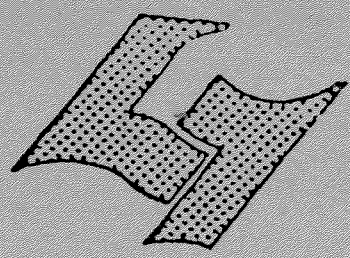


0676

1984  
16  
A

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON-I  
Boulevard du 11 Novembre 1918  
69621 VILLEURBANNE



# Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées

## Informations documentaires

Note de Synthèse

-----

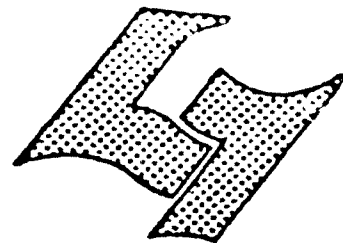
Biotechnique :  
l'amélioration des plantes  
par l'haplométrie

Anne CONTAT

1984



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON-I  
43, Boulevard du 11 Novembre 1918  
69621 VILLEURBANNE

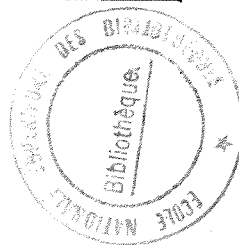


## *Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées*

**Informaticque documentaire**

Note de Synthèse  
-----

Biotechnique :  
l'amélioration des plantes  
par l'haplométhode



Anne CONTAT

1984

## PLAN

INTRODUCTION

<u>METHODOLOGIE</u> .....	1
I - RECHERCHE DE REFERENCE .....	2
1.1. sur PASCAL, BIOSIS et RESAGRI.....	2
1.2. recherche manuelle .....	3
1.3. Conclusions .....	3
II - ACQUISITION DES DOCUMENTS PRIMAIRES .....	4

SYNTHESE

Plan .....	6
Introduction .....	8
I - PRODUCTION DES PLANTES HAPLOIDES VIA L'ANDROGENESE .....	9
II - DIFFERENTS FACTEURS JOUANT SUR L'ANDROGENESE...	12
III - TRANSFORMATION DU POLLEN EN PLANTE HAPLOIDE....	26
IV - UTILISATION DES HAPLOIDES .....	31
V - CONCLUSIONS ET LIMITES.....	39

BIBLIOGRAPHIE

I - INDEX DES NOMS D'AUTEURS.....	40
II - INDEX DES OUVRAGES ET EDITEURS.....	
III - INDEX DES NOMS BOTANIQUES.....	

ANNEXES

## METHODOLOGIE

## INTRODUCTION

En recherchant un sujet de note de synthèse conjuguant à la fois notre formation d'ingénieur agricole et notre intérêt porté aux investigations scientifiques dans le domaine agronomique, nous avons retenu les travaux concernant les techniques de multiplication végétative et de culture in vitro des végétaux.

Nous nous sommes alors adressé au laboratoire botanique de la Faculté des Sciences de Lyon, dirigé par Monsieur le Professeur Christian DUMAS. Dans le cadre de ce travail, Monsieur DUMAS nous a proposé de recenser et d'analyser les publications récentes (depuis 1977), de nombreuses équipes françaises et étrangères étudiant l'androgenèse in vitro chez les Angiospermes.

## 1 . RECHERCHE DE REFERENCES

### 1.1. Sur PASCAL, BIOSIS et RESAGRI

Outillés de quelques mots-clés, comme cytodifférenciation, différenciation, androgenèse, développement embryonnaire, haploïdes, haplométhode, pollen, anthère, biotechnologie, dans le cadre de l'U.R.F.I.S.T., il nous a été possible d'interroger deux bases de données, PASCAL et BIOSIS.

L'interrogation de PASCAL s'est déroulée grâce à une stratégie (voir stratégie N°1 en annexe), utilisant des mots libres ou unitermes, du titre ou résumé.

Elle a permis d'obtenir 241 références en différé, dont 184 pertinentes, le bruit détecté étant dû à des références traitant plutôt de palynologie, d'allergie au pollen, de germination du pollen, de cytodifférenciation et d'ultra-structure concernant la seule formation du pollen ou de l'anthère.

L'interrogation de BIOSIS a fait intervenir des descripteurs codés (concept code C.C.) correspondant aux différents mots clés principaux : culture in vitro, anthère, pollen (voir stratégie N°2 en annexe). Moins bien maîtrisée que sur PASCAL, car menée par une autre personne néophyte dans le domaine scientifique concerné, et souhaitant limiter le volume de références, dans le cadre d'une démonstration de la base, elle n'a permis d'acquérir que 46 articles intéressants sur 77 demandés en différé.

L'interrogation de RESAGRI, sur un terminal de MUTASUDEST, selon les mots clés "culture in vitro", "graminées" et "crucifères", n'a abouti qu'à 3 références intéressantes (voir stratégie N°3 en annexe.).

Face à ce volume d'informations obtenues sur ces bases de données, et en accord avec Mr. le Professeur DUMAS, le champ d'investigation s'est réduit aux Graminées et aux Crucifères.

### 1.2. Recherche manuelle

Quelques documents synthétiques et généraux concernant l'androgenèse in vitro ont permis d'obtenir 85 références supplémentaires, a priori pertinentes par le titre et les citations trouvées.

La recherche sur les fichiers du laboratoire de botanique de la faculté a donné 13 références supplémentaires.

Enfin, et beaucoup plus tard (fin juin) une bibliographie des travaux effectués sur l'androgenèse in vitro a pu être disponible au laboratoire de botanique de Monsieur le Professeur DUMAS.

### 1.3. Conclusion

On peut résumer les résultats de cette recherche de références dans le tableau synthétique suivant, mettant en évidence les références originales apportées par les bases PASCAL, BIOSIS et RESAGRI, par rapport à la bibliographie de l'INRA de Versailles.

champ base	Généralités	Graminées	crucifères
INRA Versailles	51	149	42
PASCAL	23 dont 7 originales	89 dont 37 originales	16 dont 2 originales
BIOSIS	8 dont 4 originales	21 dont 10 originales	?
RESAGRI	?	0	3 originales
TOTAL	62	196	47

## 2 . ACQUISITION DE DOCUMENTS PRIMAIRES

Sur les 306 références repérées, il a été possible de lire et de photocopier des articles dans trois lieux différents :

- à la "salle chercheurs" de la Faculté des Sciences de Lyon (7 références).
- au laboratoire de botanique de Monsieur le Professeur DUMAS (13 références).
- au laboratoire de botanique de l'INRA du domaine d'Epoisses de Dijon (73 références).

Cette acquisition s'est avérée assez délicate, peu d'articles étant accessibles sur place à Lyon et peu de moyens financiers étant à notre disposition; c'est à Dijon, où nous sommes allé aussi pour d'autres motifs de travail, que nous avons pu recueillir le maximum de photocopies d'articles, dans des grandes séries de revues scientifiques comme "Crop Science", "American Journal of Botany", "Annales de l'amélioration des plantes", "Comptes rendus de l'Académie des Sciences de Paris", "Theoretical and applied genetics", "Genetics", "Zeitschrift für Pflanzenzüchtung", "Zeitschrift für Pflanzenphysiologie" ....



