

Diminuer la durée de création

Les coûts élevés de la recherche, les contraintes agronomiques des agriculteurs, les attentes des industriels et des consommateurs conduisent les sélectionneurs à diminuer constamment la durée de la création variétale. Dans ce chapitre, ce sont principalement les techniques d'haplodiploïdisation et de culture d'embryons immatures qui sont mises en avant. Mais toutes les techniques de biologie qui permettent de mieux connaître le génome et de transférer rapidement des gènes d'intérêt aboutissent également à des gains de temps essentiels

1. L'HAPLODIPLOÏDISATION

1.1. La fixation plus rapide du matériel génétique

1.2. Le principe de l'haplodiploïdisation

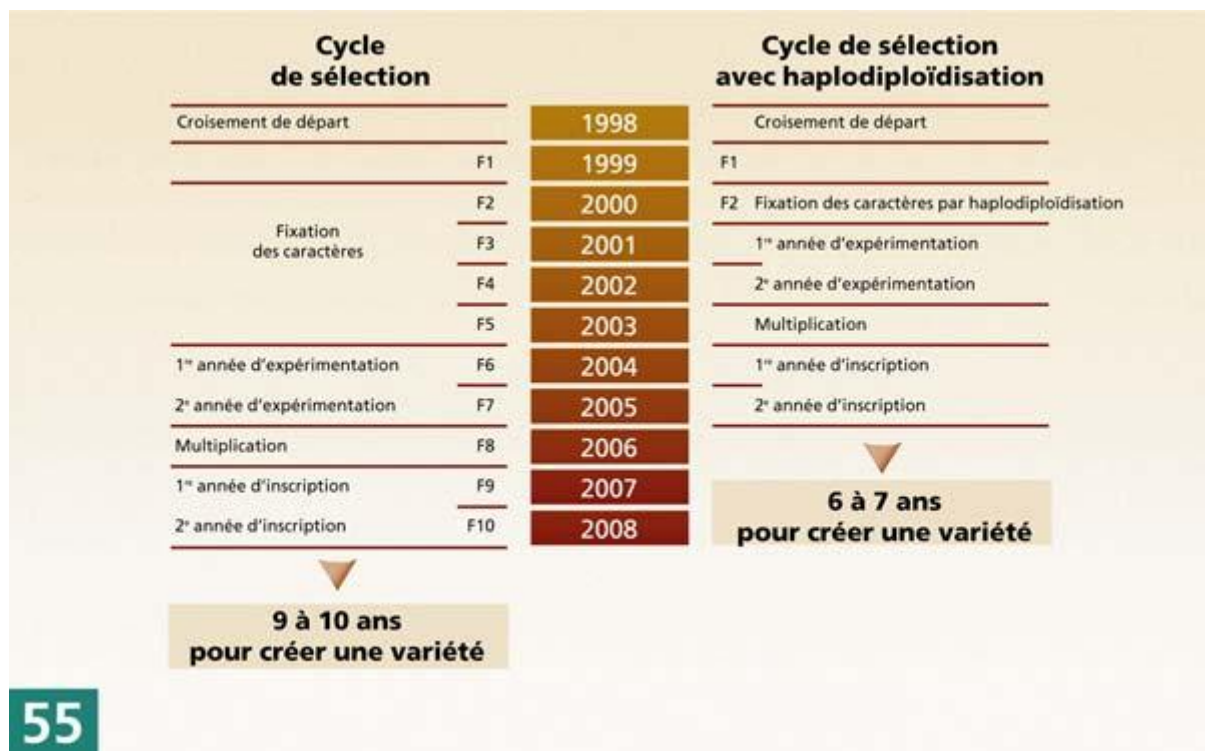
1.3. L'obtention d'haploïdes à partir des organes mâles

