

ETUDE DE LA PRODUCTION DES DIHAPLOIDES D'ORGE OBTENUS PAR LA METHODE « *BULBOSUM* »

HANIFI – MEKLCHE L.

Laboratoire d'amélioration des plantes – Institut National
Agronomique, El-Harrach

RESUME

Des croisements interspécifiques ont été réalisés pendant deux campagnes agricoles 1986 et 1989. Les croisements interspécifiques pour l'obtention de dihaploïdes ont porté sur dix sept hybrides F_1 pendant l'année 1986 et un seul hybride F_1 en 1989. Seize clones (4 diploïdes et 12 tétraploïdes) d'*Hordeum bulbosum* (1986) et 3 clones diploïdes (1989) ont été utilisés pour la production d'haploïdes. L'étude des facteurs de production de dihaploïdes a montré l'influence des génotypes d'*H. vulgare* et d'*H. bulbosum* sur les taux de nouaison et d'embryons. Un effet température sur ces taux a été détecté.

Mots clés : orge, méthode *bulbosum*, facteurs de production, haploïde doublés.

PRODUCTION STUDY OF DOUBLED HAPLOIDS OBTAINED BY *BULBOSUM* METHOD

ABSTRACT

Interspecific crosses have been realised during two years (1986 and 1989). Seventeen F_1 (1986) and one F_1 (1989) were used to obtain haploids. Sixteen lines (4 lines diploids and 12 lines tetraploids) of *Hordeum bulbosum* (1986) and three lines diploids (1989) are used for haploids production. The production factors study has shown the genotypes effect of *Hordeum vulgare* and *Hordeum bulbosum* on the rate of caryopsis and embryos development. Effect of temperature on that rates has been shown.

INTRODUCTION

Deux méthodes sont actuellement utilisées chez l'orge : la culture *in vitro* de gamétophytes mâles (Clapham, 1971, 1973, Foroughi-Wher *et al.*, 1976 cités par Devaux, 1983) et l'hybridation interspécifique ou méthode *bulbosum* (Kasha et Kao, 1970). La première peut se faire, soit par la culture d'anthere, soit par la culture des microspores extraites de l'anthere. Les deux autres méthodes, le système génétique *hap* (Hagberg et Hagberg, 1980) et la culture de gamétophytes femelles (San Noëum, 1976)) n'ont pas eu d'applications.

Dans les années 1980, les résultats des méthodes de la culture de gamétophytes mâle et femelles et du système génétique *hap* étaient faibles comparés à ceux de l'hybridation interspécifique. En effet, Powell et Wood (1984 cités par Sarrafi *et al.*, 1986) trouvent des pourcentages de production d'haploïdes différents suivant la méthode utilisée. Ces pourcentages sont de 9,67 % pour la méthode *bulbosum*, 0,24 % pour la culture de microspores et 0,47 % pour la méthode du gène *hap*. Vyhnek *et al.* (1998) obtient un taux de régénération de plantes vertes pour la culture d'anthers allant de 2,1 à 4,2 % . Cependant, le rendement de la technique de culture d'anthers a été amélioré depuis. En effet, Devaux (1998) a déterminé le nombre de plantes vertes viables obtenues par épi, pour les deux techniques (culture d'anthers et méthode *H. bulbosum*). Sur les 785 variétés d'orge de type hiver, 432 (soit 52 %) ont mieux répondu à la méthode de culture d'anthers qu'à la méthode *H. bulbosum*, tandis que sur les 178 de type printemps, 132 (soit 76 %) ont été plus efficaces avec la méthode *H. bulbosum*. Selon cet auteur, des génotypes récalcitrants à l'une ou à l'autre technique existent dans le réservoir génétique de l'orge, et que, pour contourner ce problème et rendre la méthode de production des haploïdes performante, l'utilisation en parallèle des méthodes *H. bulbosum* et culture d'anthers est recommandée.

Pour la production de matériel de plantes haploïdes doublées, seule l'haploïdisation par la méthode *H. bulbosum* a été exploitée par nous. L'objectif de ce travail est d'étudier l'influence du milieu et du génotype des deux parents (*H. vulgare* et *H. bulbosum*) sur le taux de régénération des plantes HD.

MATERIEL ET METHODES

Les croisements interspécifiques ont été réalisés pendant deux campagnes agricoles 1986 et 1989. Dix sept hybrides F_1 sont utilisés dans les croisements interspécifiques pendant l'année 1986. Ces hybrides sont Jaidor x Beecher, Jaidor x CM 67, Jaidor x Saïda,, Motan x CM 67, Motan x Apizaco, Motan x Saïda, Beecher X Jaidor, Beecher x Motan, CM 67 x Motan, CM 67 x Beecher, CM 67 x Prato, Prato x Jaidor, Apizaco x Prato, Apizaco x Saïda, Ensenada x Beecher, Ensenada x CM 67 et Saïda x Beecher. En 1989 un seul hybride F_1 (Motan x CM 67) a été utilisé pour l'obtention de dihaploïdes.

Seize clones (4 diploïdes et 12 tétraploïdes) d'*Hordeum bulbosum* ont été utilisés pour la production d'haploïdes en 1986. En 1989, seuls 3 clones diploïdes ont été utilisés.

Quatre (essai 1986) et six dates (essai 1989) de semis ont été effectuées avec les grains F_1 pour faire correspondre le stade floraison des deux espèces. Les grains ont été semés en lignes espacées de 15 cm entre les plantes et de 50 cm entre lignes. Les croisements interspécifiques ont débuté le 05/04/1986 et sont terminés le 10/05/1986 pour le premier essai et début avril 1989 au début mai 1989 pour le deuxième essai. La mise en culture des embryons a été effectuée pendant la période allant du 30/04/1986 au 27/05/1986 et du 20 avril 1989 au 28 mai 1989.