SYNTHESE

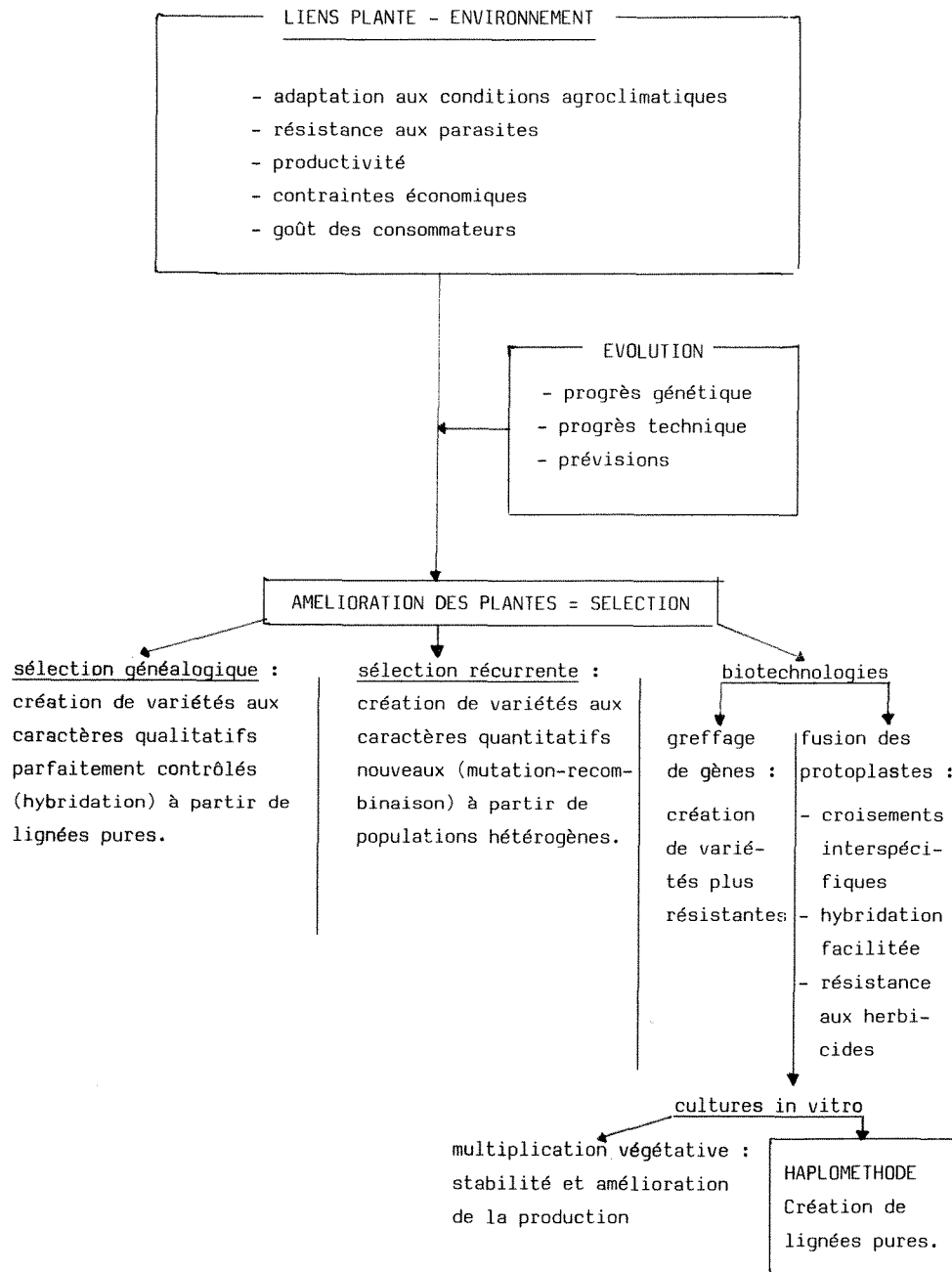
---

PLAN

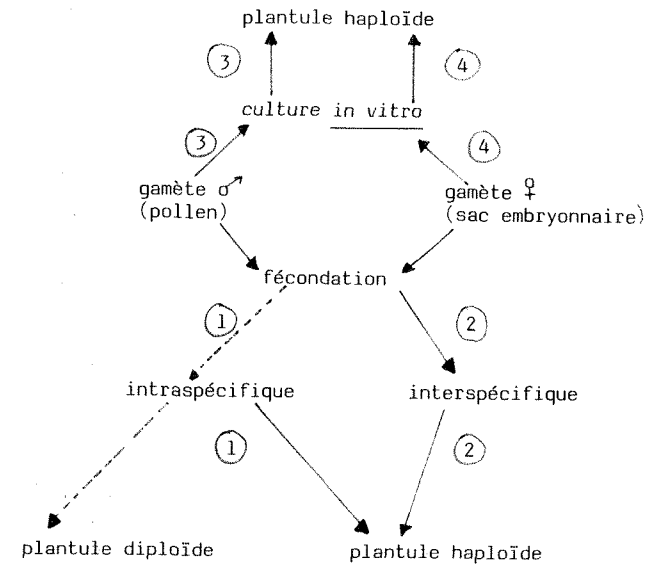
---

INTRODUCTION .....	7
I - PRODUCTION DES PLANTES HAPLOIDES VIA L'ANDROGENESE	
1.1. La culture d'anthères.....	8
1.2. la culture de pollen ab initio.....	9
1.3. la culture de pollen à partir d'anthères précultivées.....	9
II - DIFFERENTS FACTEURS JOUANT SUR L'ANDROGENESE	
2.1. facteurs de conditionnement.....	12
2.1.1. le génotype de la plante-mère .....	12
2.1.2. l'état physiologique de la plante-mère.....	13
2.1.3. l'âge de la plante mère.....	16
2.1.4. le dimorphisme du pollen .....	17
2.2. Facteurs du milieu de culture .....	18
2.2.1. facteurs extrinsèques.....	18
2.2.2. facteurs intrinsèques .....	21
2.2.3. paroi de l'anthère.....	25
III - TRANSFORMATION DU POLLEN EN PLANTE HAPLOIDE	
3.1. les quatre voies théoriques .....	26
3.2. l'approche cellulaire explicative.....	26
3.3. les différentes voies morphogénétiques .....	29
3.4. le problème des plantes albinos.....	30
IV - UTILISATION DES HAPLOIDES	
4.1. obtention d'haploïdes doublés.....	31
4.2. utilisation des haploïdes dans l'explication de la différenciation cellulaire et de la morphogénèse.....	32
4.3. utilisation des haploïdes dans l'explication de la mutagenèse..	33
4.4. utilisation des haploïdes dans la sélection.....	35
4.4.1. production et utilisation de lignées homozygotes.....	35
4.4.2. application à l'hybridation à distance.....	36
4.4.3. analyse génétique des lignées sélectionnées. ....	37
4.5. Apparition du phénomène de contrôle épigénique.....	38
V - CONCLUSIONS ET LIMITES .....	
	39

SCHEMA 1 : l'haplométhode dans le contexte de l'amélioration des plantes



SCHEMA 2



SCHEMA N ° 2 : L' HAPLOIDIE = 4 ALTERNATIVES A LA VOIE SEXUEE

voie sexuée : (--->) une fécondation normale donne naissance à un embryon puis une plantule diploïde.

fécondation anormale intraspécifique : (1) elle donne naissance à deux embryons ; l'un, haploïde, évolue en plantule haploïde ; l'autre, diploïde, en plantule diploïde.

fécondation interspécifique : (2) l'un des gamètes parentaux ne participe que temporairement ; l'embryon haploïde résultant donne naissance à un plantule haploïde.

androgonèse : (3) le pollen, cultivé *in vitro*, prend la voie sporophytique, se différencie en un embryon puis en une plantule haploïde.

ovogèse : (4) la cellule mère du sac embryonnaire prend la voie sporophytique haploïde.

## INTRODUCTION

L'haplométhode est une des techniques visant à l'amélioration des plantes (voir schéma 1, d'après RIVES M., 1984). Elle s'inscrit assez tôt dans l'histoire (d'après MAESHWARI S.C., RASHID A., TYAGI A.K., 1982) :

- 1922 : description du 1<sup>er</sup> haploïde (BLAKESLEE et al.)
- années 1940-1950 : mise au point de quelques méthodes expérimentales pour obtenir des haploïdes (KIMBER et RILEY, 1963 NITZSCHE et WENZEL, 1977).
- 1964-66-67 : découverte d'une méthode fondamentale (GUHA et MAESHWARI) sur Datura innoxia = déclenchement et intensification de la recherche dans le monde entier
- actuellement : plus de 500 communications sur l'androgénèse concernant 171 espèces, 60 genres, 26 familles d'Angiospermes.

Chez les végétaux supérieurs, de structure généralement diploïde, l'haplométhode consiste à détourner d'une vocation sexuée des gamètes, ne portant qu'un seul stock chromosomique, par une dédifférenciation, et à leur faire prendre une voie de type sporophytique.

L'haploïdie qui s'obtient par quatre voies (voir schéma n°2), offre plusieurs intérêts (d'après DEMARLY, 1983) :

- une clarté de lecture des valeurs alléliques (mutations, recombinaisons),
- une analyse fine des nombreuses interactions entre allèles (balances internes, épistasies, combinaisons),
- une visualisation sous forme de plantes des ségrégations potentielles de l'hybride originel),
- l'obtention de lignées pures par restauration de l'homozygotie (auto doublement).

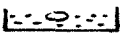

L'haplométhode ne sera abordée ici que sous l'angle de l'androgénèse. Nous essaierons de dégager, entre toutes les familles d'Angiospermes étudiées, de 1977 à 1983, ce qui caractérise les Graminées d'une part, et les Crucifères d'autre part.

Dans ce cadre, seront étudiés successivement :

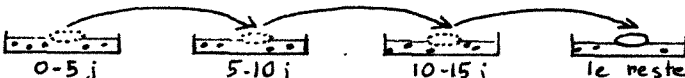
- 1) la production des plantes haploïdes via l'androgénèse.
- 2) les divers facteurs jouant sur l'androgénèse.
- 3) la transformation du grain de pollen en plante haploïde.
- 4) l'utilisation des plantes haploïdes issues de l'androgénèse.

SCHEMA 3 : les trois principales techniques d'induction des embryons de pollen

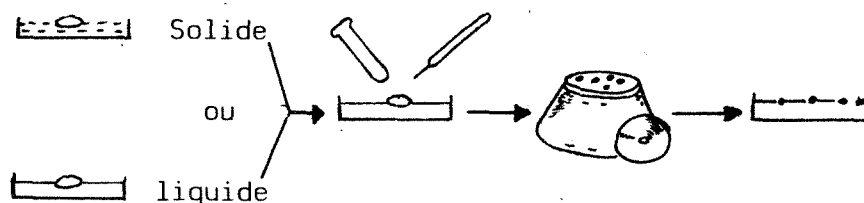
---

SIMPLE  solide ou liquide   
 les anthères sont cultivées sur de l'agar solide  
 ou en milieu liquide

CULTURE D'ANTHERES

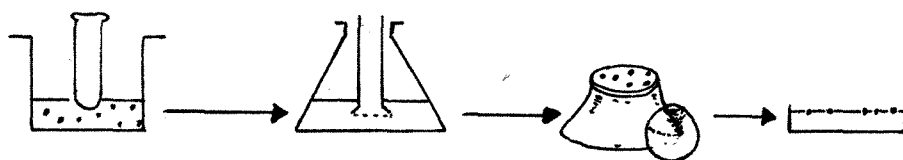
EN SERIE   
 les anthères sont transférées successivement dans  
 un nouveau milieu liquide. Dans chaque période de  
 culture, les anthères libèrent du pollen dans le  
 milieu, qui continue son développement en embryons.