1.4. L'obtention d'haploïdes à partir des organes femelles

2. LA CULTURE D'EMBRYONS IMMATURES

1. L'HAPLODIPLOÏDISATION

1.1. La fixation plus rapide du matériel génétique



1.1.1. Obtention de lignées fixées en une seule génération

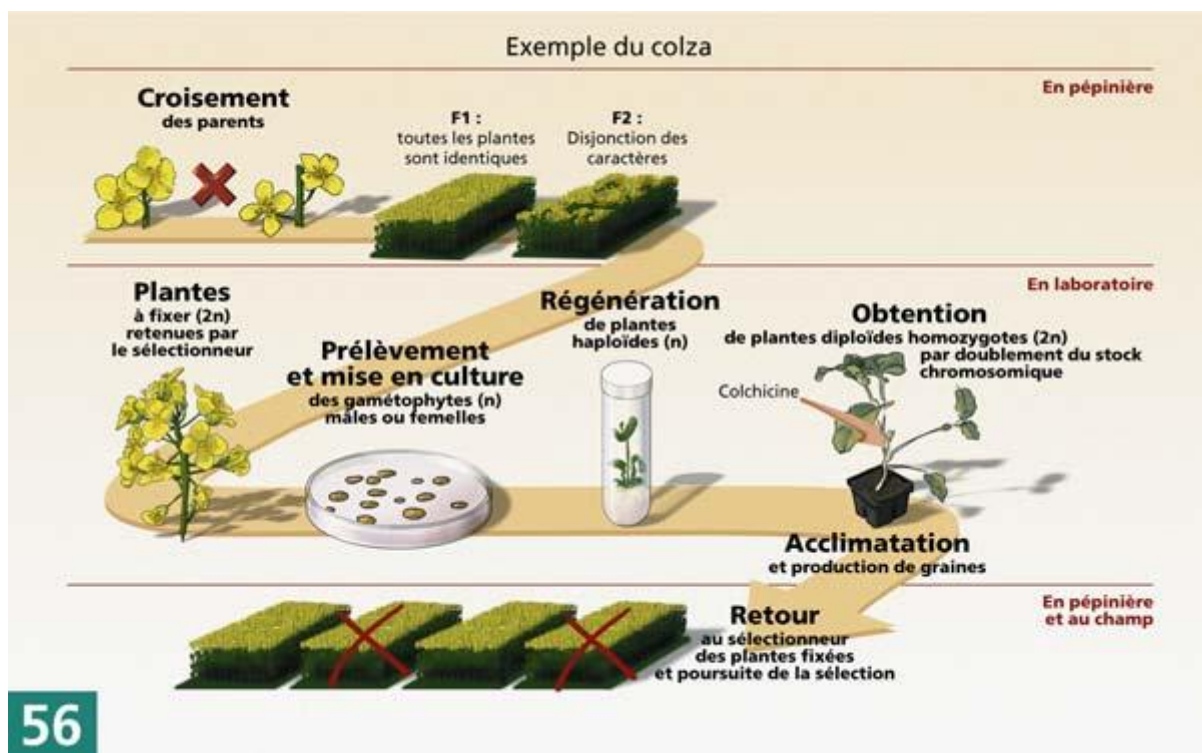
L'haplodiploïdisation est une méthode utilisée pour fixer plus rapidement le matériel génétique en cours de sélection. Elle repose sur l'obtention de plantes haploïdes (n) à partir des organes mâles ou femelles puis sur le doublement du stock chromosomique. Ainsi le sélectionneur va disposer de plantes diploïdes ($2n$) homozygotes où l'ensemble du génome est fixé. C'est donc une technique rapide de production de lignées pures en une seule étape au lieu de 7 à 8 générations. Avec cette méthode, la durée d'un cycle de sélection est raccourcie de 3 à 4 ans. Cette technique présente en plus l'avantage de faciliter la sélection. En effet, le sélectionneur pourra faire un choix plus large, car l'haplodiploïdisation fixe les différentes recombinaisons possibles entre les caractéristiques des lignées parentales, et il pourra également faire un choix plus sûr car il possède un matériel homogène. Il y a donc séparation des deux phases de la création variétale : la fixation des caractères d'une part et la sélection des meilleures plantes d'autre part.

De plus, cette méthode permet d'observer l'expression aussi bien des gènes récessifs que des gènes dominants. Ceci est particulièrement intéressant en sélection.

1.1.2. Applications

Cette technique est largement utilisée chez l'asperge, le blé, le colza, l'orge, l'aubergine et le piment. La variété Florin est le premier blé français issu d'haplodiploïdisation inscrit en 1985, 7 ans après le croisement de départ entre les deux parents.

1. 2. Le principe de l'haplodiploïdisation



Le processus d'haplodiploïdisation comprend l'obtention de plantes haploïdes à partir des organes porteurs des cellules reproductrices, appelés gamétophyte mâle ou femelle, et le retour vers la phase diploïde.