Le deuxième et le troisième jour après castration et pollinisation, une solution d'acide gibbérélique à 75 ppm est pulvérisée pour favoriser la formation du grain, stimuler la croissance de l'embryon et augmenter le nombre de plantes haploïdes (Lartner et Enns, 1960, cités par Adamski, 1979). Les épis sont de nouveau ensachés avec des sachets opaques.

Lorsque la couleur du fruit passe du vert au jaune, les épis sont prêts pour la récolte (Jensen, 1975).

Les grains sont désinfectés avec de l'eau de Javel, à 12 %, pendant 5 mn, puis rincés à l'eau stérile.

La dissection des grains se fait sous loupe binoculaire sous une hotte stérile, tous les embryons sont mis en culture sur milieu nutritif en boîte de Pétri. Les boîtes sont fermées à l'aide de papier cellophré et portent le numéro de la F_1 , le code de *H. bulbosum*, ainsi que la date de mise en culture. Elles sont mises à l'obscurité dans une étuve à 22°C pour éviter une germination précoce (Jensen, 1975).

Lorsque les plantules ont 1cm de hauteur, elles sont sorties de l'étuve pour être mise dans une salle de culture. Un repiquage est effectué en tube, lorsque les plantes sont au stade 1 à 2 feuilles. Au stade 3 feuilles, un deuxième repiquage est effectué en pots. Les plantes ainsi repiquées sont déposées dans une serre climatisée avec 16°C de température et 16 heures de photopériode (essai 1985/1986) et dans une salle de culture avec une température maximale variant de 22°C à 27°C (la deuxième température a été atteinte au mois d'août) avec une photopériode de 16 heures (essai 1988/1989).

Le milieu utilisé est le milieu "Bacto Orchid Agar" composé par nous même. La composition de ce milieu est la suivante :

- Ca(NO ₃) ₂	1,000 g/l,	- (NH ₄) ₂ SO ₄	0,500 g/l,	- saccharose	20,000 g/l,
- KH ₂ PO ₄	0,250 g/l,	- Fe SO ₄	0,025 g/l,	- bacto - agar	15,000 g/l
- MgSO ₄ .	0,250 g/l,	- Mn SO ₄	0,075 g/l,		

La quantité de bacto-agar a été de 10 g/l, au lieu de 15 g/l préconisé. Ce milieu a été choisi en fonction des produits existants au laboratoire d'amélioration des plantes de l'I.N.A. d'Alger.

Le doublement à la colchicine est fait lorsque les plantes sont au stade 3 talles pour l'essai 1986 (Jensen, 1976 cité par Devaux, 1983, Ho *et al.*, 1978,) , pour l'essai 1989, les plantes à trois feuilles en pot, au lieu de taller, ont monté comme si elles allaient à épiaison. Craignant que cela arrive, nous avons procédé à l'opération colchicine au stade de plantes de 4 à 5 feuilles, en juillet 1989. Les plantes sont dépotées, puis lavées à l'eau, les racines coupées à 1,5 cm et on effectue une incision à la base de chaque talle (Morgan, 1976, cité par Devaux, 1983). Ces plantes sont ensuite plongées sur une hauteur de 5 cm dans une solution de colchicine à 0,05 % avec une goutte de shampoing (car nous ne disposions pas de tween 20, recommandé par Thiebaut et Kasha, 1978, cités par Devaux, 1983) pour permettre la pénétration de la solution dans la plante.

Au bout de 5 heures de traitement, les plantes sont retirées de la solution et rincées à l'eau ordinaire, puis repiquées dans des pots. Au stade de 3 talles, nous pouvons distinguer par des caractères morphologiques les plantes haploïdes (V) des plantes hybrides (VB). Ces dernières ont une morphologie de plantes *bulbosum* par le limbe des feuilles plus étroit et par la présence de longs poids blancs sur les gaines des feuilles (Lange, 1971 et Devaux 1983).

La récolte des caryopses sur les plantes haploïdes colchicinisées a été effectuée en juin 1987 pour le premier essai et sur une période s'étalant de septembre 1989 à juin 1990 pour le deuxième essai.

Pour ces deux essais, nous avons étudié le nombre de fleurs pollinisées, le nombre de grains formés, l'influence de la période de pollinisation sur le taux de nouaison (deux essais), l'influence de l'origine du pollen d'*H. bulbosum* sur le taux de nouaison (deux essais), l'influence du génotype d'*Hordeum vulgare* sur le taux de nouaison (essai 1985/1986), l'influence du nombre de jours entre la pollinisation et le prélèvement des caryopses sur l'embryogénèse (essai 1988/1989) et sur le taux de plantes, l'influence de la période de pollinisation sur le taux d'embryons et de plantes par rapport au nombre de grains et par rapport au nombre de fleurs pollinisées.

RESULTATS

Les données de production

Le premier essai (85/86) a abouti à produire essentiellement des hybrides interspécifiques *vulgare* x *bulbosum* (VB), mais ayant changé de clones *bulbosum*, le deuxième a été concluant, puisque nous avons obtenu 78 plantes haploïdes doublées, têtes de 78 lignées différentes.

Le premier essai nous a servi à nous familiariser avec la technique, ce qui explique aussi le meilleur résultat du 2^{ème} essai. Malgré l'échec, vu de notre point de vue, production d'HD, le premier essai nous a apporté des informations génétiques sur le croisement interspécifique *vulgare* x *bulbosum*. Aussi allons-nous décrire les deux essais en présentant successivement, pour chacun, les fréquences et les taux des caryopses, d'embryons et de plantes obtenus aux différentes étapes de la méthode *bulbosum*, et nous en dégagerons des facteurs génétiques et environnementaux de la nouaison sous l'aspect formation de l'embryon qui constitue l'étape cruciale de la méthode dont dépend la réussite de la production des plantes haploïdes doublées.