CULTURE DE POLLEN  
 A PARTIR D'ANTHERES  
 PRECULTIVEES



Les anthères, précultivées sur un milieu liquide  
 ou solide, sont disséquées et pressées avec un  
 pilon sur le milieu liquide pour isoler le pollen.  
 Ce dernier peut être cultivé sur ce même milieu, ou  
 filtré et centrifugé dans un autre milieu, avant  
 d'être remis en culture.

CULTURE DE POLLEN  
AB INITIO



Le pollen est isolé sur un milieu liquide en  
 pressant les anthères, puis filtré dans un tamis  
 pour éliminer les débris d'écorce, puis lavé dans  
 le milieu par centrifugation et mis en culture.

Il existe trois principales méthodes androgénétiques, selon le degré d'affranchissement du pollen par rapport à l'anthère (voir schéma n° 3, d'après MAESHWARI et al. , 1980).

### 1.1. La culture d'anthères

Cette technique, mise au point sur Datura innoxia par GUHA et MAESHWARI ( 1964, 66), améliorée par NITSCH et WHITE (addition de jus de fruits ou de lait de coco), puis par WERNICKE et KOHLENBACH (1975-76) (milieu liquide pour favoriser la déhiscence spontanée des anthères et diminuer le contact du pollen avec l'anthère), est valable actuellement pour plus de 171 espèces.

Elle concerne en particulier toutes les céréales :

- avoine (RINES, 1983)
- Maïs (GENOVESI et COLLINS, 1982)
- Blé (DE BUYSER et HENRY, 1979 ; SCHAEFFER et al., 1979)
- Orge (KAO, 1981 ; FOROUGH-WEHR et al., 1976 ; SUNDERLAND et al., 1979).
- Riz (CHEN, 1977 ; SCHAEFFER, 1982).
- Seigle (WENZEL et al., 1977;)
- Triticale (BERNARD, PICARD et DE BUYSER, 1976 ; SOZINOV et al., 1981)

Mais aussi les crucifères :

- Moutarde (KLIMASZEWSKA et KELLER, 1983)
- Brassica juncea (GEORGE et RAO, 1982)
- Colza d'hiver (LOH, CHIANG SHIONG et INGHAM, 1982 ; LICHTER, 1982 ; HOFFMANN, THOMAS et WENZEL, 1982).

Pour tenter de diminuer l'action des inhibiteurs produits par les anthères, certaines équipes ont imaginé et expérimenté la culture d'anthères en série. Tout d'abord, SUNDERLAND et ROBERTS, en 1977, sur Nicotiana tabacum, puis SUNDERLAND et WILDON en 1979 sur Hyoscyamus Niger, et TYAGI, RASHID et MAESHWARI en 1979 sur Datura innoxia.

Cette technique a également été essayée chez le Riz (CHEN et al.

### 1.2. La culture de pollen ab initio

Cette technique a pour principe d'éviter :

- les contaminations par les proliférations et les plantules émises à partir de la paroi de l'anthere,
- les possibles inhibiteurs produits par cette dernière.

Elle permet d'apprécier la régulation de l'androgénèse.

Mise au point tout d'abord sur Datura innoxia et Petunia hybrida par NITSCH et NORREEL (1973) (2), SANGWAN et NORREEL (1975)(1)-1977), elle n'a donné que peu de résultats dans les autres recherches (SUNDERLAND et ROBERTS, 1977.).

### 1.3. La culture de pollen à partir d'anthers précultivées

Cette dernière méthode est un compromis entre les deux précédentes et permet de conserver la phase critique d'initiation de l'androgénèse.

Expérimentée sur Nicotiana tabacum (NITSCH, 1974;(2) ; REINERT, BAJAJ et HEBERLE en 1975 (1), WERNICKE et KHOLENBACH, 1977) puis sur Solanum tuberosum (WEATHERHEAD et HENSHAW, 1979) et sur Datura innoxia (TYAGI et al. 1979, 1980), elle concerne aussi une graminée, Oryza sativa (CHEN et al., 1980),.

Elle a été améliorée en séparant le pollen potentiellement embryogénétique du reste du pollen par une concentration élevée de sucrose suivie par une centrifugation, ou par une centrifugation à gradient de densité basé sur du sucrose et du Percoll : ceci, chez le seigle (WENZEL et al., 1975 (2)) et Nicotiana tabacum (WERNICKE et al., 1978).

(1) d'après MAESHWARI et al., 1982).

(2)

ESPECES	REFERENCES
<u>GRAMINEES</u>	
<u>Aegilops caudata</u> x <u>A. umbellulata</u> (P)	Kimata et sakamoto (1972)
<u>Agropyron repens</u> (PE)	
<u>Avena sativa</u> (P)	Rines (1983)
<u>Bromus inermis</u> (P)	
<u>Fertuca arundinacea</u> (P)	
<u>F. pratensis</u> (P)	Zenkter et Misiura (1974)
<u>F. pratensis</u> x <u>lolium multiflorum</u> (PE)	
<u>Hordeum vulgare</u> (P)	Clapham (1973)
<u>Lolium multiflorum</u> (P)	Clapham (1971)
<u>L. multiflorum</u> x <u>festuca arundinacea</u> (P)	Nitzsche (1970)
<u>L. perenne</u> (P)	Clapham (1971)
<u>Oryza perennis</u> (P)	Wakasa et Watanabe (1979)
<u>O. sativa</u> (P)	Niizeki et Oono (1968)
<u>O. sativa</u> x <u>O. perennis</u> (P)	Woo et al. (1978)
<u>Phleum pratense</u> (C)	
<u>Secale cereale</u> (P)	Thomas et al (1975)
<u>Secale montanum</u> (PE)	Zenkter et Misiura (1974)
<u>Setaria italica</u> (P)	Ban et al. (1971)
<u>Sorghum vulgare</u> (P)	Anonyme (1978)
<u>Triticale (6x)</u> (P)	Bernard et al. (1976)
<u>Triticale (8x)</u> (P)	Sun et al (1973), Y.Y. Wang et al; (1979)
<u>Triticum aegilopoides</u> (C)	
<u>T. aestivum</u> (P)	Guyang et al (1973), Chu et al (1973) C.C. Wang et al (1977), picard et de Buyser (1973).
<u>T. Dicoccoïdes</u> (P)	
<u>T. durum</u> (P)	Chu et al (1979).
<u>T. aestivum</u> x <u>Agropyron glaucum</u> (P)	C.C. Wang et al (1975)
<u>T. ispahanicum</u> (C)	
<u>T. monococcum</u> (C)	
<u>T. vulgare</u> (P)	
<u>T. vulgare</u> x <u>Agropyron glaucum</u> (P)	
<u>Zea mays</u> (P)	Anonyme (1975)

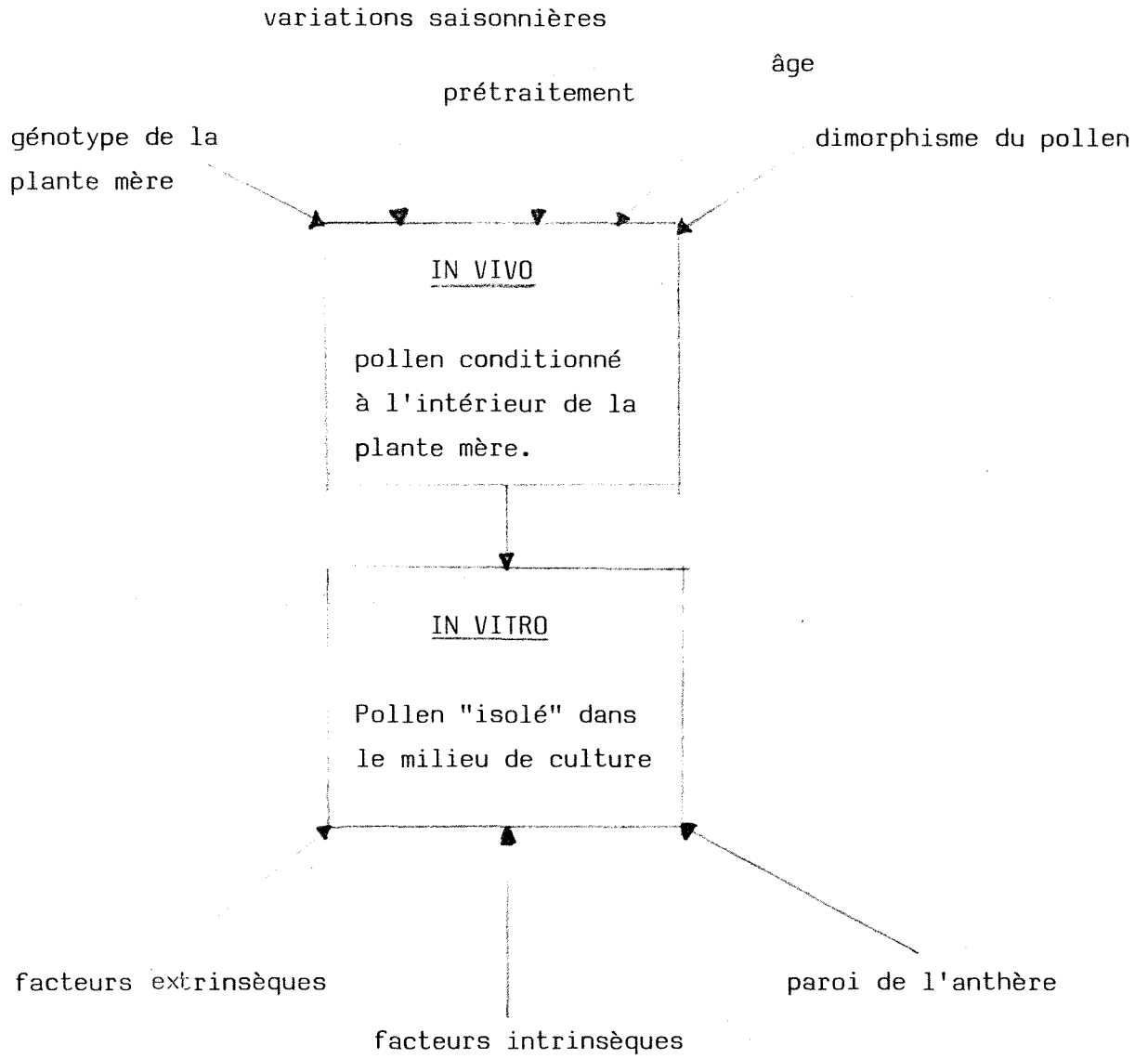
ESPECES	REFERENCES
<u>CRUCIFERES</u>	
<u>Arabidopsis griffithiana</u> (C)	
<u>A. thaliana</u> (P)	Amos et Scholl (1978)
<u>A. korshinskyi</u> (C)	
<u>A. pumila</u> (C)	
<u>Brassica campestris</u> (P)	Keller et al. (1975)
<u>B. chinensis</u> (P)	Zhong et al (1978)
<u>B. juncea</u> (P)	George et Rao (1982)
<u>Brassica napus</u> (P)	Thomas et Wenzel (1975)
<u>B. oleracea</u> (P)	Kameya et Hinata (1970)
<u>B. oleracea</u> x <u>B. albobolabra</u> (P)	Kameya et Hinata (1970)
<u>B. pekinensis</u> (P)	Teng et Kuo (1978)
<u>Iberis amara</u> (C)	
<u>Sinapis alba</u> (P)	Klimaszewska (1983)

