (stérilité mâle), dans l'étude du régime de la reproduction au sein de plusieurs populations. Diplôme d'Etudes Approfondies: Paris-Sud university Orsay center
- Dujon B (1981) Mitochondrial genetics and functions. In: The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*, life cycle and inheritance (ed Strathern JN, Jones EW, Broar JR) pp505-635. New York: Cold Spring Harbour Laboratory
- Duvick DN, Snyder RJ, Anderson EG (1961) The chromosomal location of Rf<sub>1</sub> a restorer gene for cytoplasmic pollen sterile maize. Genetics 46:1245-1252
- Duvick DN (1965) Cytoplasmic pollen sterility in corn. Adv Genet 13:1-56
- Edwardson JR (1970) Cytoplasmic male sterility. Bot Rev 36: 341-420
- Erickson L, Grant I, Beverdsdaf W (1986) Cytoplasmic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.) 2. The role of a mitochondrial plasmid. Theor Appl Genet 72:151-157
- Forde BG, Leaver CJ (1979) Mitochondrial genome expression in maize: possible involvement of variant mitochondrial polypeptides in cytoplasmic male sterility. In *The plant genome* ed DR Davies, DA Hopwood pp 131-146 Norwich: John Innes Charity 273 pp
- Forde BG, Leaver CJ (1980) Nuclear and cytoplasmic genes controlling synthesis of variant mitochondrial polypeptides in male-sterile maize. Proc Natl Acad Sci USA 77:418-422
- Garber RC, Lin JJ and Yoder OC (1986) Mitochondrial plasmids in *Cochliobolus heterostrophes*. In extrachromosomal elements in lower eukaryotes (RB Wickner, A Hennebusch, AM Lambowitz, IC Gunsalus and A Hollaender Eds pp105-118 Plenum New York
- Gilham NW (1978) Organelle heredity. Raven New York.

- Goblet JP, Boutry M, Duc G, Briquet M (1983) Mitochondrial plasmid like molecules in fertile and male sterile *Vicia faba* L. (1983) Plant Mol Biol 2:305-309
- Goblet JP, Flamand MC, Briquet M (1985) Curr Genet 9:423-426
- Gottschalk W (1976) Genetically conditioned male sterility: In: Proc Induced mutations in cross breeding, IAEA Vienna 133-140
- Gottschalk W, Kaul MLH (1974) The genetic control of microsporogenesis in higher plants. Nucleus (Calcutta) 17:133-166
- Gouyon PH, Couvet D (1985) Selfish cytoplasm and adaptation: variation in the reproductive system of thyme. In: Structure and functioning of plant populations (ed Haeck J, Woldenhorp JW) pp299-319. North-Holland, Amsterdam Oxford New York
- Hafen L, Stevenson EC (1958) Preliminary studies of five stamenless mutants. Tomato Genet Coop Rep 5:7
- Halldén C, Bryngelsson I and Bosemark NO (1988) Two new types of cytoplasmic male sterility found in wild *Beta* beets. Theor Appl Genet 75:561-568
- Hansche PE, Gabelmann WH (1963a) Digenic control of male sterility in carrots, *Daucus carota* L. Crop Sci 16:371-374
- Hansche PE, Galbelmann WH (1963b) Phenotypic stability of pollen sterile carrots, *Daucus carota* L. Crop Sci 16:371-374
- Hanson MR, Conde MF (1985) Functioning and variation of cytoplasmic genomes: lessons from cytoplasmic nuclear interactions affecting male fertility in plants. Int Rev Cytol 94:214-245
- Heslop-Harrison J (1957) The experimental modification of sex expression in Flowering plants. Biol Rev Camb Philos Soc 32:38-90
- Hiesel R, Shobel W, Schuster W, Brennicke A (1987) The cytochrome oxidase subunit I and III genes in *Oenothera* mitochondria are transcribed from identical promoter sequences. EMBO J 6:29-34
- HirochiKa H, Nakamura K, Sakaguchi K (1984) A linear DNA plasmid from *Streptomyces rochei* with an inverted terminal repetition of 614 bases pairs. EMBO J 3:761-766
- Hogaboam GJ (1957) Factors influencing phenotypic expression of cytoplasmic male sterility in the sugar beet (*Beta vulgaris* L.). J Am Soc Sugar Beet Tech 9:457-465
- Holwerda BC, Jana S, Crosby WL (1986) Chloroplast and mitochondrial variation in *Hordeum vulgare* and *Hordeum spontaneum*. Genetics 114:1271-1291

- Isaac P, Jones VP, Leaver CJ (1985) The maize cytochrome c oxidase subunit I gene: sequence, expression and rearrangement in cytoplasmic male sterile plants. *EMBO J* 4:1617-1623
- Izhar S (1977) Cytoplasmic male sterility in *Petunia*. The interaction between the plasmagene, genetic factors and temperature. *J Hered* 68:238-240
- Jacobs HT and Lonsdale DH (1988) The selfish organelle. *TIG* 3 (12):337-341
- Jain SK, Suneson CA (1966) Increased recombination and selection in barley populations carrying a male sterility factor I. Quantitative variability. *Genetics* 54:1215-1224
- Jones DF, Stinson HT, Khoo U (1957a) Pollen restoring genes. *Connecticut Agric Exp Bull* 610
- Jones DF, Stinson HT, Khoo U (1957b) Transmissible variations in the cytoplasm within species of higher plants. *Proc Natl Acad Scie USA* 43:598-602
- Kafatos FC, Jones CW, Efstratiadis A (1979) determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucl Acid Res* 7:1541-1552
- Kaul MLH (1988) Male sterility in higher plants. *Monographs in Theor Appl Genet*: 1005 pp
- Kemble RJ, Gunn RE, Flavell RB (1980) Classification of normal and male-sterile cytoplasms in maize. II. Electrophoretic analysis of DNA species in mitochondria. *Genetics* 95:451-458
- Kemble RJ, Thompson RD (1982) S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub>, the linear mitochondrial DNAs present in a male sterile line of maize, possess terminally attached proteins. *Nucleic Acid Res* 10:8181-8190
- Kemble RJ, Carlson JE, Erickson LR, Sernyk JL, Thompson DJ (1986) The *Brassica* mitochondrial plasmid and large RNAs are not exclusively associated with cytoplasmic male sterility. *Mol Gen Genet* 205:183-185
- Kemble RJ, Barsby TL, Yarrow SA (1988) Transformation of plant mitochondria with mitochondrial DNA plasmids via protoplast fusion. *Mol Gen Genet* 213:202-205
- Kennell JC, Wix RP, Pring DR (1987) Influence of nuclear background on transcription of maize mitochondrial Region associated with Texas male sterile cytoplasm. *Mol Gen Genet* 210:399-406
- Kinoshita T (1971) Genetical studies on the male sterility of sugarbeets *Beta vulgaris* L. and its related species. *J Fac Agric Hokkaido Univ* 56:255-265
- Kinoshita T (1977) Genetic relationship between pollen fertility restoring genes and cytoplasmic factors in the male sterile mutants of sugarbeets. *Jpn J Breed* 27:19-27

- Kinoshita T (1980) Induction of cytoplasmic male sterility by gamma ray and chemical mutagens in sugar beets. *Gamma Field Symp* 19:27-48
- Kinoshita T, Takahashi M (1972) Genic male sterility found in *Beta maritima* L. *Jpn J Breed* 22:11-19
- Kirk JTO, Tilney-Bassett (1978) *The plastids: Their chemistry, structure, growth and inheritance*. 2d ed Elsevier, Amsterdam
- Kishima Y, Mikami T, Harada T, Shinokazi K, Kinoshita T (1986) Restriction fragment map of sugarbeet (*B. vulgaris* L) chloroplast DNA. *Plant mol Biol* 7:201-205 (1986)
- Kistler HC and Leong SA (1986) Linear plasmid like DNA in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *Conghutinans*. *J Bacteriol* 167:587-593
- Knapp E (1955) Zur plasmonisch kontrollierten Pollensterilität der Zuckerrüben. *Züchter* 25:231-236
- Knapp E (1969) Zur Genetik der plasmatisch kontrollierten Pollensterilität der Zuckerrübe. *Int Inst Res Bull* 4:145-159
- Kolodner R, Tewari KK (1975) The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants. *Biochim Biophys Acta* 402: 372-390
- Koller B, Delius H (1980) *Vicia faba* Chloroplast DNA has only one set of ribosomal RNA genes as shown by partial denaturation mapping and R-loop analysis. *Mol gen genet* 178:261-269
- Kool AJ, Bot PVM, Marrewijk van GAM (1983) Analysis of cytoplasmic variations associated with cytoplasmic male sterility in *Petunia hybrida* plants (abstr) 10th Eucarpia cong Wageningen, p115
- Kovac L, Lazowska J and Slonimski PP (1984) A yeast with linear molecules of mitochondrial DNA. *Molec Gen Genet* 197:420-424
- Laughnan JR, Gabay-Laughnan S (1983) Cytoplasmic male sterility in maize. *Annu Rev Genet* 17:27-48
- Leaver CJ and Gray MW (1982) Mitochondrial genomic organization and expression in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 33:373-402
- Leaver CJ, Isaac GP, Bailey-Serres ID, Small ID, Hanson DK and Fox TD (1985) Recombination events associated with the cytochrome C oxydase submit I gene in fertile and cytoplasmic male sterile maize and Sorghum. Elsevier Science Publishes BV:111-122
- Lemieux C and Lee RW (1987) Non-reciprocal recombination between alleles of the chloroplast 23S rRNA gene in interspecific *Chlamydomonas* crosses. *Proc Natn Acad Sci USA* 84:4166-4170
- Levings CS III (1983) The plant mitochondrial genome and its mutants. *Cell* 32:659-661