1.2.1. Production de plantes mères

Le sélectionneur effectue un croisement entre deux lignées parentales présentant des caractéristiques intéressantes et complémentaires. Ce croisement produira la génération F1. Ce sont les plantes mères pour l'obtention de la phase haploïde. A ce stade, toutes les plantes sont identiques. En revanche, sur ces plantes, la méiose à l'origine de la formation des gamètes permet la ségrégation des caractères, selon les lois de Mendel et les recombinaisons entre les

chromosomes parentaux. Les individus F2 seront alors tous différents les uns des autres, c'est la disjonction des caractères. Pour faciliter le travail de sélection, l'haplodiploïdisation va permettre d'obtenir des plantes homozygotes.

1.2.2. Obtention de la phase haploïde

Il s'agit de récupérer les cellules ayant subi la méiose avant la fécondation. C'est là que commence le travail de laboratoire. L'obtention des plantes haploïdes peut se faire par culture *in vitro* de cellules destinées à fournir les cellules reproductrices ou gamètes. S'il s'agit de gamètes mâles, on parle d'androgénèse. S'il s'agit de gamètes femelles, c'est la gynogénèse.

Une autre méthode d'obtention d'haploïdes est l'induction d'haploïdes *in situ*. On peut obtenir des haploïdes après croisements entre espèces ou entre genres. Il y a fécondation, mais les chromosomes incompatibles du parent pollinisateur sont rejetés naturellement. On peut également provoquer une fécondation anormale à l'aide de pollen dénaturé. Dans ces trois cas, on observe le développement d'un embryon haploïde. Une phase de sauvetage d'embryons *in vitro* est ensuite généralement nécessaire. Mis en culture sur des milieux particuliers, l'embryon haploïde va se développer, les tissus vont se différencier pour donner des plantes haploïdes.

1.2.3. Retour à l'état fertile diploïde

Pour utiliser en sélection une plante régénérée par l'une de ces voies, il faut disposer de plantes fertiles et donc diploïdes. L'état haploïde étant instable, l'individu régénéré est parfois diploïde, on parle de doublement spontané du stock chromosomique. Pour le blé, on peut compter 20 à 25 % d'haploïdes doublés spontanément, 60 à 65 % chez l'orge. Sinon, on provoque artificiellement un doublement des chromosomes, le plus couramment par l'action d'un agent chimique, la colchicine. Les plantes obtenues sont des diploïdes homozygotes : elles possèdent deux copies identiques de chacun de leurs chromosomes et donc portent des paires de gènes ou allèles identiques, d'où leur grand intérêt.

1.2.4. Sélection des lignées

Le matériel ainsi fixé est livré au sélectionneur. Le sélectionneur va alors trier les plantes en fonction des critères agronomiques et technologiques recherchés. La multiplication de ces

plantes se fera par autofécondation : tous les descendants seront des copies identiques de leurs parents.