Tableau N°1 (d'après MAESHWARI et al, 1982 et Chu, 1982)

Espèces dans lesquelles l'androgenèse a été rapportée :  
(C : obtention de cals PE : obtention d'embryons globuleux  
P : obtention d'embryons ou formation de plantes).

Seules les références des publications mentionnant les premières obtentions de plantes haploïdes figurent dans ce tableau.





SCHEMA N° 4 : DIFFERENTS FACTEURS JOUANT SUR L'ANDROGENESE

## II - DIFFERENTS FACTEURS JOUANT SUR L'ANDROGENESE

---

On peut distinguer deux types de facteurs principaux :

- des facteurs de conditionnement lorsque le pollen se trouve encore à l'intérieur de la plante - mère.
- des facteurs du milieu de culture où le pollen se trouve isolé. (voir schéma N° 4).

### 2.1. Facteurs de conditionnement

#### 2.1.1. Le Génotype de la plante-mère

La capacité du pollen à former des sporophytes haploïdes dépend beaucoup du génotype des plantes donneuses. La fréquence des plantes issues du pollen varie avec le genre, l'espèce, la sous espèce et le cultivar (voir tableau N° 1).

Ainsi, le genre *Avena* ne donnait que des cals jusqu'à l'expérience de RINES en 1983.

Pour l'espèce *Sorghum vulgare*, la production de plantes n'est possible que pour un ou quelques cultivars (ANONYME, 1978 (1)). Il en est de même pour l'espèce *Zea maïs* (GENOVESI et COLLINS, 1982).

Des recombinaisons du génomes qui favorisent l'androgenèse ont été montrées chez le seigle (WENZEL et al, 1977).

Pour l'orge, l'utilisation des génotypes hybrides montre que la formation du cal et non de la plante est affectée par le génôme maternel (FOROUGH-WEHR et al 1982).

Pour le triticales, SOZINOV et al (1981) montrent que le pourcentage de nouvelles formations varient selon les 29 génotypes étudiés, ainsi que la capacité à développer

(1) d'après CHU, 1982

des cals et des embryoïdes. BERNARD et al. (1976) supposent en outre que le caractère interspécifique du triticales, confère au pollen une aptitude aux divisions embryonnaires supérieure à celle du pollen des espèces parentes.

Pour le blé, les aptitudes androgéniques se transmettent d'un cultivar à ses hybrides F<sub>1</sub> (BULLOCK et al. 1982).

PICARD et de BUYSER (1977) ont montré chez le blé que les lignées dérivées des microspores sont plus productives en haploïdes que le témoin

Chez Brassica napus, les principaux travaux ont montré que le rendement était supérieur chez les génotypes de printemps (WENZEL et al, 1977 ; KELLER et ARMSTRONG, 1977 ; HANSSON, 1978).

Les gènes et recombinaisons modifient donc l'androgénèse (JACOBSON et SOPORY, 1978).

Mais l'histoire prouve qu'il faut se méfier des espèces dites irréductibles qui deviennent ensuite productrices de plantes haploïdes, tel Arabidopsis thaliana (AMOS et SCHOLL, 1978, après l'insuccès de GRESSHOFF et DOY, 1972).

#### 2.1.2. L'état physiologique de la plante-mère

La réponse des anthères mises en culture dépend également de la physiologie de la plante productrice de pollen. (SUNDERLAND et DUNWELL, 1977 ; MAESHWARI et al, 1980).

Cet état physiologique dépend à la fois :

- \* de l'état sanitaire de la plante : DUMAS DE VAULX insiste (conférence sur l'haplométhode à la Doua des 28 et 29 mai 1984) sur la nécessité de plantes indemnes de parasites (pucerons, champignons...).
- \* des variations saisonnières : car il existe une relation causale d'initiation florale (déterminée par la longueur du jour) et la productivité de l'anthère.

Chez les céréales, une photopériode de 16 H est souvent la règle (FOROUGH-WEHR et al., 1982, pour l'orge ; SOZINOV et al., 1981, pour le triticales...). La même photopériode est recherchée pour Brassica napus (DUNWELL et al, 1983 ; RENARD et Dosba, 1980).

Pour cette espèce, les variétés d'hiver doivent également être soumises à une vernalisation par le froid ( 4 -5 ° C

au stade 5 feuilles, pendant 8 semaines ; RENARD et DOSBA 1980). Le plus haut niveau d'embryogenèse est atteint quand les plantes-mères poussent sous des jours courts et d'intensité lumineuse élevée (haute pression de sodium chez *B. napus*, DUNWELL et al, 1983 ; 8 000 - 10 000 lux chez l'orge, FOROUGHY - WEHR, et al, 1982 ; blanche, fluorescente et incandescente  $13.5 \mu E m^{-2} . s^{-1}$  chez le maïs, GENOVESI et COLLINS, 1982.).

La température joue également un rôle important : pour le colza, les plantes-mères cultivées à des températures basses sont les plus productives, tandis que les hautes températures favorisent l'embryogenèse chez les céréales (FOROUGHY - WEHR et al, 1976).

SOZINOV et al (1981) ont montré que la formation des cals puis la régénération des plantes à partir de ces derniers sont favorisées lorsque les anthères proviennent de plantes soumises à un régime de 14 ° C la nuit et 18 ° C le jour.

L'androgénèse fait donc intervenir un dosage saisonnier de période et d'intensité, lumineuse et calorifique.

\* Du milieu de culture : L'addition constante de sel durant la croissance diminue la période végétative et affecte la floraison, dans les cultures de pollen (HEBERLE - BORS et al, 1977). C'est ce qui explique que les cultures de pollen à partir de plantes cultivées sur milieu hydroponique ne contrarient pas l'androgénèse (NITSCH, 1976). HENRY et de BUYSER (1980) estiment même que le milieu de culture a plus d'importance que la saison<sup>3</sup>.

L'application d'hormones ( CHU, 1982 ) a aussi son importance : sur Cryza sativa , l'application de l'acide 2 chloroéthylphosphonique sur les inflorescences pendant 48 H à 10 ° C augmente l'androgénèse.

Le meilleur milieu de culture pour les plantes-mères chez le triticale contiendrait de l'oxyproline (SOZINOV et al, 1981).

\* Les traitements physiques : PICARD (1973) a montré que sur le blé, la suppression de l'apex de l'inflorescence favorisait l'embryogenèse ; l'élimination régulière des vieux boutons floraux également (NITSCH, 1975) ; chez *Hordeum vulgare*, WILSON (1977) montre que les plantes coupées à ras du sol après un séjour de 1 ou 2 jours dans l'eau sont plus productives (d'après CHU, 1982).