- Levings CS III, Pring DR (1977) Diversity of mitochondrial genomes among normal cytoplasms of maize. *J Hered* 68:350-354
- Levings CS III, Shah DM, Hu WWL, Pring DR, Timothy DH (1979) Molecular heterogeneity among different maize cytoplasms. In: Cumings DJ, Borst P, Dawid IB, Weissman SM, Fox CF (eds) *Extrachromosomal DNA*. Academic press, pp 63-73
- Levings CS III, Kim BD, Pring DR, Conde MF, Mans RJ, (1980) Cytoplasmic reversion of cms-S in maize: association with a transpositional event. *Science* 209:1021-1023
- Levings CS III and Sederoff RR (1983) Nucleotide sequence of the S<sub>2</sub> mitochondrial DNA from the S cytoplasm of maize. *Proc Natn Acad Sci USA* 80:4055-4059
- Lonsdale DM, Hodge TP and Fauron CMR (1984) The physical map and organisation of the mitochondrial genome from the fertile cytoplasm of maize. *Nucl Acids Res* 12:9249-9261
- Lonsdale DM (1987) The molecular biology and genetic manipulation of the cytoplasm of higher plants. In *Genetic engineering* (ed. PWJ Rigby) vol 6 pp.47-102 London:Academic Press
- Lonsdale DM, Brears T, Hodge TP, Melville SE and Rottmann WH (1988) The plant mitochondrial genome: homologous recombination as a mechanism for generating heterogeneity. *Phil Trans R Soc Lond B* 319:149-163
- McNay JW, Pring DR, Lonsdale DM (1983) Polymorphism of mitochondrial DNA'S' regions among normal cytoplasms of maize. *Plant Mol Biol* 12:177-189
- Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J 1982 "Molecular cloning: Laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New-York
- Marechal L, Runeberg-Roos P, Grienenberger JM, Colin J, Weil JA, Legeune B, Quetier F and Lonsdale DM (1987) Homology in the region containing a tRNA<sup>Trp</sup> and a (complete or partial) tRNA<sup>Pro</sup> gene in wheat mitochondrial and chloroplast genomes. *Curr Genet* 12:91-98
- Mikami T, Kishima Y, Sugiura M, Kinoshita T (1985) Organelle diversity in sugar beet with normal and different sources of male sterile cytoplasms. *Theor Appl Genet* 71: 166-171
- Mikami T, Harada T, Kinoshita T (1986) Heterogeneity of circular mitochondrial DNA molecules from sugar beet with normal and male sterile cytoplasms. *Current Genet* 10: 695-700
- Morin GB and Cech TR (1986) The telomeres of the linear mitochondrial DNA of *Tetrahymena thermophila* consist of 53bp tandem repeats. *Cell* 46:873-883
- Mutschler MA, Bliss FA (1980) Genic male sterility in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Amer Soc Hort Sci* 105:202-205

- Nagao S, Kinoshita T (1962) Casual genes and characters expression of male sterility in beets. *Fac Agric Hokkaido Univ* 52:51-59
- Nielson K, Nemazi A (1967) Selection for the type 0 character in *Beta vulgaris*. *Am Sugar Beet Techn* 14:368-376
- Ohyama K, Fukuzawa H, Kohchi T, Shirai H, Sano S, Umesono K, Shiki Y, Takeuchi M, Chang Z, Aota S, Inokuchi H, Ozeki H (1986) Chloroplast gene organisation deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature Lond* 322:572-574
- Oldemeyer RK (1957) Sugarbeet male sterility. *J Am Soc Sugarbeet Techn* 9:381-386
- Owen FV (1942) Male sterility in sugarbeets produced by complementary effect of cytoplasmic and mendelian inheritance (abstr). *Am J Bot* 29:692
- Owen FV (1945) Cytoplasmically inherited male sterility in sugar beets. *J Agric Res* 71:423-440
- Owen FV (1949) Interpretation of cytoplasmically inherited male sterility in sugarbeets. In *Proc 8th Int Cong Genet* 638-639
- Owen FV (1952) Mendelian male sterility in sugarbeets. *Proc Am Sugarbeet Techn* 10:124-132
- Owen FV (1954) Hybrid sugarbeets made by utilizing both cytoplasmic and mendelian male sterility. *Proc Am Soc Sugarbeet Techn* 8:64-67
- Paillard M, Sederoff RR and Lewings CSIII (1985) Nucleotide sequence of the S<sub>1</sub> mitochondrial DNA from S cytoplasm of maize *EMBO J* 1125-1128
- Palmer JD (1985) Evolution of chloroplast and mitochondrial DNA in plants and algae. In *Monograph in evolutionary biology:molecular genetics* (ed. RJ MacIntyre), pp.131-240. New York and London: Plenum Press
- Palmer JD (1988) Intraspecific variation and multicircularity in *Brassica* mitochondrials DNA. *Genetics* 118:341-351
- Palmer JD, Shields CR, Cohen DB, Orton TJ (1983) An unusual mitochondrial DNA plasmid in the genus *Brassica*. *Nature (London)* 301: 725-728
- Palmer JD (1987) Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *Am Nat* 130:56-529
- Palmer JD and Herbon LA (1987) Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence (Submitted).
- Palmer RG, Winger CL, Albertsen MC (1976) Independent mutations for male sterility at the *ms<sub>1</sub>* locus in soybeans. *Agron Abstr Am Soc Agron* 59
- Palmer JDx, Osorio J, Aldrich J, Thompson WF (1987) Chloroplast DNA evolution among legumes: loss of a large inverted repeat occurred prior to other sequence rearrangements. *Curr Genet* 11:275-286

- Nagao S, Kinoshita T (1962) Casual genes and characters expression of male sterility in beets. *Fac Agric Hokkaido Univ* 52:51-59
- Nielson K, Nemazi A (1967) Selection for the type 0 character in *Beta vulgaris*. *Am Sugar Beet Techn* 14:368-376
- Ohyama K, Fukuzawa H, Kohchi T, Shirai H, Sano S, Umesono K, Shiki Y, Takeuchi M, Chang Z, Aota S, Inokuchi H, Ozeki H (1986) Chloroplast gene organisation deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature Lond* 322:572-574
- Oldemeyer RK (1957) Sugarbeet male sterility. *J Am Soc Sugarbeet Techn* 9:381-386
- Owen FV (1942) Male sterility in sugarbeets produced by complementary effect of cytoplasmic and mendelian inheritance (abstr). *Am J Bot* 29:692
- Owen FV (1945) Cytoplasmically inherited male sterility in sugar beets. *J Agric Res* 71:423-440
- Owen FV (1949) Interpretation of cytoplasmically inherited male sterility in sugarbeets. In *Proc 8th Int Cong Genet* 638-639
- Owen FV (1952) Mendelian male sterility in sugarbeets. *Proc Am Sugarbeet Techn* 10:124-132
- Owen FV (1954) Hybrid sugarbeets made by utilizing both cytoplasmic and mendelian male sterility. *Proc Am Soc Sugarbeet Techn* 8:64-67
- Paillard M, Sederoff RR and Lewings CSIII (1985) Nucleotide sequence of the S<sub>1</sub> mitochondrial DNA from S cytoplasm of maize *EMBO J* 1125-1128
- Palmer JD (1985) Evolution of chloroplast and mitochondrial DNA in plants and algae. In *Monograph in evolutionary biology:moleculary genetics* (ed. RJ MacIntyre), pp.131-240. New York and London: Plenum Press
- Palmer JD (1988) Intraspecific variation and multicircularity in *Brassica* mitochondrials DNA. *Genetics* 118:341-351
- Palmer JD, Shields CR, Cohen DB, Orton TJ (1983) An unusual mitochondrial DNA plasmid in the genus *Brassica*. *Nature (London)* 301: 725-728
- Palmer JD (1987) Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *Am Nat* 130:56-529
- Palmer JD and Herbon LA (1987) Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence (Submitted).
- Palmer RG, Winger CL, Albertsen MC (1976) Independent mutations for male sterility at the *msj* locus in soybeans. *Agron Abstr Am Soc Agron* 59
- Palmer JDx, Osorio J, Aldrich J, Thompson WF (1987) Chloroplast DNA evolution among legumes: loss of a large inverted repeat occurred prior to other sequence rearrangements. *Curr Genet* 11:275-286

- Palmer RG, Albertsen MC, Heer H (1987a) Pollen production in soybeans with respect to genotype, environment and stamen position. *Euphytica* 27:427-433
- Pearson (1981) Nature and mechanisms of cytoplasmic male sterility in plants: a review. *Hort Science* 16:482-487
- Powling A (1981) Species of small DNA molecules found in mitochondria from sugar beet with normal and male sterile cytoplasms. *Mol Gen Genet* 183: 82-84
- Pring DR, Levings III CS, Hu WWL, Timothy DH (1977) Unique DNA associated with mitochondria in the S type cytoplasm of male sterile maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 2904-2908
- Pring DR, Levings CS III (1978) Heterogeneity of maize cytoplasmic genomes among male sterile cytoplasms. *Genetics* 89:121-136
- Pring DR, Levings CS, Conde MF (1979) The organelles genomes of cytoplasmic male sterile maize and sorghum. In: *Proc 4th John Innes Symp* 111-120
- Pring DR, Schertz KF, Conde MF (1981) Plasmid like and other cytoplasmic DNA Characteristics of male sterile *Sorghum*. *Sorghum Newslett* 24:132
- Pring DR, Conde MF, Schertz KF; Levings III CS (1982) Plasmid-like DNAs associated with mitochondria of cytoplasmic male sterile sorghum. *MOL Gen Genet* 186: 180-184
- Pring DR and Lonsdale DM (1985) Molecular biology of higher plant mitochondrial DNA. *Int Rev Cytol* 97:1-46
- Pring DR, Lonsdale DM, Gracen VE, Smith AG (1987) Mitochondrial DNA duplication/deletion events and polymorphism of the C group of male sterile maize cytoplasms. *Theor Appl Genet* 73:646-653
- Quétier F and Vedel F (1977) Heterologous populations of mitochondrial DNA molecules in Higher Plants. *Nature* 268:365-368
- Rhoades MH (1950) Gene induced mutation of a heritable cytoplasmic factor producing male sterility in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 36:634-635
- Rick CM (1945) A survey of cytogenetic causes of unfruitfulness in tomato. *Genetics (The Hague)* 30:347-362
- Rogers JS, Edwardson JR (1952) The utilization of cytoplasmic male sterile inbreds in the production of corn hybrids. *Agron J* 44:8-13
- Rohrbacht U (1962) Report on sexual years investigation on male sterility sugar beet. *I.I.R.B. 25ème Congrès* 389-395
- Rohrbacht U (1965a) Beiträge zum Problem der Pollensterilität bei *Beta vulgaris* L. II. Untersuchungen über die Wirkung der Herkunft auf dem Phänotyp des Merkmals Pollensterilität. *Z Pflanzenzücht* 54:23-45