L'essai 1985/1986 : l'obtention d'hybrides *vulgare* x *bulbosum* par l'utilisation de pollinisateurs *bulbosum* principalement tétraploïdes à partir de plantes F₁ de génotype varié.

caractéristiques générales

Les données de l'essai 1985/1986 (tableau 1) nous suggèrent les commentaires suivants. Le taux de nouaison, très faible, 28,57 %, reflète l'incompatibilité de fécondation entre le pollen *bulbosum* et la plante *vulgare*.

Tableau 1 : Bilan d'ensemble de l'haplodiploïdisation pour les deux essais (85/86 et 88/89)

Caractéristiques	Nombre et % dans les essais	
	1985/1986	1988/1989
Nombre d'épis aux fleurs castrées et pollinisées	66	133
Nombre de fleurs pollinisées	4554	6312
Nombre moyen de fleurs pollinisées par épi	69	47,50
Nombre de caryopses formés	1301	2727
Taux de nouaison	28,57	43,20
Nombre d'embryons mis en culture		1973
- % par rapport aux fleurs	Pas de relevés	31,24
- % par rapport aux caryopses		72,35
Nombre de plantules obtenues en boîte de Pétri		660
- % par rapport au nombre de caryopses	Pas de relevés	24,20
- % par rapport au nombre de fleurs pollinisées		10,46
Nombre de plantes perdues au repiquage en tube	Pas de relevés	223 (33,79 %)
Nombre de plantes à 3 feuilles en tube	106	437
- % par rapport au nombre de fleurs	2,32	6,92
- % par rapport au nombre de caryopses	8,15	16,02
- % par rapport au nombre d'embryons	-	22,15
Nombre de plantes à 3 feuilles perdues durant la croissance	70 (66 %)	143 (32,72 %)
Nombre de plantes vertes (traitées à la colchicine)		
- au stade 2 – 3 talles	1	
- haploïdes	35	
- hybrides		
- au stade 4 – 5 feuilles		
- haploïdes		290
- hybrides		4
Efficacité à l'haploïdie (nombre d'haploïdes / fleurs pollinisées)	0,77	4,59
- % des plantes haploïdes sur le total des plantes produites	2,78	98,64

Tableau 1(suite) : Bilan d'ensemble de l'haplodiploïdisation pour les deux essais (85/86 et 88/89)

Caractéristiques	Nombre et % dans les essais	
	1985/1986	1988/1989
Résultat après le traitement à la colchicine		
a) en fréquences		
- plantes haploïdes n'ayant pas réagi au traitement	0	212
- plantes HD	1	78
- plantes hybrides VB	35	4
b) en % par rapport aux plantes traitées:		
- plantes haploïdes n'ayant pas réagi au traitement	0	72,11
- plantes HD	2,78	26,53
- plantes hybrides (VB)	97,22	1,36
Bilan pour les plantes HD en % par rapport aux nombres de		
	Sans	
- plantes à 3 feuilles	signification	17,85
- embryons	pour l'essai.	3,95
- caryopses		2,86
- fleurs pollinisées		1,23
Bilan pour les plantes hybrides en % par rapport au nombre de plantes à 3 feuilles	33,02	0,60

Le nombre de plantes à 3 feuilles est une bonne estimation du nombre de caryopses à embryon viable, apte à se développer et à germer. Le taux de 8,15 % de plantes à 3 feuilles par rapport au nombre de caryopses formés indique donc que la nouaison est défectueuse. Les 70 plantes perdues proviennent d'embryons mis en culture entre le 7 et le 28 mai 1986. Comme nous l'avons décrit plus haut, elles sont sorties de l'étuve à 16°C et déposées dans la salle de culture à température ambiante de 27°C et à la lumière du jour. Les plantes n'ont pas résisté à ces changements, et nous les avons perdues. Les 36 plantes qui sont devenues plantes à trois talles, proviennent toutes d'embryons prélevés dans les caryopses noués durant la première partie de la saison de nouaison ; de ce fait, elles ont échappé aux températures élevées de la salle de culture. Les 36 plantes constituent le nombre de plantes produites dans cet essai, 35 plantes sont des hybrides VB et une seule plante est une haploïde doublée.

L'unique plante haploïde doublée est issue du croisement [Motan x CM 67 (8/14)] x *bulbosum* clone 1822 (2 x) ; sur le nombre de plantes vertes, le taux est évidemment très bas (2,78 %). Les 35 hybrides VB ont comme parent femelle, de manière aléatoire, les différentes F₁, et comme parent

mâle en majorité des clones *bulbosum* tétraploïdes. Ces hybrides sont donc triploïdes. Nous les avons bien reconnus comme hybrides au stade de trois talles (limbe étroit, plante présentant des poils sur les feuilles), avant l'opération colchicine, mais nous les avons pourtant soumises à l'opération colchicine et gardés jusqu'au stade épiaison dans l'espoir de les voir perdre les chromosomes *bulbosum*, mais les plantes sont restées telles qu'elles. Nous vérifions ainsi la constatation de Lange (1971 a) que les triploïdes VBB contenant un génome *vulgare* et deux génomes *bulbosum* sont stables durant leur croissance.

L'effet distinct de deux parents sur les taux de nouaison et la formation des plantes à trois feuilles

Connaissant le bilan de cet essai, nous savons que nous analysons l'aptitude des parents à donner des hybrides *vulgare* x *bulbosum* (VB).

Effet du génotype *vulgare*

Les données sont présentées, dans le tableau 2. Les taux de nouaison sont très hétérogènes, variant de 0 à 54 %. Il en est de même du pourcentage des plantes à trois feuilles sur le nombre de caryopse formés, tout en étant moins étalés, de 0 à 28 % (si on excepte le croisement 17/13).

Comme les deux pourcentages ne sont pas proportionnels (par exemple, le génotype 14/6 présente un taux de nouaison parmi les plus élevés, mais il

ne produit aucune plante), le % de plantes à trois feuilles sur le nombre de fleurs pollinisées donne une bonne estimation du nombre d'embryons viables et aptes à se développer, produits par les différents génotypes *vulgare*. Pour cette aptitude, les génotypes 14/13 (10 %) et 14/15 (7 %) se détachent des autres génotypes, et 5 génotypes *vulgare* sont incompatibles avec *bulbosum*.