Le plus important des prétraitements est le traitement par le froid, des boutons floraux ou des anthères, avant la mise en culture. La dose optimale de froid varie selon les cultures (voir tableau N° 2).

especes	température	durée	références
<u>Secale cereale</u>	6° C	3 - 15 jours	Nitzsche et Wenzel(1977)
	1 - 3 ° C	7 - 14 jours	Sun <u>et al.</u> (1978)
	4 ° C	1 - 14 jours	Sozinov <u>et al.</u> (1980)
<u>Hordeum vulgare</u>	3 ° C	48 heures	Bouharmont (1977)
<u>Avena sativa</u>	4 - 8 ° C	2 - 10 jours	Rines (1983).
	10 ° C	(pas d'effet significatif).	
<u>Oryza sativa</u>	10 ° C	48 heures	Wang <u>et al.</u> (1974)
	10 - 13 ° C	7 - 14 jours	Genovesi et Magill (1979)
	5 - 6 ° C	72 heures	Schaeffer (1981)
<u>Zea maïs</u>	4 - 8 ° C	3 - 14 jours	Genovezi et Collins (1982)
<u>Triticale</u>	3 - 5 ° C	72 heures	Sun <u>et al.</u> (1980)
	3 ° C	2 - 15 jours	Bernard <u>et al.</u> (1976)
<u>Triticum aestivum</u>	3 - 5 ° C	48 heures	Pan <u>et al.</u> (1975)
	4 - 5 ° C	64 heures	Schaeffer (1979).
<u>Brasica napus</u>	4 ° C	plusieurs jours	Lichter (1982)
	4 ° C	au moins 14 jours	Dunwell <u>et al.</u> (1983)
	4 ° C	moins de 4 jours	Renard et DOSBA (1980)
<u>B. campestris</u>	5 ° C	7 jours : effet négatif.	Keller <u>et al.</u> (1983)

TABLEAU N ° 2 ( d'après CHU, 1982) : diverses quantités de froid selon les espèces.

Le prétraitement au froid s'accompagne parfois d'un passage à l'obscurité (B. napus, DUNWELL et al, 1983), ou à l'humidité (B. napus, RENARD et DOSBA, 1980).

Plusieurs hypothèses d'explication à l'effet du froid ont été avancées : (d'après COULIBALY et DEMARLY, 1979) :

- . interruption de la mitose asymétrique du pollen, donnant un plus grand nombre de pollen avec 2 cellules égales en taille, à l'origine des embryons (NITSCHKE et NORREEL, 1973).
- . meilleure viabilité du pollen (DUNCAN et HEBERLE, 1976 ; SUNDERLAND, 1978).
- . Empêchement de la sénescence des anthères, inhibitrice de la production des haploïdes (PELLETIER et HENRY, 1974).

Un autre prétraitement ne doit pas être omis, celui de la désinfection des bourgeons ou des anthères, avant la mise en culture (B.napus : boutons désinfectés dans l'hypochlorite de Ca, à 3,5 %, RENARD et DOSBA, 1980).

### 2.1.3. L'âge de la plante-mère

Celui-ci est en fait corrélié avec l'âge du pollen. Tout consiste donc à définir des méthodes de description cytologique du pollen en relation avec la morphologie des plantes, des bourgeons et des anthères.

Pour Brassica napus, les bourgeons sont prélevés lorsque leur diamètre varie de 2 mm à 4 mm (DUNWELL et al., 1983 ; RENARD et DOSBA, 1980 ; LOH et INGHAM, 1982 ; LICHTER, 1981). Ce qui correspond à des longueurs d'anthères variant entre 0,25 et 0,80 mm.

Pour Avena sativa, (RINES, 1983), c'est la longueur de la première feuille engainante qui importe (5 - 10 cm.).

Pour l'orge, SUNDERLAND et EVANS (1980), ont établi une relation entre le stade de l'anthère, la longueur "interligulaire,

(c'est à dire la distance entre le ligule de la feuille enroulée et celle de la feuille immédiatement inférieure), et la formation de cals de pollen. Ce serait le stade où la vacuole est formée, mais le noyau non encore élargi à l'intérieur de la spore, correspondant à une longueur interligulaire de 140  $\mu$ m qui serait le plus favorable à la formation des cals.

Bien que les tétrades et le pollen mûr puissent donner des plantes haploïdes, les microspores uninucléées s'avèrent les meilleures productrices. Il n'y a cependant pas un seul stade optimum, même pour les espèces très proches.

Pour le riz, il s'agit de microspores situées juste avant ou à la mitose (WANG et al., 1974). Pour le blé et le maïs (KUO et al., 1978), le stade des microspores uninucléées très jeunes est plus adapté. Il en est de même pour Brassica (DUNWELL et al., 1983). Dans le cas de l'Arabidopsis, (GRESSHOFF et DOY, 1972), il s'agit de cellules déjà au stade de la méiose, d'après CHU, 1982).

#### 2.1.4. Le dimorphisme du pollen

Le dimorphisme dans la population de pollen est observé dans plusieurs espèces, à l'intérieur des anthères in vivo. Dans Hordeum vulgare, le CV Sabarlis (SUNDERLAND, 1974) et le CV Akka (DALE, 1975), il y a deux types de microspores. Ce serait les microspores de petite taille et réagissant peu aux colorants cytoplasmiques qui donneraient naissance aux embryons polliniques, d'après MAESHWARI et al., 1982).

Cette constatation chez le tabac a permis de sélectionner le pollen embryogénique par centrifugation basée sur un gradient de densité (WERNICKE et al., 1978 ; HEBERLE - BORS et REINERT, 1980 ; RASHID et REINERT, 1980, 1981), énorme avantage.

Mais les résultats contraires (WILSON et al. 1978 ; DUNWELL, 1978) montrent que le nombre de grains embryogéniques est indépendant du nombre de ces petites microspores particulières.

L'hypothèse de prédétermination de l'embryogenèse du pollen demande par conséquent d'être approfondie.

## 2.2. Facteurs du milieu de culture

Ces facteurs interviennent lors de la mise en culture du pollen, soit parfaitement isolé des anthères, soit à l'intérieur de celles-ci.

Il convient de distinguer les facteurs extrinsèques (physico-chimiques) et les facteurs intrinsèques (nutritionnels). Un facteur tout particulier réside dans la paroi de l'anthère.

### 2.2.1. Facteurs extrinsèques.

Il s'agit du support, de la manipulation, de la densité d'anthères, de la lumière, de la température, de l'atmosphère et du PH.

#### \* Support :

Jusqu'au début des années 70, le support d'agar était classique dans la culture d'anthères. Mais les chercheurs (WERNICKE et KOHLENBACH sur Nicotiana tabacum en 1976, TYAGI et al. sur Datura innoxia en 1979) se sont aperçus qu'un support liquide était plus favorable à l'androgenèse, en diluant l'effet inhibiteur possible de la paroi de l'anthère, et en supprimant celui de l'agar lui-même. LICHTER (1981), montre l'intérêt du support liquide dans le cas de Brassica napus. KEATHLEY et SCHOLL (1982), montrent l'avantage du milieu liquide sur le rendement et la qualité des produits de régénération d'Arabidopsis thaliana. CHEN et al. (1980) ont aussi observé quelques divisions dans le pollen expulsé des anthères de riz cultivées en milieu liquide.

Pour l'orge, KAO (1981) montre qu'il est possible de produire des plantes à partir de pollen d'anthères cultivées sur milieu liquide, en empêchant les cals de sombrer, plus lourds que les anthères, et de mourir asphyxiés au fond des récipients, grâce à l'addition de Ficoll.

Une méthode particulière, utilisant à la fois les deux types de support a été expérimentée avec succès par JOHANSSON et al. (1982).



\* Manipulation, densité d'anthères, atmosphère du récipient de culture :

La manière de positionner les anthères sur le milieu solide a été surtout étudiée chez les Solanacées (SOPORY et MAESHWARI, 1976)<sup>(1)</sup> ainsi que l'importance de l'atmosphère du récipient de culture (DUNWELL, 1979 ; JOHANSSON et al., 1982). Le nombre d'anthères cultivées par récipient a un rôle reconnu chez le riz (FOULETIER, 1974)<sup>(1)</sup> et quelques Rosacées (MICHELLON et al., 1974).<sup>(1)</sup>

Chez l'orge, KAO (1981), montre que l'utilisation de récipients de diamètre plus petit permet une tension superficielle plus favorable à la flottaison des cals de pollen.

Mais ces facteurs ne semblent pas être majeurs dans les préoccupations des chercheurs qui étudient l'androgenèse chez les céréales et les crucifères. SOZINOV et al. (1981), par ailleurs, montre chez le triticale que la section du filet immédiatement à la naissance de l'anthère provoque une induction accrue de la formation de cals.

\* Lumière :

C'est un facteur qui ne semble pas nécessaire au phénomène d'induction de l'androgenèse pour lui-même, mais son influence sur la croissance après l'induction a été retenue chez beaucoup de plantes. Une lumière de faible intensité est nécessaire pour éviter l'étiollement des plantes en développement.

Mais dans ce domaine, les résultats sont souvent contradictoires selon des diverses espèces étudiées. Une lumière continue est défavorable à la production d'embryons de pollen triticale (BERNARD, 1980). Pour le maïs (GENOVESI et COLLINS, 1982), l'alternance de nuit et de jour (12 H à  $101,25 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) est favorable au développement des embryoïdes provenant d'anthères ayant été soumises à 2 semaines d'obscurité puis une lumière fluorescente et incandescente de  $13,5 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

(1)(d'après MAESHWARI et al., 1982)

Pour le riz également (SCHAEFFER, 1982), l'obscurité pendant 8 jours suivie d'une lumière continue fluorescente, blanche et froide, de  $100 \mu\text{E m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  favorise l'induction puis la production de cals et d'embryoïdes. KAO (1981), chez l'orge, induit la formation de cals par une lumière faible (moins de 50 lux durant 9 heures par jour) discontinue, et constate que les cals ne supportent pas une lumière trop élevée (1000 lux). RINES, (1983), fait succéder à 4 ou 6 semaines d'obscurité des photopériodes de 12 heures par jour de lumière de faible intensité ( $10 \mu\text{E m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) pour ses cultures d'anthères d'avoine.

RENARD et DOSBA, (1980), font eux aussi succéder une période d'obscurité de 14 jours puis une lumière continue de 3000 - 5000 lux pour la culture d'anthères de colza.