- Rottman WH, Brears T, Hodge TP, Lonsdale DM (1987) A mitochondrial gene is lost via homologous recombination during reversion of CMS T maize to fertility. *EMBO J* 6:1541-1546
- Rouwendal GSA, Van Damme JMM, Wessels JGH (1987) Cytoplasmic male sterility in *Plantago lanceolata* L. : differences between male sterile cytoplasms at the DNA and RNA level. *These Appl Genet* 75:59-65
- Samac DA and Leong SA (1988) Two linear plasmids in mitochondria of *Fusarium solani* f.sp. *Cucurbitae*. *Plasmid* 19:57-67
- Schardl CL, Lonsdale DM, Pring DR and Rose KR (1984) Linearization of maize mitochondrial chromosomes by recombination with linear episomes. *Nature Lond* 301:292-296
- Schardl CL, Lonsdale DM (1985) Mitochondrial DNA rearrangements associated with fertile revertants of S type male sterile maize. *Cell* 43:361-368
- Sederoff RR (1984) Structural variation in mitochondrial DNA. *Adv Genet* 22:2-108
- Shikanai T, Yang ZQ and Yamada Y (1987) Properties of the circular plasmid-like DNA B1 from mitochondria of cytoplasmic male sterile rice. *Plant Cell Physiol* 28 (7) 1243-1251
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwonges J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng Y, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H Sugiura M (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J* 5:2043-2049
- Siculella L, Palmer JD (1988) Physical and gene organization of mitochondrial DNA in fertile and male sterile sunflower. CMS associated alterations in structure and transcription of the *atp A* gene. *Nucl Acid Res* 16(9):3787-3799
- Sisco PH, Gracen VE, Everett HL, Earle DE, Pring DR, McNay JW, Levings CS III (1985) Fertility restoration and mitochondrial nucleic acids distinguish at least five subgroups among cms-S cytoplasms of maize (*Zea mays* L). *Theor Appl Genet* 71:5-15
- Southern EM 1975 Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-517
- Stein H, Gabelman WH, Struckmeyer BE (1959) Reversion in cytoplasmic male sterile plants of *Beta vulgaris* *J Am Soc Sugarbeet Techn* 10:619-623
- Stevens B (1981) Mitochondrial structure. In *The molecular biology of the yeast Saccharomyces, life cycle and inheritance* (ed. JN Strathern, EW Jones and JR Broach) pp.471-504 New York: Cold Spring Harbor Laboratory

- Suzuki Y, Danko SJ, Daly JM, Kono Y, Knoche HW, Takeuchi S (1983) Comparison of activities of the host-selective toxin of *Helminthosporium maydis*, race T, and a synthetic C41 analog. *Plant Physiol* 73:440-444
- Theurer JC (1970) Variability in partial male-fertile sugar beet. *J Am Soc Sugarbeet Techn* 16:253-263
- Theurer JC (1971) Inheritance studies of pollen restorer from Ruby queen Table beet. *J of A.S.S.B.T.* 16 (4):355-358
- Timothy DH, Levings CS III, Hu WWL and Goodman HH (1983) Plasmid-like mitochondrial DNAs in *Diploperenial tevsinte*. *Maydica* 28:139-149
- Turpen T, Garger SJ, Marks MD and Grill LK (1987) Molecular cloning and physical characterization of a *Brassica* linear mitochondrial plasmid. *Mol Gen Genet* 209:227-233
- Ullstrup AJ (1972) The impacts of the Southern Corn Leaf Blight epidemics of 1970-1971. *Annu Rev Phytopathol* 10:37-50
- Umesono K and Oseki H (1987) Chloroplast gene organization in plants TIG 3:281-287
- Van Damme JMM (1983) Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. II. Inheritance of three male sterility types. *Heredity* 50:253-273
- Van Valen L (1983) A new evolutionary law. *Evol Theory* 1:1-10
- Varinard O (1983) Contribution à l'étude du polymorphisme chimique et sexuel chez les espèces végétales. Mémoire de D.E.A. Montpellier CEPE
- Vedel F, Mathieu C, Lebacq P, Ambard-Bretteville F, Remy R (1982) Comparative macromolecular analysis of the cytoplasm of normal and male sterile *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 62:255-262
- Vedel F, Mathieu C (1983) Physical and gene mapping of chloroplast DNA from normal and male sterile (radisch cytoplasm) lines of *Brassica napus*. *Current Genetics* 7:13-20
- Walker NH, Qin J, Abbott AG (1987) Northern hybridization analysis of mitochondrial gene expression in maize cytoplasm with varied nuclear backgrounds. *Theor Appl Genet* 74:531-537
- Ward BL, Anderson RS and Bendich AJ (1981) The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (Curcubitaceae). *Cell* 25:793-803
- Weissinger AK, Timothy DH, Levings CS III, Hu WW and Goodman MM (1982) Unique plasmid like mitochondrial DNAs from indigenous maize races of Latin America. *Proc Natu Acad Sci USA* 79:1-5

- Wise RP, Pring DR, Gengenbach BG (1987a) Mutation to male fertility and toxin insensitivity in T-cytoplasm maize is associated with a frameshift in a mitochondrial open reading frame. Proc Natl Acad Sci USA 84:2858-2862
- Wise RP, Pring DR, Gengenbach BG (1987b) Urf13-T cytoplasm maize encodes a 13kD polypeptide. Plant Mol Biol 9:121-126
- Whitfield PR, Bottomley W (1983) Organization and structure of chloroplast genes. Annu Rev Plant Physiol 34:279-310
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. Gene 33:103-119
- Yoder OC (1973) A selective toxin produced by *Phyllosticta maydis*. Phytopathology 63:1361-1366
- Young EG, Hanson MR (1987) A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. Cell 50:41-49
- de Zamaroczy M, Faugeron-Fonty G and Bernardi G (1983) Excision sequences in the mitochondrial genome of yeast. Gene 21:193-202



# LA STERILITE MALE DANS LES POPULATIONS NATURELLES: ETUDE D'UNE POPULATION DE *BETA MARITIMA*

V. BOUTIN, P. SAUMITOU-LAPRADE, R. JEAN et P. VERNET

## Résumé

Chez la betterave sauvage, *Beta maritima*, les données génétiques et moléculaires suggèrent (Boutin *et al.*, en prep.) que la stérilité mâle observée dans une population de l'estuaire de la Canche (France) est du même type (nucléo-cytoplasmique) que celle étudiée par Owen chez la betterave cultivée, mais est contrôlée par une paire "gènes de stérilité cytoplasmiques-gènes de restauration nucléaires" différente. Les phénotypes sexuels peuvent être caractérisés par leur cytotype et l'état de restauration. De ce fait, une approche de la dynamique de la stérilité mâle dans les populations de betteraves peut être envisagée.

## Summary

In the wild *Beta maritima*, genetical and molecular data strongly suggest (Boutin *et al.*, in prep.) that male sterility observed in one population of the Canche estuary (France), similar to that studied by Owen in cultivated beet, is supported by a different cytoplasmic gene-nuclear gene pairing. Sexuals phenotypes can be characterised on the basis of cytotype and of state of restoration. Therefore the dynamics of male sterility within populations can be approached.

## Introduction

Les modèles classiques expliquent la présence de plantes mâles-stériles (femelles) à l'intérieur d'une population gynodioïque comme une adaptation à l'allogamie. Une telle explication ne peut pas être retenue pour la betterave, celle-ci étant auto-incompatible. Par ailleurs de nombreux modèles sont basés sur un contrôle purement nucléaire de la gynodioecie (Lewis, 1941; Maynard-Smith, 1978). Or, les données actuellement disponibles, provenant des populations naturelles de plusieurs espèces montrent qu'un déterminisme de la stérilité mâle faisant intervenir des informations nucléaires et cytoplasmiques est beaucoup plus fréquent qu'un contrôle uniquement nucléaire (Khey-Pour, 1976, chez *Origanum vulgare*; Van Damme, 1984, chez *Plantago lanceolata*; Domme *et al.*, 1983 et Domme et Jacquard, 1985, chez *Thymus vulgaris*).

Le modèle de Génétique des Populations proposé par Gouyon (Delannay *et al.*, 1981; Gouyon *et al.*, 1983; Couvet *et al.*, 1985; Couvet et Gouyon, 1985) rend compte de la présence de femelles dans les populations par des interactions entre gènes nucléaires et gènes cytoplasmiques. N'importe quelle mutation cytoplasmique qui conduit à une disharmonie avec l'information génétique nucléaire contrôlant l'androgenèse, ne serait pas contre-sélectionnée: lorsque les gènes cytoplasmiques de stérilité mâle sont présents dans une population sans leurs gènes de restauration spécifique, le nombre de femelles augmente dans la population, même si ces femelles n'ont qu'une valeur sélective très légèrement supérieure à celle des hermaphrodites. Ainsi, dans un premier temps, la transmission des gènes cytoplasmiques (via la femelle) serait favorisée au détriment des gènes nucléaires. Ensuite, plus la fréquence des hermaphrodites diminue, plus la sélection en faveur des gènes nucléaires de restauration augmente. D'après ce modèle, la population est d'abord envahie par des plantes à cytoplasme stérile; ensuite de nouveaux hermaphrodites, sur cytoplasme stérile et avec les gènes de restauration, apparaissent progressivement. De

nombreux cycles semblables pourraient se succéder au cours du temps à l'intérieur d'une population. Ceci pourrait se traduire par la présence de plusieurs couples "gènes cytoplasmiques de stérilité-gènes nucléaires de restauration"; c'est ce que suggère le travail de Khey-Pour (1976) sur *Origanum*.