1.2.5. En plus

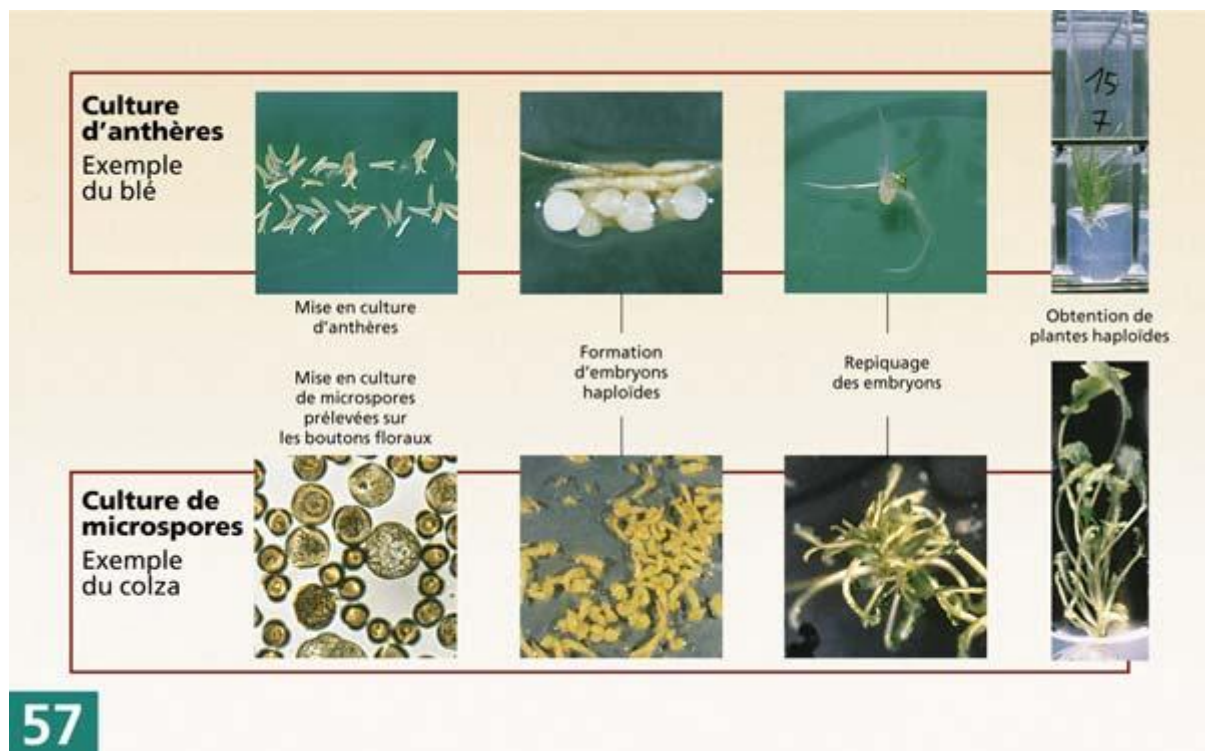
** Traitement à la colchicine :

La colchicine bloque la mitose après la duplication des chromosomes et les cellules deviennent diploïdes. Le traitement à la colchicine peut se réaliser au stade plantule par trempage des racines ou injection dans les méristèmes. Les taux de doublement sont alors très variables. Actuellement, se développent des traitements in vitro au stade embryonnaire.

** Déterminisme du niveau de ploïdie

Une vérification de la ploïdie des plantes régénérées peut être effectuée précocement par cytométrie de flux. Une substance fluorescente se liant à l'ADN permet la coloration des cellules. La mesure de la densité de cette coloration permet de déterminer le niveau de ploïdie. Sinon, la constatation de la fertilité de la plante garantit qu'elle est effectivement diploïde.

1.3. L'obtention d'haploïdes à partir des organes mâles



L'androgenèse a été la première voie d'obtention d'haploïdes in vitro. Les plantes haploïdes ont été obtenues par culture d'anthères (sacs contenant le pollen). Plus récemment, la culture de microspores (grains de pollen immatures) a été mise au point et tend à se développer.

1.3.1. Culture d'anthères

L'androgenèse est la voie d'haplodiploïdisation privilégiée chez le blé, car il est relativement facile de mettre en culture un très grand nombre d'anthères. Ainsi, cette technique a été mise en place dans les programmes de sélection du blé tendre. Les épis sont récoltés au stade montaison d'où les anthères sont extraites en conditions stériles. Elles sont mises en culture en boîte de pétri sur des milieux spécifiques, induisant le développement embryonnaire des microspores. Des examens cytologiques préalables sont nécessaires pour connaître le moment de prélèvement le plus favorable à ce développement. Les boîtes de pétri sont ensuite placées dans des chambres de culture où l'éclairage, la température et l'humidité sont contrôlés pour favoriser l'androgenèse. Quelques semaines après la mise en culture des anthères, les embryons haploïdes apparaissent. Ils sont prélevés sous loupe binoculaire et repiqués sur des milieux nutritifs permettant une différenciation des tissus et l'induction du développement de la plante. Les plantules bien développées sont à nouveau repiquées en tube. Cette voie androgénique a pu être mise au point également sur le colza, l'orge, l'asperge, le piment et l'aubergine, et son efficacité pour la sélection de ces espèces a pu être démontrée.

1.3.2. Culture de microspores

La culture d'anthères n'est pratiquement plus utilisée chez le colza, en raison du progrès apporté par la culture de microspores.

Les boutons floraux sont sélectionnés sur les inflorescences. Les grains de pollen immatures sont isolés mécaniquement par broyage des boutons, et filtration de la suspension. On induit directement la formation d'embryons par la culture des microspores en milieu liquide agité. A partir d'embryons de trois semaines, il est ensuite possible de régénérer des plantes. Les rendements en embryons sont assez élevés chez le colza de l'ordre de 80 à 200 embryons par anthère. La variété de colza d'hiver Goéland, inscrite en 1990, est issue de cette technique, également utilisée sur maïs, blé, orge, riz et tabac.