Le hasard des croisements a voulu, cependant, que nous ayons quelques génotypes *vulgare* croisés avec le même clone *bulbosum* 4x dans la même période de pollinisation. Ce fut le cas des génotypes 14/15, 15/3, 16/18 et 18/13 avec le clone 1835 (4x), des génotypes 6/16, 14/15 et 15/3 avec le clone 1840 (4x), et des génotypes 3/14, 6/14 et 16/18 avec le clone 1869 (4x). Il nous est ainsi possible de faire des comparaisons des taux de nouaison entre génotypes *vulgare*. Les données sont présentées dans le tableau 3. Le test G révèle une hétérogénéité significative élevée entre les génotypes *vulgare* pour les clones 1835 et 1840, et faible pour le clone 1869 (4x). Il en résulte un classement entre génotypes *vulgare* dans l'aptitude à la nouaison pour un pollinisateur donné.

Tableau 2 : Effets des différents géotypes de *H. vulgare* sur le % du nombre de grains obtenus et le % du nombre de plantes (clones de *H. bulbosum* confondus)

Géotypes <i>H. vulgare</i>	Fleurs pollinisées	Grains	Taux de nouaison	Nombre de plantes haploïdes ou hybrides au stade 3 feuilles	% des plantes haploïdes ou hybrides /aux caryopses	Nombre de plantes à 3 feuilles / nombre de fleurs pollinisées
Jaid x Bee	103	10	9,71	0	0,00	0,00
Jai x CM	96	34	35,41	4	11,76	4,17
Jai x Saï	808	181	22,40	9	4,97	1,11
Mot x CM	491	114	23,21	16*	14,03	3,26
Mot x Api Mot x Saï	147	56	38,09	7	12,50	4,76
	653	350	53,59	31	8,85	4,75
Bee x Jai	42	0	0,00	0	0,00	0,00
Bee x Mot	57	0	0,00	0	0,00	0,00
CM x Mot	216	79	36,57	0	0,00	0,00
CM x Bee	68	10	14,70	2	20,00	9,94
CM x Pra	194	50	25,77	14	28,00	7,22
Pra x Jai	416	73	17,54	2	2,73	0,48
Api x Pra	471	85	18,04	2	2,35	0,42
Api x Saï	258	97	37,59	8	8,24	3,09
Ens x Bee	128	2	1,56	1	50,0**	50,0**
Es x CM	149	55	3,91	0	0,00	0,00
Saï x Bee	257	105	40,85	10	9,52	3,89
Total	4554	1301	28,57	106	8,15	

Jai = Jaidor, Mot = Motan, Bee = Beecher, CM = California Mariout 67, Pra = Prato., Api = Apizaco, Ens = Ensenada et Saï = Saïda.

* = dont une plante haploïde *vulgare*,

**= % qui ne peut pas être pris en compte, vu l'effectif de grains.

Tableau 3 : Test d'indépendance de l'effet du génotype de *Hordeum vulgare* sur le taux de nouaison (période de pollinisation et clones de *H. bulbosum* identiques)

Périodes de pollinisation	génotypes comparés	G	ddl	classement pour les taux de nouaison	La moyenne du génotype vulgare dans l'essai
croisements avec le 1835 (4x)					
3 ^{ème} décade d'avril	14/15, 15/3, 16/18 et 18/13	22,862***	3	18/13 : 74,07 % a	40,85
	16/18 et 18/13	0,402 ns	1	16/18 : 68,75 % a	37,59
	14/15 et 16/18	8,768**	1	15/3 : 43,75 % b	17,54
	15/3 et 16/18	10,410***	1	14/15 : 42,37 % b	25,77
	14/15 et 15/3	0,031 ns	1		
croisements avec le 1840 (4x)					
3 ^{ème} décade d'avril	6/16, 14/15 et 15/3	38,730***	2	6/16 : 50,94 % a	38,09
	6/16 et 14/15	2,450 ns	1	14/15 : 36,50 % a	25,77
	14/15 et 15/3	46,420***	1	15/3 : 1,49 % b	17,54
croisements avec le 1869 (4x)					
1 ^{ère} décade de mai	3/14 6/14 et 16/18	7,998*	2	3.14 : 35,41 % a	35,41
	3/14 et 16/18	0,012 ns	1	16/18 : 34,75 % a	37,59
	6/14 et 16/18	5,466	1	6/14 : 24,20 % b	23,21

* = significatif au seuil de 5 %, ** = significatif au seuil de 1 %, *** = significatif au seuil de 0,1 %

Effet du génotype *bulbosum* par son niveau de ploïdie

Les données sont présentées dans le tableau 4, et nous ne disposons que des relevés des taux de nouaison. Sachant qu'ils ne traduisent pas un taux équivalent d'embryons viables, il n'est pas possible de dégager des aptitudes à donner des embryons pour un niveau de ploïdie donné. Cette restriction étant faite, nous voyons qu'un génotype tétraploïde peut donner un bon taux de nouaison (le 1833 avec 36 %) et un faible taux (le 1837 avec 4 %), et il en est de même pour les clones diploïdes (le 1820 avec 38 % et le 1830 avec 8 %). Mais globalement en considérant les moyennes des taux par niveau de ploïdie, 18,52 % pour les diploïdes et 29,54 % pour les tétraploïdes, il y a un avantage pour les tétraploïdes qui se vérifie par le test G (tableau 6). Il est possible que sous cet avantage nous décelions une meilleure vigueur des embryons triploïdes (VBB) sur les embryons diploïdes (VB) devenant haploïdes (V). Il en découle qu'en utilisant le pollinisateur diploïde, nous éliminons cette concurrence.