Dans un tel modèle, le maintien des femelles dans les populations impose des valeurs sélectives différentes non seulement entre les phénotypes sexuels mais aussi entre les génotypes (Delannay *et al.*, 1981). L'étude du maintien des plantes femelles demande donc, tout d'abord, d'établir le mode de contrôle génétique de ce polymorphisme sexuel.

### Eléments concernant le contrôle génétique de la stérilité mâle observée

L'analyse de la stérilité mâle dans le genre *Beta* a commencé avec les travaux de Owen (1942-1945) sur *Beta vulgaris*. Il démontre que la stérilité mâle met en jeu deux composantes, l'une cytoplasmique, au sein de laquelle on distingue deux types de cytoplasmes: le cytoplasme stérile S et le cytoplasme normal N, l'autre nucléaire. A un cytoplasme stérile S correspondraient des gènes de restauration spécifiques. Le phénotype sexuel des plantes sur cytoplasme S est fonction de l'état des gènes de restauration. Sur le cytoplasme N, les gènes de restauration ne s'expriment pas, les plantes sont toujours hermaphrodites.

L'étude des populations sauvages de *Beta maritima* - ancêtre des betteraves cultivées - le long de la côte atlantique française nous a permis d'identifier des plantes femelles (5 à 62% suivant les populations). La population étudiée (66 individus), située dans l'estuaire de la Canche près d'Étaples (Pas-de-Calais), est composée de 62% de femelles, 8% d'intermédiaires et 30% d'hermaphrodites. La présence des femelles dans la population répond-elle au même type de déterminisme que celui rencontré chez *Beta vulgaris*? Pour répondre à cette question, nous avons entrepris une étude combinée, génétique et moléculaire, car plusieurs travaux ont montré une association entre les ADN mitochondrial et/ou chloroplastique et la stérilité mâle (Powling, 1982; Powling et Ellis, 1983; Mikami *et al.*, 1985).

Les descendances maternelles issues de fécondations libres *in situ* de ces plantes sont de deux types: (1) la majorité des individus donne des descendances ségrégeantes; (2) certains hermaphrodites ne donnent que des hermaphrodites (figure 1). Pour trois de ces descendances les profils de restriction des ADN mitochondriaux et chloroplastiques (en collaboration avec l'équipe du Professeur Michaelis, Université de Düsseldorf, R.F.A.), obtenus respectivement par Sal I et Bam HI ont été étudiés (Boutin *et al.*, en préparation).

La composante nucléaire est démontrée par le fait que les femelles ségrégent et donnent des hermaphrodites dans leurs descendances. Le nombre de gènes nucléaires impliqués requiert une étude complémentaire. L'existence de la composante cytoplasmique est révélée par les différences de l'ADN mitochondrial des descendances maternelles: d'une part les individus descendants d'une plante femelle et d'une hermaphrodite ségrégeante (quels que soient leurs phénotypes sexuels) présentent tous le même profil d'ADN mitochondrial, et d'autre part, la descendance d'une plante hermaphrodite non ségrégeante présente un profil nettement différent. L'analyse combinée, génétique et moléculaire, de ces trois plantes et de leurs descendances permet de ce fait la détection de deux types cytoplasmiques différents (respectivement S, stérile et N, normal) à l'intérieur d'une population. Dans cette étude, les ADN mitochondriaux et chloroplastiques de *Beta maritima* (sauvage) et de *Beta vulgaris* (forme cultivée, betterave à sucre) ont été comparés. Aucune variabilité de l'ADN chloroplastique n'a pu être détectée entre les deux taxa par l'enzyme de restriction utilisée. En ce qui concerne l'ADN mitochondrial: (1) les hermaphrodites non ségrégeantes de *Beta maritima* de deux provenances (estuaire de la Canche et jardin botanique de Düsseldorf (origine inconnue)) présentent le même profil de restriction qui diffère de celui de *Beta vulgaris* par seulement trois bandes; (2) les individus femelles de *Beta maritima* et de *Beta vulgaris* offrent par contre des profils très différents.

Les présents résultats suggèrent une nouvelle stérilité mâle chez *Beta*, différente de celle décrite par Owen et, comme cette dernière, présentant, semble-t-il, deux composantes génétiques: l'une nucléaire, l'autre cytoplasmique.

Jusqu'à présent une seule source de stérilité mâle était disponible dans les programmes de production de semences et d'amélioration de la betterave à sucre (Barocka, 1985). Il était donc intéressant d'obtenir un nouveau matériel mâle stérile qui pourrait être utilisé alternativement aux lignées mâles-stériles dites de Owen possédées par les sélectionneurs.

## Caractérisation des phénotypes sexuels dans la population étudiée

Les résultats ci-dessus peuvent être étendus à tous les individus de la population et fournissent la base d'une caractérisation plus fine, génétique et moléculaire, des phénotypes sexuels (tableau I):

- la relation existant entre descendances ségrégeantes et cytoplasme S permet d'identifier le cytoplasme S par le type de descendance: les descendances ségrégeantes sont sur cytoplasme S. La fréquence relative du cytoplasme S (0.78) dans la population est plus élevée que celle des femelles (0.62);
- parmi les plantes S, la fréquence de plantes partiellement ou totalement restaurées (respectivement I et H) par des gènes de restauration peut être estimée à 0.17 (16/78). Cette fréquence ne peut pas être évaluée chez les plantes N;
- les plantes non ségrégeantes peuvent être de deux types: 1. à cytoplasme N: la fréquence de restauration ne peut pas être évaluée chez ces plantes, les gènes nucléaires de restauration étant inactifs sur ce cytotype; 2. à cytoplasme S, avec gènes de restauration fixés.

## Conclusion

Pour vérifier la pertinence du modèle nucléo-cytoplasmique de dynamique de la stérilité mâle dans les populations, l'identification des phénotypes sexuels n'est pas suffisante; sa vérification impose à la fois la détermination des cytotypes et des génotypes pour les gènes de restauration. Une telle vérification est maintenant partiellement possible chez *Beta maritima*; cependant une caractérisation plus précise des phénotypes sexuels est encore nécessaire.

Au plan génétique et moléculaire:

- (i) Les gènes impliqués dans la restauration sont-ils dominants ou récessifs ? Quels loci sont en jeu ? Quel est leur mode d'interaction ?
- (ii) Y-a-t-il un rapport constant entre la stérilité mâle et les différents profils de restriction ?
- (iii) Le modèle implique une diversité cytoplasmique importante; l'utilisation de profils de restriction pour définir les cytotypes pourrait, peut-être, être remplacée par une caractérisation fonctionnelle (étude des profils comparés des produits de transcription de l'ADN mitochondrial).

Au plan fondamental, à côté de la recherche d'un avantage femelle mieux ciblé en fonction des cytotypes et de l'état de restauration, l'utilisation des descendances maternelles des plantes en place permet de prévoir la structure génétique à la génération suivante et donne une indication de l'état d'équilibre des populations.

Une telle démarche requiert de connaître le statut des plantes intermédiaires: doit-on les considérer comme des femelles ou comme des hermaphrodites ? Sont-elles hétérozygotes pour les gènes de restauration ou bien un autre locus détermine-t-il leur état ?

F <sub>0</sub>	Fe	I	H	H
F <sub>1</sub>	Fe I H	Fe I H	Fe I H	H
	DESCENDANCES SEGREGANTES			DESCENDANCES NON SEGREGANTES

Abréviations: Fe: plante femelle, I: plante Intermédiaire, H: plante hermaphrodite, F<sub>0</sub>: génération in situ, F<sub>1</sub>: descendances en fécondation libre de la F<sub>0</sub>.

Figure 1: Types de descendances maternelles en fécondation libre dans la population de *Beta maritima*.

Tableau I: Description de la population étudiée après caractérisation génétique et moléculaire des phénotypes sexuels.

	plantes ségrégeantes			plantes non ségrégeantes
	Fe	I	H	H
cytotype	S	S	S	S ou N
gènes de restauration	-	+	+	?
pourcentages (n = 66)	62	8	8	22

Abréviations: Fe: plante femelle, I: intermédiaire, H: hermaphrodite, S: cytoplasme stérile, N: cytoplasme normal, - ou +: absence ou présence de gènes de restauration, ?: gènes de restauration non détectables, n: nombre d'individus étudiés

**Remerciements.** Ce travail a été supporté par une ATP "Biologie des Populations" n° 09 84 93 du CNRS attribuée à Ph. Vernet et R. Jean. Le premier auteur a reçu une allocation de recherche par le ministère de l'Industrie et de la Recherche. Nous remercions R. Maerten, M. Maetie, B. Plancq et F. Petit pour l'aide qu'ils nous ont apportée. Nos remerciements vont également à M. Acheroy, A. Ducouso, D. Petit et M. Valero pour leurs participations aux expériences sur le terrain et aux discussions sur ce travail.

## Références

- Barocka K.H., 1985. Zucker-und Futterrüben. In: W. Hoffman, A. Mudra, W. Plarre (eds), Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, vol. 2 spezieller Teil, pp. 245-287.
- Boutin V., Pannenbecker G., Ecke W., Schewe G., Saumitou-Laprade P., Jean R., Vernet Ph., Michaelis G., Cytoplasmic male sterility and nuclear restorer genes in a natural population of *Beta maritima*: genetical and molecular aspects. En préparation.