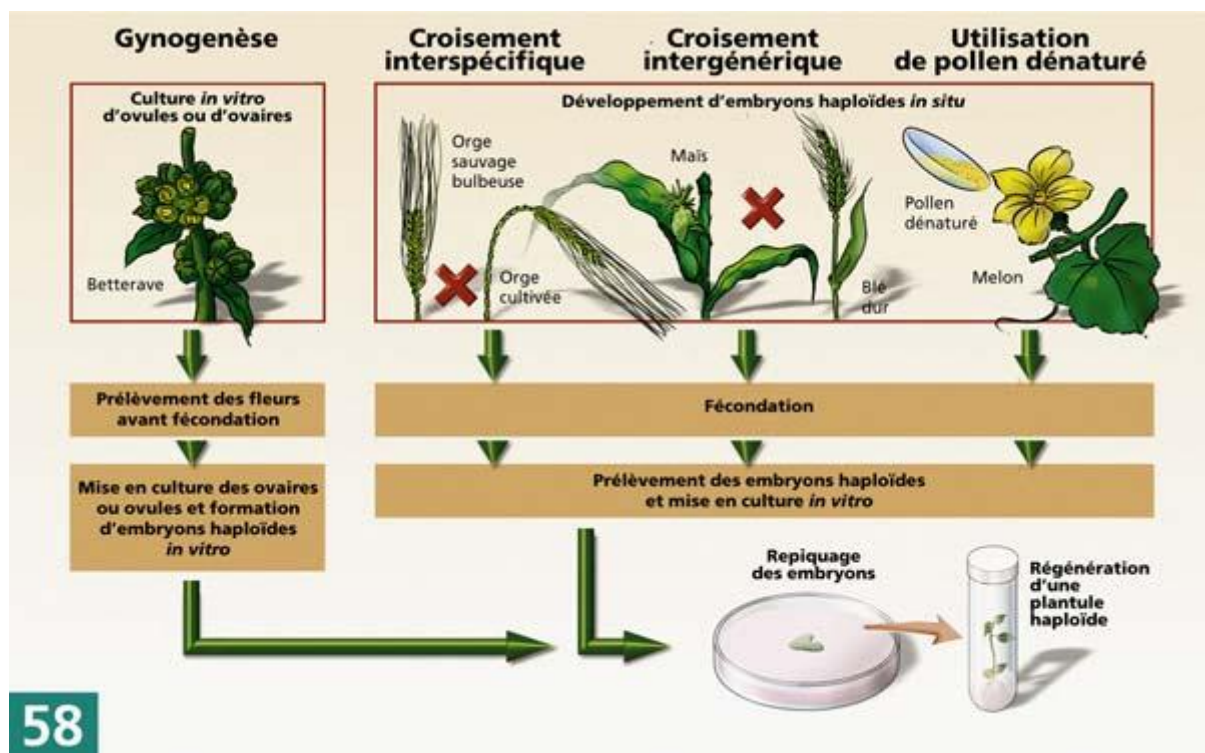
1.3.4. Application particulière à la production d'hybrides chez l'asperge

L'androgénèse a été particulièrement exploitée chez l'asperge, car elle est le seul moyen efficace pour produire des variétés hybrides mâles.

L'asperge est une espèce dioïque, c'est-à-dire qu'elle possède des pieds mâles et des pieds femelles. Les plantes mâles sont recherchées en sélection, car elles sont précoces et plus productives.

Les pieds mâles sont Mm pour les chromosomes sexuels et les femelles sont mm. La voie de l'androgénèse permet d'obtenir soit des individus MM appelés super-mâles, soit des individus mm donc femelles. Les croisements de ces super-mâles avec des femelles donnent des individus mâles. Ainsi en sélectionnant et croisant des super-mâles avec des femelles, on peut créer des variétés hybrides mâles. De plus, ceci permet d'exploiter l'hétérosis, important chez cette espèce. La variété Andréas a été la première variété inscrite en France (1995) intégrant cette technique.