Le hasard des pollinisations a fait que, durant la 3^{ème} décennie d'avril, nous avons fait des croisements plus nombreux avec quatre clones, trois tétraploïdes, 1835, 1842 et 1869, et un diploïde, 1820. Il est donc possible de comparer leur effet sur le taux de nouaison, sur une courte période de pollinisation (nous verrons, au paragraphe suivant que cette période est la meilleure). Les résultats du test G sont présentés dans le tableau 5. Nous voyons qu'il est possible de classer les clones suivant leur taux de nouaison. Mais ce classement ne met pas le clone diploïde comme le moins bon à donner des caryopses. Cependant, ce résultat reste concordant avec les moyennes des deux niveaux de ploïdie (tableau 6), au vu de la grande variabilité des taux de nouaison (tableau 4).

L'effet environnemental : les périodes de pollinisation favorables à la nouaison

Les données sont portées dans le tableau 7 sous forme de fréquences, en vue du test G, et %, en vue de leur classification. Le temps de pollinisation est découpé en trois décades, 2^{ème} et 3^{ème} décennie d'avril et 1^{ère} décennie de mai. Les tests statistiques mettent en évidence que la période optimale de pollinisation se situe dans la 2^{ème} moitié du mois d'avril.

Tableau 4 : Effet des différents clones d'*H. bulbosum* sur le taux de nouaison (toutes lignées d'*H. vulgare* confondues)

Clones d' <i>H. bulbosum</i>	Nombre de fleurs pollinisées	Nombre de caryopses obtenus	% de Nouaison
1822 (2x)	140	32*	22,85
1820 (2x)	37	14	37,83
1830 (2x)	60	5	8,33
1839 (2x)	168	24	14,28
1833 (4x)	58	21	36,20
1835 (4x)	342	162	47,36
1837 (4x)	113	5	4,42
1840 (4x)	329	53	16,10
1842 (4x)	186	28	22,58
1844 (4x)	51	5	9,80
1847 (4x)	63	2	3,17
1850 (4x)	50	28	56,00
1854 (4x)	169	73	43,19
1858 (4x)	72	25	34,72
1869 (4x)	2560**	814	31,79
Montp. (4x)	156	10	6,41
Totaux	4554	1301	28,56

* = dont un grain donnera la plante haploïde

** = le grand nombre de fleurs pollinisées par ce clone est dû à sa bonne production pollinique

Tableau 5 : Effet du parent *bulbosum* sur taux de nouaison (test d'indépendance)

Période de pollinisation	Génotypes comparés	G	Ddl	Classement des taux de nouaison
3 ^{ème} décade d'Avril	1869, 1842, 1820 et 1835	75,394***	3	1835 : 74,07 % a
	1869 et 1835	0,354 ns	1	1869 : 68,75 % a
	1869 et 1820	8,174**	1	1820 : 37,83 % b
	1820 et 1842	7,981**	1	1842 : 15,25 % c

Tableau 6 : Effet du degré de ploïdie des géotypes d'*Hordeum bulbosum* sur le taux de nouaison

Géotypes	Nombre de caryopses	Sans caryopses	Fleurs pollinisées	G	Classement
2 x	75	330	405	10,33*	4 x : 29,54 %a
4 x	1226	2923	4149		2x : 18,51 % b
Total	1301	3253	4554		

CONCLUSION

Les composantes expérimentales de l'essai 1985/1986 sont le grand nombre de géotypes *vulgare* et de clones *bulbosum* dans les croisements interspécifiques, l'utilisation de clones principalement tétraploïdes et l'obtention de plantes hybrides VB. Cet essai nous démontre donc que la barrière d'incompatibilité *vulgare* – *bulbosum* est levée, sinon amoindrie, à la suite de la culture d'embryons, et que dans l'optique de la production HD, nous devons absolument abandonner les clones tétraploïdes de *bulbosum*.

L'essai 1988/1989 : obtention de plantes haploïdes doublées par l'utilisation de clones *bulbosum* diploïdes à partir de plantes F₁ de géotype [Motan x CM 67]

Déroulement de l'expérimentation

Dans la manière d'utiliser les trois clones *bulbosum* diploïdes (Jensen, J, Pickering, P, Kasha, K), nous avons une contrainte, tenir compte du temps de floraison, et un but, exploiter l'aptitude des clones à donner des haploïdes. En effet, Devaux (1983 et 1991) et Pickering et Devaux (1992) préconisent un mélange de pollen de différents clones *bulbosum*, et ils démontrent que des pollens mélangés de clones différents à la pollinisation ont des effets complémentaires avec différents géotypes *vulgare* d'un programme de production HD. Dans notre cas, n'ayant qu'un géotype

Tableau 7 : Effet de la période de pollinisation sur le taux de nouaison

Périodes	Caryopses	sans caryopses	Total	Classement (%)	Périodes comparées	G	ddl
2ème décade avril	214	709	923	23,18 « b »	3 décades	17,076***	2
3ème décade avril	326	749	1075	30,32 « a »	3 ^{ème} d. A. et 1 ^{ère} d.M.	0,109 ns	1
1ère décade mai	761	1795	2556	29,77 « a »	1 ^{ère} d. M. et 2 ^{ème} d.A	14,964***	1
TOTAL	1301	3253	4554				

d. A = décade d'avril
d. M = décade de mai

vulgare, nous voulions exploiter l'aptitude à l'haploïdie des trois clones face à ce seul génotype. Mais vu le temps de pollinisation trop court pour un seul expérimentateur, nous n'avons pas réalisé toutes les pollinisations de pollen isolé de clone et toutes les combinaisons de pollen. Nous avons utilisé les pollens suivant : J, J + P, et J + P + K, et, à cause des temps d'anthèse des clones, aux périodes suivantes : J, du 10 au 30 avril, J + P, du 20 au 30 avril, et J + P + K, du 1^{er} au 10 mai.