- Couvet D., Gouyon P.H., Kjellberg F., Valdeyron G., 1985. La différenciation nucléo-cytoplasmique entre populations: une cause de l'existence de mâles-stériles dans la population de thym. C. R. Acad. Sci. 300, 665-668.
- Delannay X., Gouyon P.H., Valdeyron G., 1981. Mathematical study of the evolution of gynodioecy with cytoplasmic inheritance under the effect of a nuclear restorer gene. *Genetics*, 99, 169-181.
- Domme B., Guillermin J.L., Valdeyron G., 1983. Régime de la reproduction et hétérozygotie des populations de thym, *Thymus vulgaris* L., dans une succession postculturale. C.R. Acad. Sci. 296, 111-114.
- Domme B., Jacquard P., 1985. Gynodioecy in thyme, *Thymus vulgaris* L.: evidence from successional populations. In P. Jacquard, G. Heim, J. Antonovics (eds), *Genetic differentiation and dispersal in plants*. Springer Verlag, Berlin, pp. 141-164.
- Gouyon P.H., Lumaret R., Valdeyron G., Vernet Ph., 1983. Reproductive strategies and disturbance by man. In Mooney H., Godron M. (eds). *Disturbance and Ecosystems*. Springer, Berlin, (Ecological studies 44) pp. 213-224.
- Khey-Pour A., 1976. Nucleo-cytoplasmic polymorphism for male sterility in *Origanum vulgare* L. *J. Heredity* 71, 253-260.
- Lewis D., 1941. Male sterility in natural populations of hermaphrodite plants. *New Phytol.*, 40, 56-63.
- Maynard-Smith J., 1978. *The evolution of sex*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Mikami T., Kishima Y., Sugiura M., Kinoshita T., 1985. Organelle genome diversity in sugar beet with normal and different sources of male sterile cytoplasm. *Theor. Appl. Genet.* 71: 166-171.
- Owen F.V., 1942. Male sterility in sugar beets produced by complementary effects of cytoplasmic and mendelian inheritance (Abstr.) *Am. J. Bot.* 29, 692.
- Owen F.V., 1945. Cytoplasmically inherited male sterility in sugar beets. *J. Agr. Res.* 71, 423-440.
- Powling A., 1982. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from sugar beet with normal and male sterile cytoplasm. *Heredity* 49, 117-120.
- Powling A. and Ellis T.H.N., 1983. Studies on the organelle genomes of sugar beet with male fertile and male sterile cytoplasm. *Theor. Appl. Genet.* 65, 323-328.
- Van Damme J.J.M., 1984. Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. III Sexual reproduction and maintenance of male-steriles. *Heredity* 52, 77-93.

Véronique BOUTIN, Pierre SAUMITOU-LAPRADE,  
Raymond JEAN et Philippe VERNET  
Université des Sciences et Techniques de Lille, Flandres, Artois  
Laboratoire de Génétique Ecologique et de Biologie des populations  
59655 VILLENEUVE D'ASCQ Cedex

## Cytoplasmic male sterility and nuclear restorer genes in a natural population of *Beta maritima*: genetical and molecular aspects

V. Boutin<sup>1</sup>, G. Pannenbecker<sup>2</sup>, W. Ecke<sup>2</sup>, G. Schewe<sup>2</sup>, P. Saumitou-Laprade<sup>1</sup>, R. Jean<sup>1</sup>, Ph. Vernet<sup>1</sup> and G. Michaelis<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Génétique Ecologique et Biologie des Populations Végétales, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

<sup>2</sup> Botanisches Institut der Universität Düsseldorf, Universitätsstrasse 1, D-4000 Düsseldorf 1, Federal Republic of Germany

Received June 16, 1986; Accepted November 22, 1986

Communicated by G. Wenzel

**Summary.** One natural population ( $F_0$  generation) of *Beta maritima* situated on the French Atlantic coast has been analysed. It was composed of 62% female, 30% hermaphrodite and 8% intermediate plants. The analysis of half-sib progeny ( $F_1$  generation) obtained from in situ open pollination demonstrates the cytoplasmic determination of male sterility in *Beta maritima* and the restoration of fertility by nuclear genes. The mitochondrial DNA (mtDNA) and the chloroplast DNA (ctDNA) of sixteen  $F_1$  plants, extracted from offspring of the three sexual phenotypes, were analysed using the restriction enzymes *Sal* I and *Bam* HI, respectively. Two cytoplasmic lines with their own peculiar genetic characteristics were distinguished using the restriction enzyme patterns of mtDNA: (i) the S cytoplasmic line was found in segregating progeny of two  $F_0$  plants; all three phenotypes were produced (that is, progeny including hermaphrodite, female and intermediate plants); (ii) the N cytoplasmic line was found in the progeny of one  $F_0$  hermaphrodite plant; this produced only hermaphrodites. Thus, segregating and non-segregating hermaphrodite  $F_0$  plants can be distinguished. The nuclear genes maintaining sterility or restoring fertility are expressed in line S. At the same time the analysis of *Beta vulgaris* material has been carried out at the molecular level: N cytoplasmic lines of *B. vulgaris* and *B. maritima* differed only by 3 fragments of mtDNA; but the S cytoplasmic line of *B. maritima* was very different from Owen's cytoplasmic male sterile line of *B. vulgaris*. No variation in the ctDNA pattern was detected within and between the two taxa.

**Key words:** Wild and cultivated sugar beet (*Beta maritima*, *Beta vulgaris*) – Cytoplasmic male sterility, nuclear restorer genes – Mitochondrial and chloroplast DNAs – Restriction endonuclease fragment analysis

### Introduction

The analysis of male sterility in the genus *Beta* began with the very well known and classical work of Owen (1942, 1945) who focused attention on cultivated varieties of *Beta vulgaris*.

Owen (1942, 1945) demonstrated that male sterility in *B. vulgaris* is based on two components: one cytoplasmic, the other nuclear. Specific nuclear restorer genes restore male fertility in S (male-sterile) cytoplasm. A plant with S cytoplasm is female if at least two nuclear restorers are present in the recessive homozygote state, but hermaphrodite if these genes possess the alternative dominant form. An intermediate sexual phenotype is produced when only one restorer gene occurs in the homozygous recessive state. These nuclear genes are also found in normal cytoplasm, which Owen called the N line. Plants with N cytoplasm are always hermaphrodite irrespective of the nuclear restorer alleles they contain. Among these plants two types are especially useful in selection breeding programs: (i) the maintainer of sterility, which is characterized by the presence of recessive homozygote restorer alleles and which permits the reproduction of female (= male sterile) plants by sexual means; (ii) the restorer of fertility: this type of plant possesses the nuclear restorer genes in the dominant allelic form and in the homozygote state; on crossing with any female plant with S cytoplasm, non-segregating progeny comprised of only hermaphrodite plants are produced. Further work has confirmed the nuclear and cytoplasmic factors of this male sterility but varying results concerning the number of nuclear loci have been reported. Two or three loci of restorer genes have been proposed by some authors (Oldemeyer 1957; Hogaboam 1957; Nagao and Kinochita 1962; Bliss and Gabelman 1965; Bolz 1968) while others have presented evidence for a polygenic determination (Rohrbach 1965; Knapp 1969; Bosemark 1972).

In order to improve the biological understanding of male sterility in *Beta vulgaris*, we began a study of natural populations of the ancestral form, *Beta maritima*. First, populations of *B. maritima* along the Atlantic coast of France were surveyed for the occurrence of female plants. Females were found to comprise 5% of the population in Mont-Saint-Michel Bay (Varinard unpubl.) and were found in even greater frequency in the Canche Estuary at the southern end of the English Channel. The presence of females in these numbers has to be explained and cannot be

considered as an adaptation promoting outcrossing since *B. maritima* is self-incompatible. However, the population-genetic model proposed by Gouyon (Gouyon et al. 1983; Couvet et al. 1985; Gouyon and Couvet 1985) explains the occurrence of female plants by interaction between nuclear and cytoplasmic genes. It also explains the presence of several cytoplasmic sterility and nuclear restorer genes within a single population (Khey-Pour 1976, in *Origanum vulgare*; Van Damme 1984, in *Plantago lanceolata*; Dommée et al. 1983; Dommée and Jacquard 1985, in *Thymus vulgaris*).

In addition to these genetic studies, molecular analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) was undertaken in the genus *Beta* because some work in other taxa had shown an association between mtDNA and male sterility. Powling (1981) first reported the existence of short circular DNA molecules in *Beta vulgaris* mitochondria. Then, with Owen's material and using restriction enzymes, he demonstrated that mtDNA from sterile cytoplasm differed from normal mtDNA (Powling 1982). The same author tested the 'US1' variety and found an exact concordance between the digestion patterns of mtDNA and the sexual phenotypes (Powling and Ellis 1983). Moreover, he observed no variation between the chloroplast DNA (ctDNA) of the S and of the N lines. Kinoshita's team (Mikami et al. 1985) extended the molecular analysis to wild beets from Oldemeyer's collection (USDA) without knowing the precise origins and genetic composition of the wild populations from which they were taken. The same authors distinguished four mtDNA groups within the S cytoplasm, one of them being identical to the mtDNA of Owen's strain of *Beta vulgaris*. Finally, they also found a variability of the chloroplast genome among S plants.

This work represents a joint genetic and molecular analysis of one *Beta maritima* population and of the plants obtained from it. *Beta vulgaris* material is included for comparison. The genetic part of the study was carried out at Lille University (France), and the molecular genetic part at Düsseldorf University (FRG). The cytoplasmic and nuclear factors determining the observed male sterility in *Beta maritima* are characterized. The mitochondrial genome of sterile plants is demonstrated to be different from that of *Beta vulgaris*.

## Materials and methods

### *The population and its offspring*

The *B. maritima* population forming the F<sub>0</sub> generation is situated in the Canche estuary near the town of Etaples, South of Boulogne-sur-Mer (France). It was composed of about 60 plants that covered an area approximately 40 m long and 10 m wide. The plants belonged to one of the three sexual phenotypes defined at anthesis by the characters of anthers and pollen: 1. hermaphrodite plants (H), with yellow stamens containing viable and functional pollen; 2. intermediate plants (I), with more or less dehiscent anthers containing little pollen, a part of which was empty; plants of this class were heterogeneous because of large variations in viable pollen; 3. female plants (Fe), with white stamens lacking pollen.

Pollen was analysed in June 1984 in situ using a binocular microscope. Ten plants were examined again in June 1985 and thus the stability of sexual phenotypes was established over two years.

Fruits were harvested between 10–20 August 1984. Their seeds were sown in February 1985, and seedlings were individually planted in small pots in the experimental garden of the University of Lille, and these formed the F<sub>1</sub> generation. Plants obtained from 1 F<sub>0</sub> plant represent a half-sib family whose size varied from 4 to 80 F<sub>1</sub> plants. In the different families not all plants reached the flowering state, and several families with fewer than 10 plants were not taken into account. Thus, 926 F<sub>1</sub> plants, shared between 41 families, were available for the genetic analysis.