1.4. L'obtention d'haploïdes à partir des organes femelles



Chez un certain nombre d'espèces, comme l'asperge, il apparaît de façon spontanée, à de faibles fréquences, des graines polyembryoniques, où l'un des embryons est parfois haploïde. Mais l'utilisation de cette source haploïde reste très peu efficace. En revanche, des résultats intéressants ont été obtenus concernant l'obtention de plantes haploïdes par l'utilisation de

différentes sources de pollen, ce dernier ayant alors le simple rôle d'induire le développement de l'embryon.

1.4.1. Haploïdie induite par croisement interspécifique

Le croisement interspécifique entre une espèce cultivée et une espèce sauvage permet parfois de produire des plantes haploïdes. En effet, après fécondation au cours des premières divisions cellulaires, les chromosomes de l'espèce sauvage sont éliminés. On obtient ainsi un embryon haploïde ne comportant que les chromosomes de l'espèce cultivée. Cette méthode s'applique à l'orge, à la pomme de terre, ainsi qu'à quelques génotypes de blé.

Le croisement interspécifique de l'orge cultivée par l'orge sauvage bulbeuse permet l'obtention d'embryons haploïdes d'orge cultivée. La culture in vitro est alors nécessaire pour permettre à cet embryon de poursuivre son développement et de donner une plante.

Une application particulière est utilisée pour la sélection de la pomme de terre. La pomme de terre cultivée est tétraploïde ($4n = 48$).

La réduction du stock chromosomique est obtenue par pollinisation de la pomme de terre cultivée par une espèce sauvage *Solanum phureja*. Ce système permet d'obtenir des plantes diploïdes. Ces plantes peuvent être alors facilement croisées par des espèces sauvages, fréquemment diploïdes, ce qui permet de restaurer la tétraploïdie. Cette méthode est utilisée pour apporter de nouveaux caractères chez la pomme de terre cultivée.

1.4.2. Haploïdie induite par croisement intergénérique

Plus récemment, les croisements entre genres ont été étudiés. Les croisements de blé dur par du maïs offrent la possibilité de produire des plantes haploïdes chez le blé dur, espèce récalcitrante aux techniques de culture d'anthers.

1.4.3. Haploïdie induite par l'utilisation de pollen dénaturé

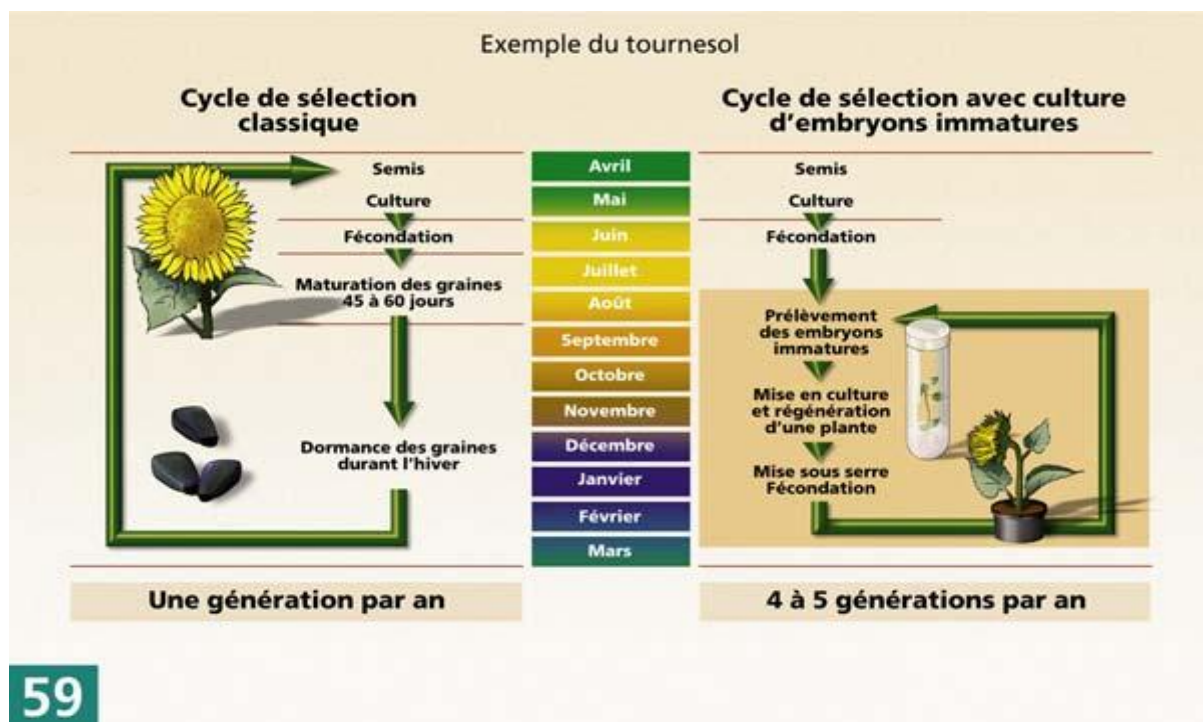
L'induction d'haploïdes est également possible par pollinisation avec du pollen dénaturé par irradiation. Cette technique s'est révélée utile pour tout un ensemble d'espèces légumières et est utilisée couramment chez le melon. L'étape de culture in vitro des embryons haploïdes est là aussi obligatoire.