Peu d'études ont été menées en ce qui concerne la qualité de la lumière. Seule a été constatée l'action inhibitrice de la lumière rouge sur l'embryogenèse du pollen de Datura (SOPORY et MAESHWARI, 1976 : d'après MAESHWARI et al, 1982).

\* Temperature :

Les études récentes montrent que les besoins thermiques sont complexes et varient beaucoup selon les espèces.

Chez Brassica une forte température initiale (30 ° C pendant les 14 premiers jours de culture pour B. napus ; 35 ° C pendant 1 à 3 jours pour B. campestris) suivie de 25 ° C le reste du temps de culture, tel est le processus le plus favorable à la production de plantules haploïdes (KELLER et ARMSTRONG, 1978-1979). Chez le blé, les anthères cultivées à 30 ° C produisent toujours plus de cals de pollen qu'à 20 ° C ou des températures plus basses (HO et al, 1978).<sup>(1)</sup> Cependant, chez le riz, si l'induction des cals est favorisée par une forte température (30 ° C) il y a corrélativement plus d'albinos formés (WANG et al. 1978).<sup>(1)</sup>

\* PH :

KAO, (1981) montre chez l'orge, qu'une culture prolongée de cals entraîne leur mort, car ils provoquent une chute du PH de 5,5 à 4,5. Mais le PH reste un facteur beaucoup moins considéré que les précédents.

(1)(d'après CHU, 1982).

### 2.2.2. Facteurs intrinsèques

Il s'agit des principaux éléments nutritionnels qui modifient l'androgénèse.

#### \* Composition du milieu de base :

Son importance a été reconnue très tôt d'après MAESHWARI et al (1982). Le milieu H de NITSCH (NITSCH et NITSCH, 1969) a été utilisé avec succès dans la culture d'anthères des Dicotylédones. Pour les céréales, les premières études ont été menées sur les milieux M.S. (MURASHIGE et SKOOG), MILLER, ou L.S. (LINSMAIER et SKOOG).

Plus tard, les fortes concentrations en ammonium pouvant inhiber la formation des cals de pollen pour l'orge et le riz, CHU et al. (1975) mirent en place N 6, reconnu maintenant comme le plus efficace dans les cultures d'anthères de riz et des autres céréales (CHU, 1978 ; GENOVESI et MAGILL, 1979 ; SUN et al., 1980 ; NITZSCHE et WENZEL, 1977 ; KUO et al., 1978 ; ANONYME, 1977)(d'après CHU, 1982).

Il reste que, dans le cas particulier de la conservation des microspores par congélation, chez le riz, le milieu de MILLER est le plus favorable (COULIBALY et DEMARLY, 1979).

Il existe d'autres milieux qui font aussi leurs preuves. C'est le cas d'un milieu simplement constitué d'extrait aqueux de pomme de terre à 20 %, mis au point pour le riz et le blé (ANONYME, 1976 b, 1977).

Il donne des résultats bien meilleurs que le milieu M.S., mais avec des variations expérimentales dues aux cultivars de pomme de terre et à leur stade physiologique. Pour réduire ces écarts, CHUANG et al. (1978) ont amélioré ce milieu en y ajoutant des éléments majeurs, des sels de fer et de la thiamine (d'après CHU, 1982).

C'est le cas aussi d'un autre milieu, Y.P. (YU PEI) caractérisé par une forte concentration en sucrose, la présence de charbon activé et d'azote organique (hydrolysate de caséine), qui convient bien au maïs (GENOVESI et COLLINS, 1982).

C'est encore le cas du milieu B 5 de GAMBORG (1968), pour l'orge (COSSETTE et PAUZE, 1983), ou le triticales (SOZINOV et al., 1981), ou de ce même milieu modifié par KELLER pour B. napus (RENARD et DOSBA, 1980).

Une expérience particulière montre que l'androgenèse chez l'orge peut aussi bien être induite par un milieu de composition adaptée ou sur des tissus vivants de différentes espèces (feuilles ou cals) (ZENKTELER et STEFANIAK, 1982).

Dans ces milieux de base, certains éléments ont retenu l'attention des chercheurs, comme les hormones, le sucrose, le charbon de bois, etc...

\* Hormones :

Les hormones du milieu ont été très tôt reconnues comme des facteurs fondamentaux dans la formation des embryons et des cals.

Tandis que la kinétine ou d'autres cytokinines sont nécessaires à l'induction des embryons de pollen dans beaucoup d'espèces de Solanacées sauf le tabac (SOPORY et al., 1978), c'est l'auxine, en particulier le 2,4 D qui peut jouer ce rôle, en stimulant fortement la production des cals chez les céréales (CHU et al., 1978)<sup>(1)</sup>. Dans un second temps, par contre, pour la régénération des plantes à partir des cals, une cytokinine et une moindre concentration d'auxine sont souvent nécessaires (NITZSCHE et WENZEL, 1977).

Mais sur le riz et le blé, la différenciation des plantes est aussi bonne sur des milieux pourvus ou dépourvus en hormones (CHU et al., 1976)<sup>(1)</sup>.

Chez le triticales, CHIEN et KAO (1983) montrent que la benzyladénine a une action supérieure à celle de la kinétine et à fortiori de la zéatine dans la formation des cals.

Pour Arabidopsis thaliana, KEATHLEY et SCHOLL (1982) montrent que l'auxine de marque "Tordon" (acide 4 - amino - 3,5,6 - trichloropicolinic) est plus efficace que le 2,4 D classique et à fortiori que l'A.N.A. dans l'induction de la formation des cals, sur milieu liquide. Il en est de même pour la

(1)(d'après CHU, 1982).

Kinétine, par rapport à la N 6 benzyladénine.

Pour Brassica, la régénération de plantes normales peut avoir lieu à partir d'explants d'hypocotyles de plantules anormales sur un milieu complétement en ANA et ABA (GEORGE et RAO, 1982). LICHTER (1982) obtient directement des embryons et des plantes haploïdes sur un milieu contenant 0,5 mg/l d'ANA et de 6 - BAP. en particulier.

\* Sucrose :

C'est la source la plus efficace d'hydrate de carbone. Dans la plupart des espèces étudiées, les meilleurs résultats ont été obtenus avec une concentration de sucrose de 2 - 3 %. C'est le cas du riz (CHU, 1978).

Cependant, des concentrations plus élevées, de 6 à 12 % ont montré leur intérêt pour d'autres espèces comme le colza, le blé, le triticale et l'orge (KELLER et al., 1978 ; CHU et al., 1978<sup>(1)</sup>; SUN et al., 1980<sup>(1)</sup>; CLAPHAM, 1977).

Pour le maïs, les meilleurs résultats ont été obtenus sur un milieu contenant 12 à 15 % de sucrose (MIAO et al., 1978<sup>(1)</sup>; KU et al., 1978)<sup>(1)</sup>

Pour certaines autres plantes, comme Brassica campestris (KELLER et al., 1979), il est recommandé de cultiver les anthères sur un milieu initial très riche en sucrose, puis de les transférer sur des milieux moins concentrés plus favorables à la croissance post-induction.

D'autres sources carbonées ont été essayées, dans certains cas = le glucose chez le seigle et le colza (WENZEL et al., 1977) ou le fructose, beaucoup moins efficace (KELLER, 1978). LICHTER (1982) montre l'intérêt chez Brassica d'un milieu riche en saccharose.

Le rôle osmorégulateur du sucrose qui peut être avancé (BINDING, 1972)<sup>(2)</sup> est controversé par l'addition du mannitol dans le cas de Solanum tuberosum (SOPORY, 1980).

(1)(d'après CHU, 1982).

(2)(d'après MAESHWARI, 1982).

\* Charbon de bois activé :

Il s'avère bénéfique dans les cultures d'anthères de colza, de maïs, de triticale et de seigle (WENZEL et al., 1977 ; MIAO et al., 1978<sup>(1)</sup> ; SUN et al., 1980<sup>(1)</sup> ; GENOVESI et COLLINS, 1982). Il aurait un rôle d'absorption des composants inhibiteurs présents dans l'agar ou dans la paroi de l'anthère sénescence (KOHLENBACH et WERNICKE, 1978), ou dans le milieu lui même, dus à la dégradation du sucrose peut-être (WEATHERHEAD, BURDON et HENSHAW, 1978).

Cependant, le charbon de bois activé pourrait aussi adsorber des hormones ou d'autres composants utiles, et il faut l'utiliser avec prudence (WEATHERHEAD et al., 1978 ; HEBERLE-BORS, 1980).

Le polyvinylpyrrolidone s'est avéré récemment être un nouvel adjuvant intéressant pour la culture d'anthères sur Datura innoxia (TYAGI et al., 1981) ; il adsorberait des substances inhibitrices (phénoliques) produites par les anthères.

\* Autres composés organiques

SOZINOV et al (1981) montrent que les acides aminés jouent un rôle considérable dans l'induction des cals de pollen de seigle (la proline surtout) puis la régénération des plantes (l'oxyproline surtout). L'addition de glutamine (KELLER et al., 1978 ; SUNDERLAND et ROBERTS, 1977 ; COULIBALY et DEMARLY, 1978 ; SOZINOV et al., 1981 ; SHIMADA, 1981 ; SCHAEFFER et al., 1979), de myoinositol, d'acide aspartique et de glutathion (WENZEL et al., 1977) dans un milieu de culture stimulerait l'embryogenèse. Le glutathion aurait un effet sur le processus de désintoxication (MEISTER, 1975). Le rôle de la sérine a été remis en question par WERNICKE et KOHLENBACH (1977) et HORNER et PRATT (1979).