### *Plant material used for biochemical analysis*

*Beta maritima*. 16 F<sub>1</sub> plants from the Canche estuary, 1 hermaphrodite plant from the botanical garden of Düsseldorf University. Its natural origin is not known.

*Beta vulgaris*. Clone no. 0049Y1, cytoplasmic male fertile, clone no. 0052A1, cytoplasmic male sterile; both clones were kindly provided by Kleinwanzlebener Saatzucht AG, Einbeck (FRG).

The sexual phenotypes and the provenance of the 16 plants originating from the Canche population were as follows:

6 hermaphrodite plants were taken among the 57 F<sub>1</sub> plants of the B21 family composed only of hermaphrodite plants; the B21 mother plant belonged to the "non-segregating hermaphrodite" type; material from the six plants was pooled for the DNA preparation; 3 hermaphrodite and 2 intermediate plants were taken from 20 F<sub>1</sub> plants of the B62 family; this family is composed of 5 hermaphrodite, 13 intermediate and 2 female plants; the B62 mother plant belonged to the "segregating hermaphrodite" type; 5 intermediate plants were taken from 63 F<sub>1</sub> plants originating from the female B9; this family is composed of 4 hermaphrodite, 31 intermediate and 28 female plants.

### *DNA analysis*

a) *Isolation of mitochondrial DNA*. Mitochondrial DNA was isolated from 400 g of leaves and shoots from *Beta maritima* or from about 800 g of taproot tissue from *Beta vulgaris*, according to the method of Boutry and Briquet (1982) with the following modification: a sucrose cushion (0.6 M sucrose, 0.01 M TES, 0.02 M EDTA, pH 7.2), instead of a discontinuous sucrose gradient, was used as the last step in the purification of mitochondria. Centrifugation was performed at 9,000 rpm for 20 min in a Sorvall SS-34 rotor. One gram of mitochondria was lysed in 4 ml lysis buffer (5% SDS, 2% sarkosylate, 150 mM NaCl, 20 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) for 10 min at room temperature. After phenol extractions the DNA was precipitated by ethanol. The CsCl density gradient centrifugation was replaced by centrifugation through a discontinuous CsCl gradient, following the method of Kolodner and Tewari (1975).

b) *Isolation of chloroplast DNA*. All steps of the preparation were performed at 4°C. Leaves (20 g) were blended in 10 volumes of homogenization medium (Boutry and Briquet 1982). After filtration through one layer of gauze and two layers of miracloth the chloroplasts were pelleted in a Sorvall GSA rotor at 5,000 rpm for 5 min. They were washed twice in 200 ml of the same buffer. The chloroplast fraction was resuspended in 10 ml of homogenization medium, layered on a discontinuous sucrose gradient (15 ml 20% sucrose, 15 ml 40% sucrose in homogenization buffer) and centrifuged in a Sorvall HB-4 rotor at 5,000 rpm for 15 min. The chloroplast fraction was diluted with the same volume of TE buffer (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7.2). After centrifugation the chloroplast pellet was lysed for 1 h at 37°C with three volumes of the following medium: 2% sodium sarkosylate, 1% SDS, 0.1 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.4, supplemented with 0.1 mg/ml

proteinase K. The chloroplast DNA was purified in a discontinuous CsCl gradient according to Kolodner and Tewari (1975).

c) *Restriction and gel electrophoresis of DNA.* Restriction endonuclease digestions were carried out under conditions suggested by the suppliers. The DNA was electrophoresed on agarose slab gels buffered with 40 mM Tris-HCl, 20 mM Na-acetate, 2 mM EDTA, 18 mM NaCl, pH 8.0.

## Results

### *Description of the in situ population and of its offspring*

The Canche population contained a high proportion of females. Of 66 plants studied, 62% were females, 8% intermediates and 30% hermaphrodites. From these 66 plants, 41 half-sib progeny were analysed. Female and intermediate plants (i.e. 27/41) always generated segregating progeny (composed of two or three phenotypes). Offspring of hermaphrodites are separated into two groups: (i) segregating hermaphrodites (5 plants) which generate two or three sexual phenotypes as do the female and intermediate plants mentioned above; (ii) non-segregating hermaphrodites (9 plants) which produce only hermaphrodite plants. The problem is to understand the genetic basis of the two types of progeny. They cannot be explained by maternal inheritance because female plants should produce only females. We have therefore to distinguish between pure nuclear inheritance and interaction between nuclear and cytoplasmic factors. The molecular analysis might help us to choose between the alternatives.

### *Analysis of mitochondrial and chloroplast DNA (mtDNA and ctDNA)*

a) *Restriction patterns of mtDNA.* Mitochondrial DNA was isolated from the various lines of *Beta maritima* and *Beta vulgaris* described in Materials and methods. The *Sal I* digests of mtDNA from *Beta maritima* plants of the Canche population are compared in Fig. 1. Two types of restriction patterns can be distinguished. One type is represented by family B62 (lanes 3 and 4 of Fig. 1). This family comprises plants with different sexual phenotypes (H and I). An identical *Sal I* restriction pattern is obtained with mtDNA of the progeny from the female plant B9 (lane 1 of Fig. 1). The second type of mitochondrial DNA is found in the B21 non-segregating hermaphrodite family (lane 2 of Fig. 1; lane 4 of Fig. 2) and in the hermaphrodite *Beta maritima* from the botanical garden of the University of Düsseldorf (lane 3 of Fig. 2).

As described already in the literature, hermaphrodite and female plants of *Beta vulgaris* possess different *Sal I* restriction patterns (lanes 5 and 6 of Fig. 2). These patterns differ from those of *Beta maritima*, as shown in Fig. 2. While the differences between hermaphrodite and

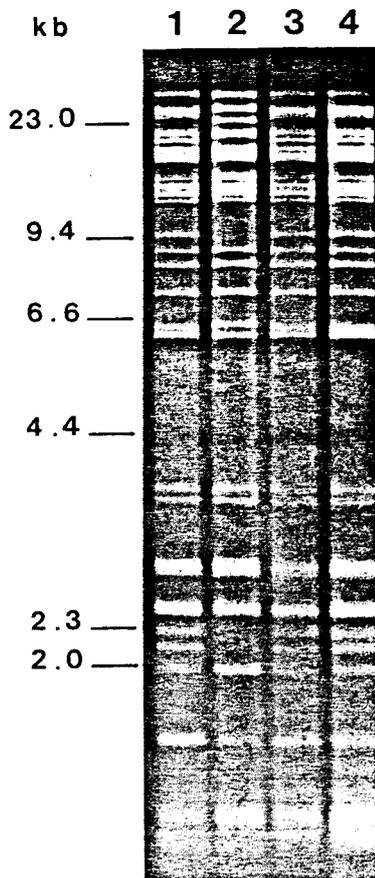


Fig. 1. *Sal I* digests of mitochondrial DNA from *Beta maritima* plants (origin: Canche population). Mitochondrial DNA from progeny of: 1 female plant (B9); intermediate offspring (mtDNA from 5 plants); 2 hermaphrodite non-segregating plant (B21); mtDNA from 6 hermaphrodite plants; 3 hermaphrodite segregating plant (B62); hermaphrodite offspring (mtDNA from 3 plants); 4 hermaphrodite segregating plant (B62); intermediate offspring (mtDNA from 2 plants)

female plants of *B. vulgaris* involve many fragments, the homologous restriction patterns of *B. maritima* show fewer variations. The hermaphrodite plants of *Beta vulgaris* (lane 5 of Fig. 2) and the hermaphrodite non-segregating plants of *Beta maritima* (lane 4 of Fig. 2) differ only by three DNA fragments.

From these data it can be concluded that the wild population of *B. maritima* contains two mitochondrial genomes: the genome of female, intermediate and hermaphrodite segregating plants and the genome of non-segregating hermaphrodite plants. These two mitochondrial genomes can be distinguished from those of *Beta vulgaris*. Thus, the male sterile cytoplasm of *Beta vulgaris* and *Beta maritima* reveal characteristic differences.

b) *Restriction pattern of ctDNA.* The variation of mitochondrial DNA contrasts with the uniform *Bam HI*

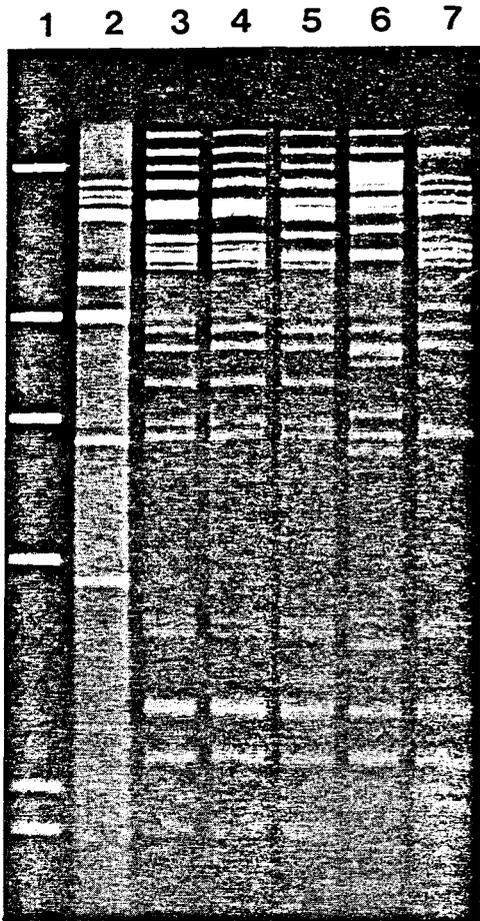


Fig. 2. *Sal* I digests of mitochondrial DNA from various *Beta maritima* (*B.m.*) and *Beta vulgaris* (*B.v.*) plants. 1 Lambda DNA digested with Hind III as marker; 2 *Sal* I digest of chloroplast DNA from *Beta maritima* (Düsseldorf) as a control; 3 *B.m.* from Düsseldorf botanical garden (origin and progeny unknown); mtDNA of one hermaphrodite plant; 4 *B.m.* from Canche population: hermaphrodite offspring (mtDNA from 6 plants) of the hermaphrodite non-segregating plant B21 (idem Fig. 1: lane 2); 5 *B.v.* from KWS cytoplasmic male fertile (=hermaphrodite clone 0049Y1; 6 *B.v.* from KWS cytoplasmic male sterile (=female) clone 0052A1; 7 *B.m.* from Canche population: intermediate offspring (mtDNA from 2 plants) of the hermaphrodite segregating plant B62 (idem Fig. 1: lane 4)

restriction pattern of ctDNA (Fig. 3). Not a single deviation could be observed when the various chloroplast DNAs of *B. maritima* and *B. vulgaris* were compared.