1.4.4. Haploïdie induite par gynogénèse

Elle consiste à mettre en culture in vitro des ovules ou des ovaires prélevés sur la plante avant fécondation. Des plantes haploïdes ont pu être obtenues chez l'orge, le tabac, le blé, le riz, le maïs, la betterave.

Sur la betterave, la gynogénèse est la technique la plus opérationnelle de production d'haploïdes, même si on obtient moins de 8 % d'haploïdes. Elle permet notamment de travailler sur des betteraves mâles fertiles, aussi bien que sur des betteraves mâles stériles (contrairement à la culture d'anthers). Les fleurs sont disséquées sous la loupe binoculaire en conditions aseptiques. Les ovules sont déposés sur une boîte de pétri contenant un milieu inducteur et sont placés en chambre de culture. Après trois semaines, des embryons commencent à germer et sont transférés sur un milieu permettant le développement des plantules.

2. La culture d'embryons immatures



2.1. La réalisation de plusieurs générations par an

La technique de culture d'embryons immatures permet d'éviter la phase de maturation de la graine. En effet, par cette technique, les embryons sont prélevés quelques jours après la fécondation et non à maturité de la graine et cela permet ainsi de réaliser plusieurs générations

par an. Selon les espèces, les embryons sont prélevés plus ou moins tôt après la fécondation. En effet, un très jeune embryon risque d'avoir une croissance perturbée et plus lente, contrairement à un embryon plus développé qui est par ailleurs plus facile à prélever. Les embryons sont ensuite mis en culture pour régénérer une plante entière. La culture *in vitro* d'embryons permet de réduire fortement la dormance des graines fraîchement récoltées, et ainsi d'assurer un développement homogène des embryons. Cette technique permet donc un gain de temps, par réduction de la durée entre deux générations. On peut cultiver plusieurs générations par an et accélérer les procédures classiques de sélection : la fixation et la conversion de lignées, car plusieurs cycles d'autofécondations ou de rétrocroisements successifs peuvent être réalisés chaque année. Cette technique est très utilisée chez le tournesol et dans une moindre mesure chez le maïs.

2.2. Application au tournesol

La technique de culture d'embryons immatures est très pratiquée chez le tournesol où les phénomènes de dormance des graines sont particulièrement forts. Elle est particulièrement facile à mettre en œuvre, et permet d'obtenir 4 à 5 générations successives par an, au lieu d'une seule en culture normale, car le cycle végétatif est ramené à 80 jours. Elle est utilisée pour réaliser la fixation de lignées, la reconversion de lignées mâles fertiles en mâles stériles, ou l'introduction de gènes de résistance. Les jeunes graines sont prélevées 8 à 15 jours après la fécondation, selon le génotype. Elles sont désinfectées et disséquées. Les embryons ainsi isolés sont mis en culture en boîte de pétri. Au bout de 3 à 5 jours, on observe la formation de cotylédons chlorophylliens. Ils sont alors transférés en milieu d'enracinement, jusqu'à l'apparition d'un système racinaire assez développé. Les plantules ainsi obtenues sont alors mises en acclimatation puis repiquées sur terreau

Simplification de la technique pour le tournesol

Une technique simplifiée de sauvetage d'embryons de tournesol a également été mise au point. Toutes les étapes de l'extraction des graines du capitule jusqu'au repiquage sur terreau sont réalisées en conditions non stériles. Dans ce cas, les embryons immatures sont placés directement sur papier filtre imbibé d'une solution nutritive, jusqu'au développement des cotylédons.