L'asparagine a récemment montré son efficacité dans l'embryogenèse (WEATHERHEAD et HENSHAW, 1979).

(1) d'après CHU, 1982.

Mais il a été possible de supprimer le rôle de la glutamine et de l'asparagine dans la culture de pollen de tabac en augmentant simplement le pH du milieu à 6,8 (RASHID et REINERT, 1981).

Par ailleurs, une augmentation trop lente de la concentration des acides organiques ralentirait la formation de cals polliniques (CHIEN et KAO, 1983) de triticales.

D'autres extraits naturels variés ont été expérimentés, comme des hydrolysates de caséine et de lactalbumine (PAN et al., 1978 ; C.H. CHEN et al., 1980<sup>(1)</sup> ; SCHAEFFER et al., 1979). L'hydrolysate d'acides nucléiques (CHU et al., 1973<sup>(1)</sup>) ; d'extrait de levure (C.C. WANG et al., 1974<sup>(1)</sup>) ; de l'extrait de pomme de terre (ANONYME, 1976 b<sup>(1)</sup>) de BUYSER et HENRY, 1980) ; des anthères broyées.

### 2.2.3. Paroi de l'anthère

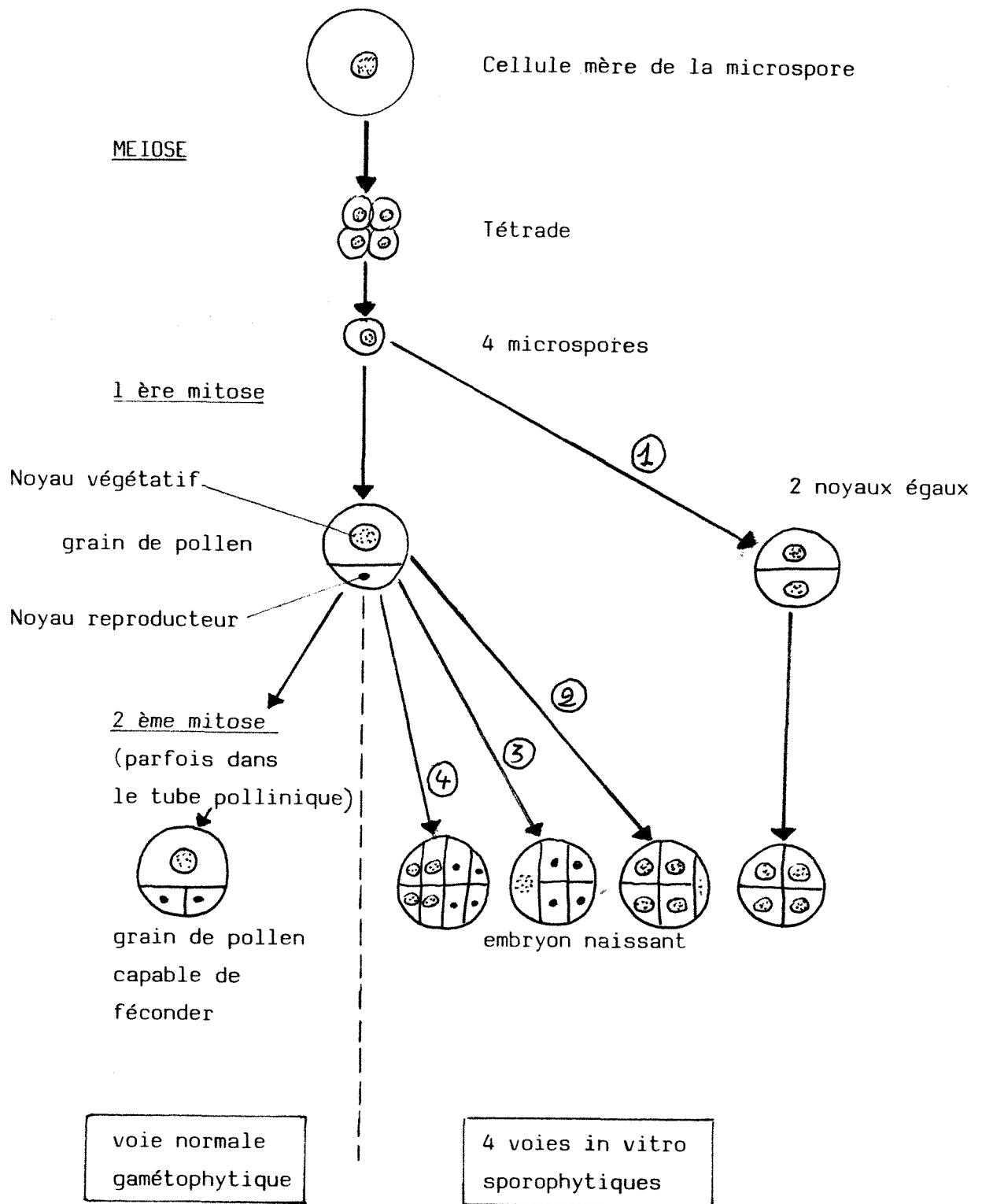
La culture de pollen isolé donne de moins bons résultats que celle de toute l'anthère. Cela traduit le rôle important de la paroi de l'anthère. Cependant, des hypothèses précises sur ce rôle ne sont apparues que récemment dans la littérature. La paroi de l'anthère aurait à la fois un rôle stimulateur, au début de la culture d'anthère, et un rôle inhibiteur par la suite.

Ainsi, les résultats sont meilleurs quand le pollen est isolé à partir d'anthères précultivées, ou quand des extraits d'eau bouillie d'anthères cultivées sont ajoutés à des cultures de pollen isolés. (NITSCH et NORREEL, 1973). Ces extraits comporteraient des acides aminés comme la glutamine, dont la concentration augmente normalement dans le milieu de culture des anthères (HORNER et PRATT, 1979).

Par contre, les cultures continues d'anthères sur le même milieu donnent de moins bons résultats que les cultures en série, sur des milieux renouvelés (TYAGI et al., 1979), ainsi que des cultures d'anthères vieillissant rapidement (MII, 1980).

Il reste à préciser la nature des facteurs qui inhibent ou stimulent l'embryogenèse.

\* (1) d'après CHU, 1982.



SCHEMA N ° 5 : LES DIFFERENTS MODES DE DIVISION DU POLLEN



### III - TRANSFORMATION DU POLLEN EN PLANTE HAPLOIDE

---

Elle résulte du fait que, mis en culture, le pollen se détourne de sa voie gamétophytique normale pour une voie sporophytique. Pour essayer de comprendre le mécanisme qui entraîne la production d'embryons, on peut l'analyser selon divers points de vue : cytologique, cytochimique et ultrastructurel.

#### 3.1. Les quatres voies cytologiques théoriques :

Théoriquement, l'on peut considérer quatres modes de division du pollen (voir schéma N° 5) :

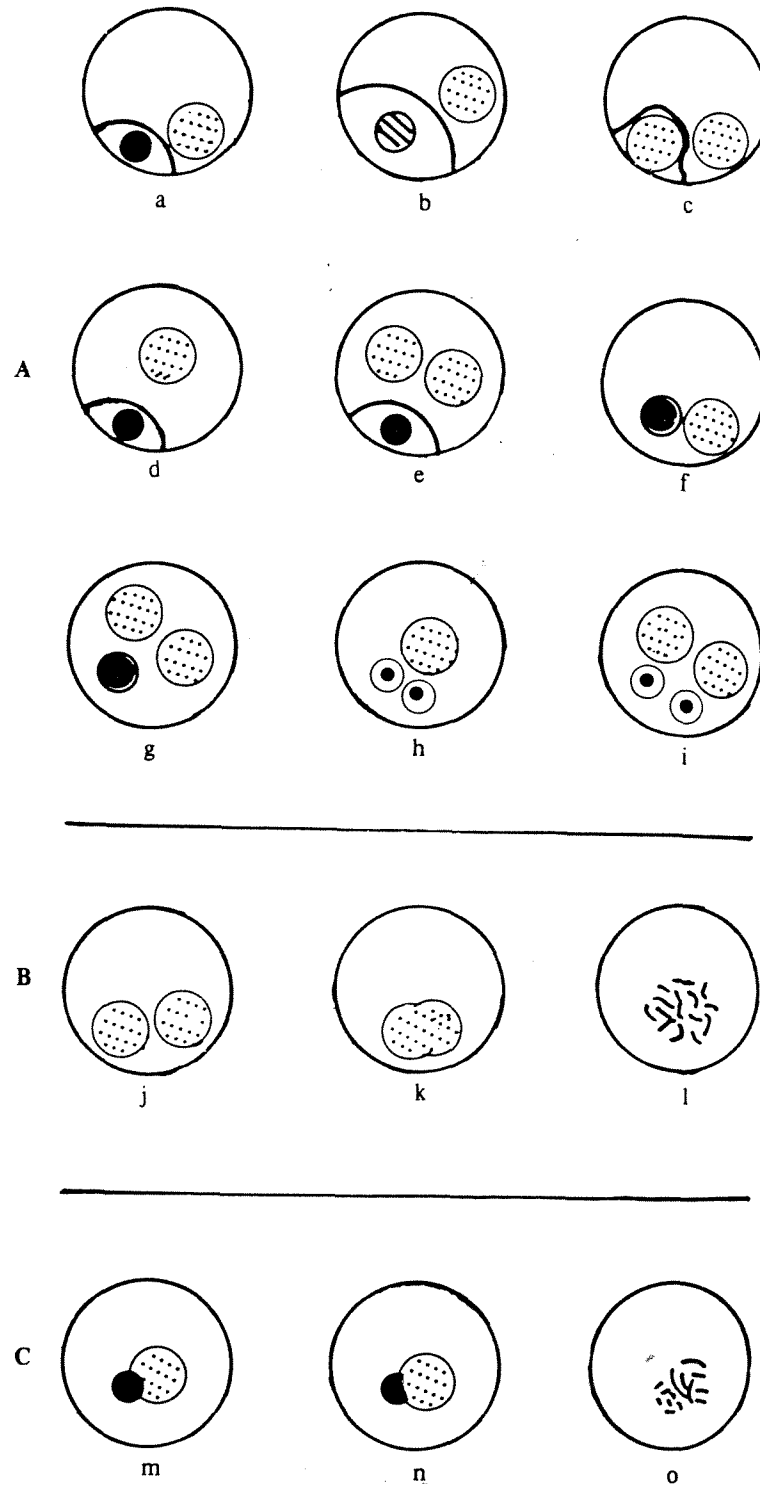
- 1 . La mitose du noyau de la microspore donne directement deux cellules égales ou presque, dont l'une seule, ou les deux participent à la formation de l'embryon.
- 2 . Le processus normal de division entraîne la formation d'une petite cellule reproductrice et d'une grosse cellule végétative, mais c'est cette dernière seule qui développe un embryon.
- 3 . L'embryon se développe à partir de la cellule reproductrice.
- 4 . A la fois les deux cellules reproductrice et génératrice participent au développement de l'embryon.