#### Discussion

Only one cytoplasm conferring male sterility is so far available for sugar beet breeding and cultivation (for review see Barocka 1985). Therefore, it would be interesting to obtain new male sterile material which could be used as an alternative to Owen's S line. Studying the natural variability of the ancestral form of

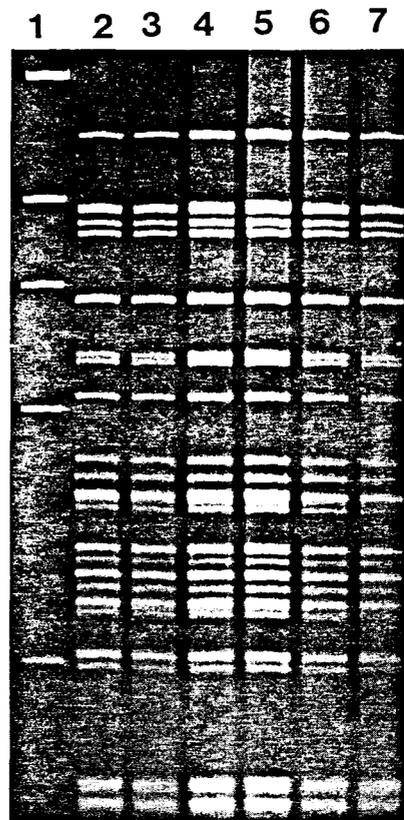


Fig. 3. *Bam* HI digests of chloroplast DNA from various *Beta maritima* (*B.m.*) and *Beta vulgaris* (*B.v.*) plants. 1 Lambda DNA digested with Hind III as marker; 2 *B.m.* from Canche population: intermediate offspring of the female plant B9; 3 *B.m.* from Canche population: intermediate offspring of the hermaphrodite segregating plant B62; 4 *B.m.* from Canche population: hermaphrodite offspring of the hermaphrodite segregating plant B62; 5 *B.m.* from Canche population: hermaphrodite offspring of the hermaphrodite non-segregating plant B21; 6 *B.v.* from KWS cytoplasmic male fertile (=hermaphrodite) clone 0049Y1; 7 *B.v.* from KWS cytoplasmic male sterile (=female) clone 0052A1

*Beta maritima* along the Atlantic coast of France, we were able to identify male sterile plants in the wild population. The genetic factors of this male sterility in *Beta maritima* can be clearly deduced from the present results. The nuclear component is demonstrated by the fact that females segregate and give hermaphrodites among their progeny. The number of nuclear restorer genes involved requires a further analysis. The existence of the cytoplasmic component was shown by mtDNA differences among maternal offspring. On one hand, the female, the segregating hermaphrodite and their progeny plants (whatever their sexual phenotype) all present the same mtDNA, while on the other hand, the non-segregating hermaphrodite plants present a clearly different mtDNA pattern. Thus, the joint genetic and molecular analysis of these three plants and their progeny allow the detection of two cytoplasmic types within the

population. These results can be extended to all plants of the population. The more abundant one, the S cytoplasm, in which the male sterility genes and their restorers are expressed, gives the population its gynodioecious character. The second one, the N cytoplasm, gives all the plants and their progeny the hermaphrodite phenotype. Thus, the population contains two types of hermaphrodites which cannot be separated by their sexual phenotypes but can be distinguished either by the sexual phenotype of their progeny or by their mtDNA pattern.

The cytoplasmic determination of male sterility combined with nuclear restorer genes appears more frequently than a pure nuclear one like that observed in particular *B. maritima* material by Kinoshita and Takahashi (1972). However, their study was based on only one family and so it is possible that the cytoplasmic component escaped the attention of the experimenters. Finally, genetic data obtained by authors on different species (Kheyr-Pour 1976; Van Damme 1984), molecular data obtained by Mikami et al. (1985) on *Beta*, and theoretical models (Gouyon and Couvet 1985) suggest that more than two cytoplasmic types differing by mtDNA and/or ctDNA could exist.

Mitochondrial and chloroplast DNAs from *Beta maritima* and cultivated *Beta vulgaris* plants were compared in our study. No variability of chloroplast DNA could be detected between the two taxa. Fertile plants of *Beta maritima* and *Beta vulgaris* gave closely similar restriction patterns of mitochondrial DNA. *Beta maritima* hermaphrodites from two different provenances present the same pattern and differed from *Beta vulgaris* mtDNA only by three bands. The interesting results of the present study of the Canche population demonstrate a novel cytoplasmic male sterility system which differs from that described by Owen.

**Acknowledgements.** We would like to thank Dr. K. H. Barocka, Kleinwanzlebener Saatzucht AG (Einbeck, FRG) and Strube-Dieckmann Saatzucht (Schöningen/Braunschweig, FRG) for advice and plant material. This work was supported by the GFP/BMFT grant Fr Zr 17/83-RP 2/83 to G. Michaelis, and a ATP "Biologie des Populations" no. 09 84 93 from CNRS to Ph. Vernet and R. Jean. The first author receives a research allocation from the "Ministere de l'Industrie et de la Recherche". We are also indebted to Alexis Ducouso, Daniel Petit and Myriam Valero for their help in the field and to the latter, for her useful comments. The manuscript has been improved by Dr. Doyle McKey (University of Miami, USA) and Professor David A. Jones (University of Hull, UK).

## References

- Barocka KH (1985) Zucker- und Futterrüben. In: Hoffman W, Mudra A, Plarre W (eds) Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen, vol 2, Spezieller Teil. Parey, Berlin Hamburg, pp. 245–287
- Bliss FA, Gabelman WH (1965) Inheritance of male sterility in beets. *Beta vulgaris* L. *Crop Sci* 5:403–406
- Bolz G (1968) Monohybride Vererbung der plasmatisch-genetisch bedingten Pollensterilität bei *Beta vulgaris* L. *Z Pflanzenzücht* 60:219–234
- Bosemark NO (1972) Studies of cytoplasm male sterility in sugar beet. *J Inst Sugar Beet Res* 6:232–251
- Boutry M, Briquet M (1982) Mitochondrial modifications associated with cytoplasmic male sterility in faba beans. *Eur J Biochem* 127:129–135
- Couvet D, Gouyon PH, Kjellberg F, Valdeyron G (1985) La différenciation nucléocytoplasmique entre populations: une cause de l'existence de male-stériles dans la population de Thym. *C R Acad Sci Paris* 300:665–668
- Dommée B, Guillermin JL, Valdeyron G (1983) Régime de reproduction et hétérozygotie des populations de Thym, *Thymus vulgaris* L., dans une succession postculturale. *C R Acad Sci Paris* 296:111–114
- Dommée B, Jacquard P (1985) Gynodioecy in thyme, *Thymus vulgaris* L.: evidence from successional populations. In: Jacquard P, Heim G, Antonovics J (eds) Genetic differentiation and dispersal in plants. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, pp 141–164
- Gouyon PH, Couvet D (1985) Selfish cytoplasm and adaptation: variations in the reproductive system of thyme. In: Haeck J, Woldenharp JW (eds) Structure and functioning of plant populations. North-Holland, Amsterdam Oxford New York, pp 299–319
- Gouyon PH, Lumaret R, Valdeyron G, Vernet Ph (1983) Reproductive strategies and disturbance by man. In: Mooney H, Godron M (eds) Disturbance and ecosystems. Ecological studies, vol 44. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, pp 213–224
- Hogaboam GJ (1957) Factors influencing phenotype expression of cytoplasmic male sterility in the sugar beet. *J Am Soc Sugar Beet Technol* 9:457–465
- Kheyr-Pour A (1976) Nucleocytoplasmic polymorphism for male sterility in *Origanum vulgare* L. *J Hered* 71:253–260
- Kinoshita T, Takahashi M (1972) Genic male sterility found in *Beta maritima*. *Jpn J Breed* 22:11–19
- Knapp E (1969) Zur Genetik der plasmatisch kontrollierten Pollensterilität der Zuckerrübe. *IIRB* 4:145–159
- Kolodner R, Tewari KK (1975) The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants. *Biochim Biophys Acta* 402:372–390
- Mikami T, Kishima Y, Sugiura M, Kinoshita T (1985) Organelle genome diversity in sugar beet with normal and different sources of male sterile cytoplasm. *Theor Appl Genet* 71:166–171
- Nagao S, Kinoshita T (1962) Causal genes and character expression of male sterility in beets. *J Fac Agric Hokkaido Univ* 52:51–69
- Oldmeyer RK (1957) Sugar beet male sterility. *J Am Soc Sugar Beet Technol* 9:381–386
- Owen FV (1942) Male sterility in sugar beets produced by complementary effects of cytoplasmic and mendelian inheritance. *Am J Bot* (abstr) 29:692
- Owen FV (1945) Cytoplasmically inherited male sterility in sugar beets. *J Agric Res* 71:423–440
- Powling A (1981) Species of small DNA molecules found in mitochondria from sugar beet with normal and male sterile cytoplasm. *Mol Gen Genet* 183:82–84
- Powling A (1982) Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from sugar beet with normal and male sterile cytoplasm. *Heredity* 49:117–120
- Powling A, Ellis THN (1983) Studies on the organelle genomes of sugar beet with male fertile and male sterile cytoplasm. *Theor Appl Genet* 65:323–328
- Rohrbach U (1965) Beiträge zum Problem der Pollensterilität bei *Beta vulgaris* L. 2. Untersuchungen über die Wirkung der Herkunft auf den Phänotyp des Merkmals „Pollensterilität“. *Z Pflanzenzücht* 54:23–45
- Van Damme JMM (1984) Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. 3. Sexual reproduction and maintenance of male steriles. *Heredity* 52:77–93

PROGRAMME FOR LONG TERM FELLOWSHIP APPLICATION  
to the Commission of the European Communities

Title : IDENTIFICATION OF MITOCHONDRIAL GENES INVOLVED IN TWO  
DIFFERENT CMS SYSTEMS OF BETA.