Par rapport à l'essai précédent, nous avons eu moins de perte au repiquage des plantes à 3 feuilles (32,72 %), en "fertile pots" dans la salle de culture, et nous avons dû les laisser à cet endroit pendant toute leur croissance, car la serre dont nous disposions au premier essai n'était plus fonctionnelle. Nous disposions de 294, toutes des plantes haploïdes, à l'exception de quatre. Le bilan de l'essai (tableau1, p. 5) était prometteur. Cependant 72 % des plantes sont allées à épiaison sans produire de caryopses ; ces plantes sont donc restées haploïdes et le traitement à la colchicine n'a eu aucun effet sur elles. Finalement, nous avons obtenu 78 plantes haploïdes doublées et 4 hybrides VB, restés diploïdes, et sur les HD, nous avons récolté les grains, de septembre 1989 à juin 1990. Ces grains récoltés par plante HD forment les 78 têtes de lignées.

Caractéristiques générales

Dans cet essai, nous avons porté notre attention sur le développement des embryons en culture. Leur nombre s'élève à 1973 (tableau 1). Il donne, rapporté au nombre de caryopses, un pourcentage de 72. Celui-ci est très élevé comparé à celui des auteurs. Par exemple Devaux *et al.* (1992) donnent pour 200 génotypes des pourcentages moyens plus faibles, variant entre 16 et 27 %. La différence entre les deux données provient du fait que ces auteurs ne mettent en culture que les embryons différenciés. Nous-mêmes, nous n'avons pas fait de tri, au moment de leur mise en culture, entre embryons différenciés sur lesquels la gemmule est visible, et embryons indifférenciés, de forme globulaire, où on ne distingue pas l'axe tigelle - radicule et le cotylédon. Par économie de temps, nous avons mis en culture tous les embryons que nous avons réussis à extraire des caryopses.

Cependant le tri entre embryons va se faire naturellement durant leur développement ; le nombre de plantules obtenues en boîte de Pétri, 660, est ainsi une bonne estimation du nombre d'embryons différenciés dans les caryopses. Ce nombre, rapporté aux nombres de caryopses, donne un pourcentage de 24,20, valeur qui rentre bien dans l'intervalle de variation de Devaux *et al.* (1992). Rapporté au nombre de fleurs pollinisées, il donne un pourcentage de 10,46 %, qui pourrait être équivalent au pourcentage d'embryons différenciés par fleurs pollinisées.

Nous avons analysé en détail les différentes morphologies possibles de développement d'embryons en boîte de Pétri (tableau 8, les deux colonnes de droite). Nous avons observé des embryons qui s'arrêtent de croître, ou qui donnent une racine, ou des embryons qui prennent l'aspect d'un cal, avec parfois une racine, ou des plantules albinos, ou enfin des plantules vertes. Ce sont les embryons en arrêt de développement (35,99 %) et heureusement ceux qui donnent une plantule verte (33,45 %) qui sont les plus fréquents.

En transplantant ces plantules en tube, nous en perdons 223, et 437 (tableau 1) arrivent au stade de plantes à trois feuilles. Ces dernières, durant leur croissance en "fertile pots", subissent encore une perte de 32,72 %. Cette perte reste importante, mais moins élevée que dans l'essai précédent, parce que nous avons disposé d'une salle de culture climatisée avec températures variant entre 22°C, en avril, à 27°C, en août, et photopériode de 16 heures. Nous disposons ainsi de 294 plantes vertes, 290 haploïdes et 4 hybrides (VB). Bien qu'elles n'aient pas tallé, nous considérons les 290 plantes équivalentes à des plantes adultes vertes. L'efficacité à l'haploïdie du croisement interspécifique s'élève ainsi à 4,59 % (tableau 1).

Effet du pollinisateur aux différentes étapes de la production de plantes haploïdes et d'hybrides VB durant la culture en boîte de Pétri, en tube et en "fertile pots"

Au moment de la nouaison

Les données sont présentées dans le tableau 9, et le test G indique que les nombres de caryopses formés sont significativement différents, le pollen J étant le meilleur. Mais ce classement est à minimiser, car il reflète aussi l'effet de la période de pollinisation, le mélange J + P + K au taux de nouaison le plus bas ayant été utilisé à la fin de la période de floraison.

Durant la culture en boîte de Pétri

Les données sont présentées dans le tableau 8. On constate que les pourcentages affichés dans les catégories 2 à 6 varient faiblement en fonction des trois compositions de pollen, plus fortement pour le pourcentage d'embryons inviables (catégorie 1) et de plantules vertes (catégorie 7) ; en particulier le mélange pollen J + P + K semble avoir un effet bénéfique puisque dans le croisement avec ce mélange, nous mesurons le pourcentage le plus faible d'embryons inviables et le pourcentage le plus élevé de plantules vertes. Le test G le confirme (tableau 10).

Tableau 8 : Les sept catégories de développement embryonnaire en boîte de Pétri et effectif par catégorie et selon les pollinisateurs

Catégories de développement embryonnaire	Pollinisateurs						Pollinisateurs confondus	
	J		J + P		J + P + K		Nombre	%
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%		
1	291	41,16	333	35,80	86	25,29	710	35,99
2	127	17,96	199	11,39	56	16,66	382	19,36
3	14	1,98	12	1,29	2	0,59	28	1,42
4	5	0,71	1	0,10	0	0,00	6	0,30
5	39	5,52	84	9,03	12	3,57	135	6,84
6	13	1,84	28	3,01	11	3,27	52	2,64
7	218	30,83	273	29,35	169	50,30	660	33,45
Total des embryons mis en culture	707	100,00	930	100,00	336	100,00	1973	100,00

Catégories de développement embryonnaire :

1. Embryons arrêtés dans le développement ou inviables,

2. Embryons donnant une racine,

3. Embryons se transformant en cal,

4. Cal produisant une racine, 7. Plantules vertes viables en boîte de Pétri

5. Plantules albinos,

6. Embryons infectés,

Tableau 9 : Effet des combinaisons polliniques sur le nombre d'embryons inviables par rapport aux embryons mis en culture