INTRODUCTION.

The topic of the thesis work that I shall present in December 1988 at Lille University, concerns the genetics of male sterility in Beta and the discovery of a new cytoplasmic male sterility system in natural populations of wild beet situated at the french atlantic coast.

The programme of the post-doctoral stage that I hope to carry out is in the continuation of my thesis in the sense that the material studied genetically in the laboratory of Ph. VERNET (University of Lille) should be analyzed at the molecular level in more detail. This material is unique and could be of interest for studies on pollen development and specially for sugarbeet breeding programmes.

I° RESULTS OF MY THESIS.

1° Cytoplasmic variation within natural populations of Beta maritima from the french atlantic coast.

a) Polymorphism related to pollen sterility.

Three different sexual phenotypes have been observed and characterized in some populations of Beta maritima (BOUTIN et al 1987): female plants (Fe) with white stamens lacking pollen, intermediate plants (IFe) with more or less dehiscent anthers containing few viable pollen grains, and hermaphrodite plants (H) with yellow dehiscent stamens containing viable and functional pollen.

The genetic analysis has permitted characterization of two classes of plants with different inheritance patterns: segregating plants producing Fe, IFe and H plants in their progeny and non-segregating fertile plants giving a uniform hermaphrodite progeny.

The maternal inheritance of the segregating/non-segregating characteristics has been demonstrated to be associated with restriction pattern of mitochondrial DNA: all segregating plants (families) studied, exhibit the same restriction pattern (called S), whereas all non-segregating plants (families) exhibit a strong different pattern (called N); up to now, over 60 families were studied and no exception was found.

b) Polymorphism caused by a linear plasmid like molecule.

A linear plasmid of 10.4 Kb has been observed in mitochondrial preparations of some Beta maritima plants.

Plants with plasmid (+) and without plasmid (-) were detected within one population. This plasmid is independant from male sterility, indeed the four possible combinations have been found: N(+), N(-), S(+) and S(-).

c) Small variations of mitochondrial and plastid DNA.

Two additional polymorphisms appeared:

-Comparison of mitochondrial DNA restricted with SmaI revealed small but unambiguous differences between N(+) and N(-). These differences are not due to the plasmid DNA itself.

- the Hind III restriction pattern of chloroplast DNA has revealed differences between N and S and between S(+) and S(-) plants.

Thus four different mitochondrial and three different chloroplastic cytotypes were observed in one population. This high variability at the intrapopulation level was unexpected.

2° Comparison of the CMS systems of Beta maritima (wild beet) and Beta vulgaris (sugar beet).

When Beta maritima females are crossed with different Beta vulgaris maintainers of sterility (Owen Type) a high proportion of hermaphrodites is observed in the progeny. Thus the Beta vulgaris maintainers are not able to maintain the sterility of Beta maritima. From additional crosses we conclude that the Beta vulgaris restorer does not act on the Beta maritima sterility.

The molecular analysis revealed strong differences at the ctDNA and mtDNA levels between wild and cultivated pollen sterile plants and between wild N and the cultivated fertile O Type.

Thus our investigations demonstrate a new source of nucleo-cytoplasmic male sterility in Beta maritima which differs by the nuclear and cytoplasmic components from the CMS form used actually in sugar beet breeding programmes.

## II° RESEARCH PROPOSAL FOR MY POST-DOCTORAL WORK.

The molecular basis of cytoplasmic male sterility is unknown in Beta. The central theme of the proposed programme is the identification of mitochondrial genes involved in this trait. The material from the french atlantic coast represents an unique source which should be compared to the Beta vulgaris CMS system used in sugarbeet breeding. It is likely that additional male sterile plants will be available from the french atlantic coast and laboratories in Europe and Japan. Many different genetically determined sources would be desirable in order to dissect the process of pollen development.

### A° MATERIAL

The following material will be used:

#### Beta vulgaris:

1. Male sterile CMS plants; S vulg. cytotype.
2. Fertile plants with S-cytoplasm; that is S vulg. cytotype restored for male fertility by nuclear restorer genes.
3. Fertile O-Type plant with N-cytoplasm; these plants lack nuclear restorer genes and are used for the maintenance of male sterility.

Couples of S and N cytotypes will be chosen which we consider to contain the most isogenic nuclear information.

4. One cytoplasmic male sterile plant, derived by spontaneous mutation from a fertile O-type plant of the N-cytoplasm. It should be noted that this plant is completely isogenic to the fertile O-type except for the mitochondrial mutation responsible for male sterility.

#### Beta maritima

5. Male sterile plants and male fertile plants giving segregating progenies; S mar. cytotype.
6. Fertile plants giving non-segregating progenies; N. mar. cytotype.

### B° RESEARCH PROGRAMME

From studies on maize (DEWEY et al 1986 ; LONSDALE 1987) petunia (YOUNG and HANSON 1987), sorghum (BAILEY-SERRES et al 1986) and sunflower (SICULELLA and PALMER 1988) we know that in these cases CMS is correlated with fusions of different mitochondrial DNA sequences. Such intragenomic rearrangements mediated by recombination (PALMER and SHIELDS 1984; LONSDALE et al 1984, BONEN et al 1984) create new reading frames producing novel or altered RNA and translation products. In my proposed research on Beta the molecular alterations have to be identified

by a comparison at the protein, RNA and DNA level .

### 1. Comparison of mitochondrial translation products.

Mitochondrial translation products can be visualised by an organelle in vitro system. This experimental approach poses some problems in Beta because bacteria living inside the plants are usually copurified with mitochondria. To avoid this contamination problem we have transferred our Beta maritima material into sterile tissue culture.

### 2. Mitochondrial transcripts.

My main experimental work will include the isolation of mitochondrial RNA from sterile and fertile forms of Beta maritima and Beta vulgaris. In order to detect transcript differences the RNA should be analysed by northern blot hybridization. In higher plants so far about 10 mitochondrial structural genes for proteins (CO I, CO II, CO III, cyt b, ATP A, ATP 6, ATP 9, rps 13, ND 1, ND 5) are known and could be used as heterologous probes. Probes for ribosomal RNA and if possible tRNAs should be included. Because of the large size of plant mitochondrial DNA (400 Kb for sugarbeet; POWLING 1982) we cannot be sure that the functional difference will be detected with these probes. Therefore a complete gene bank of Beta mitochondrial DNA should be included in the RNA-DNA hybridization. I'm convinced that transcript differences will be detected by this approach in the Beta maritima and in the Beta vulgaris CMS system. In the following step it should be not difficult to localize such alterations to segments of mtDNA.

### 3. Mitochondrial DNA.

For the transcript studies we will clone mitochondrial DNA from fertile sugarbeets in the EMBL 4 vector. The size of the insert is about 10 to 15 Kb. Another possibility is the cloning in a cosmid system. The respective inserts have a large size (50 Kb) and could be more easily arranged into a complete genetic map. The clones to which transcript differences are associated should reveal restriction site polymorphism. They have to be analysed in more detail by standard techniques as subcloning, S1 mapping and DNA sequencing.

## REFERENCES

- BAILEY-SERRES J., DIXON L.K., LIDDELL A.D. and LEAVER C.J., 1986. Nuclear-mitochondrial interactions in cytoplasmic male-sterile Sorghum. *Theor. Appl. Genet.* 73: 252-260.
- BONEN L., BOER P.H. and GRAY M. W., 1984. The wheat cytochrome oxidase subunit II gene has an intron insert and three radical amino acid changes relative to maize. *EMBO J.* 3: 2531-2536.
- BOUTIN V., PANNENBECKER G., ECKE W., SCHEWE G., SAUMITOU-LAPRADE P., JEAN R., VERNET PH., MICHAELIS G., 1987. Cytoplasmic male sterility and nuclear restorer genes in a natural population of Beta maritima and molecular aspects. *Theor. Appl. Genet.* 73: 625-629.
- DEWEY R.E., LEVINGS C.S.III and TIMOTHY D.H., 1986. Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm. *Cell.* 44: 439-449.
- LONSDALE M.D., 1987. Cytoplasmic male sterility: a molecular perspective. *Plants Physiol. Biochem.* 25: 265-271.
- LONSDALE M.D., HODGE T.P. and FOURON C.M.R., 1984. The physical map and organization of the mitochondrial genome from the fertile cytoplasm of maize. *Nucl. Acids Res.* 12: 9249-9261.
- PALMER J.D. and SHIELDS C.R., 1984. Tripartite structure of the Brassica campestris mitochondrial genome. *Nature* 307: 437-440.
- POWLING A., 1982. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from sugar-beet with normal and male sterile cytoplasms. *Heredity* 49: 117-120.
- SICULELLA L. and PALMER J.D., 1988. Physical and gene organization of mitochondrial DNA in fertile and male sterile sunflower. CMS-associated alterations in structure and transcription of the *atpA* gene. *Nucl. Acids Res.* 16: 3787-3799.
- YOUNG E.G. and HANSON M.R., 1987. A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. *Cell* 50: 41-49.

## CHOICE OF HOST LABORATORY

The Botanical Institut of the University of Düsseldorf FRG is well known for research on organelle genetics. I have chosen the laboratory of Prof G. MICHAELIS because we have a strong interest in the same problem of pollen sterility in Beta. I know the laboratory from several short visits; it is well equipped and the members are familiar with the techniques to isolate and analyze mitochondrial DNA and RNA, with cloning, gene banks, hybridization and DNA sequencing. The group has a nice cooperation with several breeding companies and thus access to classical genetic programmes and special mutant lines.

Two other groups of the Botanical Institute are specialized in chloroplast research: Prof P.WESTHOFF (molecular biology) and Prof W. STUBBE (plastome inheritance). Interestingly, Prof W. STUBBE is analyzing a pollen defect occurring in a special genome-plastome combination of Oenothera. Finally, the proximity of the Max-Planck-Institute and the Genetic Institute of Cologne should be mentioned.