Pollinisateurs	Nombre d'embryons inviables (catégorie 1)	Nombre d'embryons des catégories 2 à 7	Nombre d'embryons mis en culture (total)	Pollinisateurs	G	ddl	Classement
J	291	416	707	J, J+P, J+P+K	10,71***	2	J : 41,15 % a
J+P	333	597	930	J, J+P	2,11 ns	1	JP : 35,80 % a
J+P+K	86	250	336	J+P, J+P+K	5,19*	1	JPK : 25,59 % b
TOTAL	710	1263	1973				

Tableau 10 : Effets des combinaisons polliniques sur le nombre de plantules vertes obtenues par rapport au nombre d'embryons mis en culture

Pollinisateurs	Nombre de plantules vertes (catégorie 7)	Nombre de plantules (Catégories de 1 à 6)	Nombre d'embryons mis en culture (total)	Pollinisateurs comparés	G	ddl	classement
J	218	489	707	J, J+P, J+P+K	21,60***	2	J+P+K : 50,29 % a
J+P	273	657	930	J, J+P	0,18 ns	1	J : 30,83 % b
J+P+K	169	167	336	J+P, J+P+K	15,82***	1	J+P : 29,35 % b
TOTAL	660	1313	1973				

Mais quand on considère le nombre de plantules vertes par rapport au nombre de fleurs pollinisées (tableau 11), la composition du pollen se révèle sans effet. Ce résultat est à rapprocher du commentaire que nous avons développé dans les caractéristiques générales, à savoir que n'ayant pas fait un tri entre embryons différenciés et indifférenciés, lors de leur mise en culture, le nombre de plantules viables est équivalent ou proche du nombre d'embryons différenciés. Il en découle que le nombre d'embryons différenciés ne dépend pas du pollinisateur pour le géotype *vulgaris* Motan x CM 67.

Durant la culture en tube

Les données sont présentées dans le tableau 12, catégories 1 à 3. Les pertes de plantules vertes (catégorie 2) sont très proches dans les croisements aux trois types de pollen. Il en découle que le type de pollen n'intervient pas sur le nombre de plantes à trois feuilles par rapport au nombre de fleurs pollinisées (tableau 13).

Durant la croissance en "fertil pots"

Les données sont présentées dans le tableau 13, catégories 4 et 5. Les pertes, plus faibles qu'à l'étape de croissance précédente, sont de même valeur pour les trois pollinisateurs par rapport au nombre de fleurs pollinisées (tableau 14).

Finalement on ne peut attribuer à un pollinisateur un meilleur résultat. Mais comme nous n'avons pu comparer le pollen des trois clones, nous pouvons nous demander au vu des résultats disponibles si le pollen du clone Jensen n'est pas le meilleur ; car dans les trois comparaisons (tableaux 11, 13 et 14), le pollen Jensen présente le pourcentage le plus élevé, tout en n'étant pas significatif. Nous allons trouver une indication allant dans le même sens en considérant nos données arrangées suivant la période de pollinisation.

Tableau 11 : Etat du développement des embryons en boîte de Pétri

Pollinisateurs	Nombre de plantes vertes viables *	Nombre d'embryons inviables	Nombre de fleurs pollinisées (totaux)	% / nombre de fleurs pollinisées	Pollinisateurs comparés	G	ddl
J	218	1629	1847	11,80	J, J+P, J+P+K	3,207 ns	2
J+P	273	2602	2875	9,49			
J+P+K	169	1421	1590	10,63			
TOTAL	660	5652	6312	10,46			

* = catégorie 7, tableau 8

Tableau 12 : Etat du développement des plantules en plantes vertes haploïdes ou hybrides (en "fertils pots") et pourcentage par rapport au nombre de plantules vertes en boîte de Pétri et au nombre de fleurs pollinisées

Catégories de plantes	Pollinisateurs						Pollinisateurs confondus	
	J		J + P		J + P + K		Nombre	% / fleurs pollinisées
	Nombre	% / plantules vertes en boîtes de Pétri	Nombre	% / plantules vertes en boîtes de Pétri	Nombre	% / plantules vertes en boîtes de Pétri		
1	218	-	273	-	169	-	660	10,45
2	72	33,03	88	32,23	63	37,28	223	-
3	146	65,97	185	67,77	106	62,72	437	6,92
4	45	20,64	65	23,81	33	19,53	143	-
5	101	46,33	120	43,96	73	43,19	294	4,66

1 = Plantules vertes viables, en boîte de Pétri et mises en tube, 2 = plantules chlorophyllienne n'ayant pas survécu au repiquage en tube, 3 = Plantes arrivant au stade 3 feuilles en tube, 4 = Pertes au repiquage en "fertils-pots", 5 = Plantes vertes à 4 ou 5 feuilles traitées à la colchicine

Tableau 13 : Etat du développement des plantules en tube

Pollinisateurs	Plantes à 3 feuilles *	Echec	Nombre de fleurs pollinisées (totaux)	% / nombre de fleurs pollinisées	Pollinisateurs comparés	G	ddl
J	146	1701	1847	7,90	J, J+P, J+P+K	3,901 ns	2
J+P	185	2690	2875	6,43			
J+P+K	106	1484	1590	6,60			
TOTAUX	437	5875	6312	6,92			

* =catégorie 3, tableau 12

Tableau 14 : Effet des combinaisons polliniques sur le nombre de plantes vertes obtenues par rapport au nombre total de fleurs pollinisées (essai 1989)

Pollinisateurs	Nombre de plantes vertes (Catégorie 5)	échec	Nombre de fleurs pollinisées	G	%
J	101	1746	1847		5,47
J+P	120	2755	2875	1,814 ns	4,17
J+P+K	73	1517	1590		4,80
Total	294	6018	6312		

Effet de la période de pollinisation

Nous distinguons trois périodes de pollinisation, 2^{ème} et 3^{ème} décade d'avril et 1^{ère} décade de mai. Nous avons changé de pollinisateurs à chaque période : durant la 2^{ème} décade d'avril, nous avons utilisé le pollen du clone Jensen, durant la troisième décade, ce pollen et le mélange de pollen des clones Jensen et Pickering (J + P), et durant la première décade de mai le mélange de pollen des trois clones. Nous considérons les taux de nouaison en fonction des périodes de pollinisation (tableau 15). Le test G, appliqué au nombre de caryopses formés et non formés, montre que la deuxième décade d'avril, qui est la première décade de pollinisation, est la meilleure des trois décades. Mais comme le pollinisateur varie sur les trois décades, nous avons aussi dans ce classement l'effet du pollen, et le pollen Jensen apparaît comme le meilleur. Il nous semble donc plus juste de dire que la période la plus favorable à la pollinisation va du 10 au 30 avril, début mai constitue la fin du temps de floraison. Il y a un léger décalage par rapport à l'essai 85/86, l'essai 88/89 paraissant plus précoce.

Tableau 15 : Effet de la période de pollinisation sur le taux de nouaison

Périodes	Caryopses	Sans caryopses	Total	%	Périodes comparées	G	ddl
2ème décade avril	398	336	734	54,22 « a »	3 décades	271,3733***	2
3ème décade avril	1977	2188	4165	47,46 « b »	2 ^{ème} d. A. – 3 ^{ème} d. A.	11,4040***	1
1ère décade mai	352	1061	1413	24,91 « c »	3 ^{ème} d. A. – 1 ^{ère} d. M.	230,6866***	1
TOTAL	2727	3585	6312				

CONCLUSION

Le croisement *vulgare* x clone *bulbosum* diploïde de l'essai 1988/1989 a donné préférentiellement des plantes haploïdes (98,64 %). Nous avons relevé (Ho *et al.*, 1978 ; Pickering et Morgan, 1979a cités par Devaux, 1983) qu'en pollinisation au champ, même en été sous les latitudes européennes, on obtient un certain nombre d'hybrides, supérieur à 1 %. Ce ne fut donc pas le cas dans notre dispositif, probablement à cause des températures de climat méditerranéen, plus élevées même en avril et mai qu'en juillet en France.

L'efficacité à l'haploïdie du croisement de 4,59 se situe dans les valeurs moyennes. Malgré les données incomplètes sur la production de plantes haploïdes en fonction des pollens isolés ou en mélange des trois clones, il semblerait que le pollen du clone Jensen ait un léger avantage avec le génotype Motan x CM 67, acquis au moment de la nouaison. Mais durant le développement des embryons en plantes vertes, il n'y a plus de différence entre le nombre de plantes en croissance, en référence au pollinisateur. Ce résultat nous paraît logique sur le plan biologique, puisque les plantes sont de l'espèce *vulgare* et n'ont plus aucune information génétique du pollinisateur *bulbosum*, suite à l'élimination des chromosomes *bulbosum*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMSKI T., 1979. The obtaining of autodiploid barley lines using haploids from the cross *Hordeum vulgare* L. x *Hordeum bulbosum* L. *Genetica Polonica*, 20 : 31 - 41.
- DEVAUX P., 1983. Haploïdes doublés issus d'orge d'hiver par la méthode *bulbosum*. Thèse de doctorat 3ème cycle agron., Université Lille I., 125 p.
- DEVAUX P., 1991. Investigations to improve doubled haploid production efficiency in a winter barley breeding programme. *Cereal Res. Commun.*, 19 : 51 – 58.
- DEVAUX P., 1998. Les plantes haploïdes chez l'orge, avec extension au blé: méthodes d'obtention et relations avec l'organisation de leur génome. Thèse de Docteur ès-Sciences Naturelles. Université des sciences et technologies de Lille, n° d'ordre : 807, 157 p.
- DEVAUX P., ADAMSKI T and SURMA M., 1992. Inheritance of seed set in crosses of spring barley and *Hordeum bulbosum* L. *Crop Sci.*, 32 : 269 – 271.
- HAGBERG A. et HAGBERG G., 1980. High frequency of spontaneous haploids in the progeny of an induced mutation in barley. *Hereditas*, 93 : 341 - 343.
- HO K.MM., STOKKERMANS N.J., SADLER B.J., MC INTOSH K.C. and HO L. C., 1978. Efficiency of barley haploid production. *Barley Genetics Newsl.*, 10 : 53 - 55.
- JENSEN C.J., 1975. Barley monploids and doubled monploids : techniques and expérience. In *Barley genetics III. Proceedings of the Third International Barley Genetics. Symposium, Garching, july 1975* : 316 - 345.
- KASHA K.J. and KAO K.N., 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature*, 225 : 874 - 876.
- LANGE W., 1971. Crosses between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. I. Production, morphology and meiosis of hybrids, haploids and dihaploids. *Euphytica*, 20 : 14 - 20.

- PICKERING R.A. and DEVAUX P., 1992. Haploid production: approaches and use in plant breeding. *In* : Barley Genetics, Molecular Biology and Biotechnology. Ed Shewry P.R. CAB Int. Publ., Walling ford, UK, 511 – 539.
- SAN NOEUM L.H., 1976. Haploïdes d'*Hordeum vulgare* L. par culture in vitro d'ovaires non fécondés. *Ann. Amélior. Plantes*, 26 : 751 - 754.
- SARRAFI A., ECOCHARD R., PLANCHON C. and ALI-SADIQ M., 1986. Genetic gain for some agronomical characters by dihaploid breeding in barley. Genetic manipulation in plant breeding. Ed. Horn, Jensen, Odenbach, Schieder, 1986. Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York, 343 - 345.
- VYHNEK T., OHNOUTKOVA L.; BEDNAR J., 1998. [Formation of pollen embryos and green plants in anther cultures of selected genotypes in barley (*Hordeum vulgare* L.)]. *ACTA Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 46(1) 85-88. résumé in *plant Breeding Abstract* 1998 vol 68 (11).