#### 3.2. L'approche cellulaire explicative :

En fait, pour la plupart des plantes, c'est le stade uninucléé qui s'est avéré le plus intéressant pour l'androgenèse. Ce qui conduit à penser que la 1 ère voie est la plus fréquente. Cela a été vérifié pour les céréales (SUN, 1978).

La voie ② (chemin A dans leur classification) serait la plus fréquente pour Nicotiana tabacum (SUNDERLAND et al.).

La voie ③ conviendrait mieux à Hyoscyamus niger (RAGHAVAN, 1976).



SCHEMA N ° 6 : LES DIVERSES POSITIONS DES NOYAUX DANS LES TYPES A B et C DU POLLEN

Le noyau végétatif est grisé.

Le noyau reproductif est noir.

(d'après SUNDERLAND et EVANS, 80).

SUNDERLAND et EVANS (1980) montrent l'existence chez l'orge de trois chemins possibles, selon les dispositions des noyaux à l'intérieur du pollen (voir schéma N° 6) :

\* Le chemin A : La cellule végétative seule est soumise à :

- soit des divisions haploïdes inégales,
- soit des divisions synchrones accompagnées de fusions et de la formation d'une paroi, donnant des unités non haploïdes et mixaploïdes.

Le noyau reproducteur meurt ou fusionne avec le noyau végétatif avant ou après ces divisions.

\* Le chemin B : La microspore, sans cellule reproductrice dès le départ, donne des éléments diploïdes binucléés ou bicellulaires avec une paroi transverse.

\* Le chemin C : Une première fusion des noyaux reproducteur et végétatif entraîne la formation d'éléments diploïdes du même style que dans le chemin B.

Les éléments bicellulaires sont l'objet de divisions anarchique ; mais parfois, les deux cellules se divisent synchroniquement et donnent des embryons.

Les éléments binucléés engendrent des éléments de plus haute ploïdie avec ou sans paroi.

Les mêmes auteurs confirment l'hypothèse des chercheurs quant aux deux voies privilégiées d'obtention de cals de pollen, les voies A et B (CLAPHAM, 1977 ; BOUHARMONT, 1977 ; WILSON et al. 1978).

Ils montrent que le grain de pollen doit être initialement segmenté pour s'orienter vers un développement sporohytique, et que le point de contrôle de cette orientation se situe dans l'interphase G 1. Avant ce point, la culture d'anthères consiste en la formation d'une cellule reproductrice morphologiquement fonctionnelle, dont les divisions très caractéristiques engendrent des composés embryogéniques. Tandis que la cellule végétative a un

comportement de type endosperme, entraînant des divisions nucléaires libres et une augmentation rapide la ploïdie.

Ce qui aboutit à deux sortes d'unités bicellulaires au stade 2 de l'anthere (interphase G 1, selon SUNDERLAND et EVANS, 1980).

- des unités chimériques organisées avec des composants reproducteur et végétatifs qui diffèrent en ploïdie.
- des unités inorganisées qui diffèrent elles aussi en ploïdie, mais dérivées seulement de la cellule végétative.

Il existe en réalité des complications, lorsque la cellule reproductrice, formée après le point de contrôle, croît de manière inorganisée ; ou lorsque la cellule végétative, formée avant ce point, manifeste un comportement embryogénique.

Par ailleurs, ces auteurs montrent que la principale cause de l'augmentation de ploïdie est la fusion nucléaire, et non l'endoreduplication (BOUHARMONT, 1977), ou la restitution nucléaire sans mitose (WILSON et al. 1978) - pour le blé, par contre, RAQUIN et al. (1982), il s'agirait d'une endoreduplication précédant la première division embryonnaire dans la microspore uninucléée - selon eux, les cals sont issus, non pas de masses cellulaires complètement inorganisées, mais de structures comportant des centres de croissance parfaitement organisés. Ces centres de croissance sont de ploïdies différentes et proviennent soit de la cellule reproductrice, soit de la fusion des produits de deux cellules gamitophytiques. Cette origine multiple peut expliquer les diverses ploïdies rencontrées dans les plantules issues des cals de pollen.

Les difficultés d'explication du phénomène de l'induction androgénétique sont rattachées à celles qui rejoignent l'étude de l'ultrastructure. L'équipe de SUNDERLAND montre chez Nicotiana tabacum que l'embryogenèse induirait une dégradation du cytoplasme originel déposé entre les lysosomes et les autres composants cytoplasmiques lorsque la phase sporophytiques est commencée (SUNDERLAND et DUNWELL, 1977). Cependant, les mêmes chercheurs trouvent qu'un tel changement n'intervient pas chez Datura innoxia, bien que certains grains de pollen prennent le chemin A.

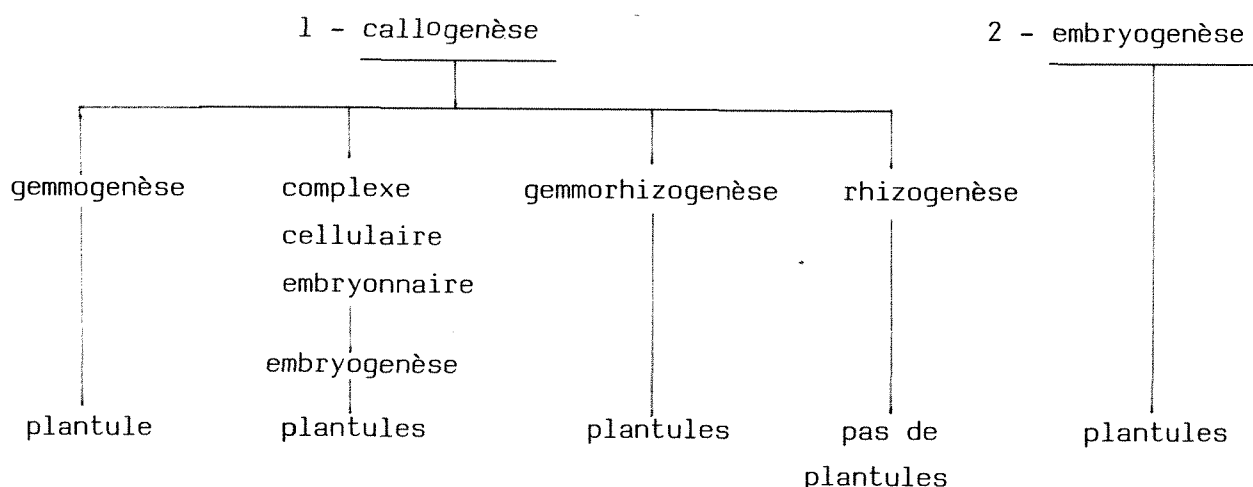
Chez l'orge, la fusion s'avérant possible entre les cytoplasmes et même les noyaux des deux cellules gamitophytes, et l'absence d'une barrière physique apparente entre les deux, suggérerait l'existence d'un seul cytoplasme, et des différences de densité cytoplasmiques à l'intérieur de la spore (voie C). Ces différences cytoplasmiques joueraient un rôle dans la construction des phragmoplastes ; ce serait lorsque le noyau végétatif se divise dans une position adjacente à la cellule reproductrice et lorsque la densité cytoplasmique est maximale que la formation du phragmoplaste serait la plus facilitée (SUNDERLAND et DUNWELL, 1980)

Par ailleurs, l'hypothèse selon laquelle le développement sporophytique ne peut se faire dès lors que de l'amidon commence à se déposer dans les jeunes gamétophytes n'est pas vérifiée, ni chez le tabac (SUNDERLAND, 1978 - 1979), ni chez l'orge (SUNDERLAND et DUNWELL, 1978)

Enfin, la synthèse de l'ARN a été étudiée grâce à l'autoradiographie avec de l'uridine radioactive chez Hyoscyamus niger par RAGHAVAN (1979). Elle s'avère importante dans la cellule reproductrice durant l'embryogenèse. L'utilisation d'un inhibiteur l'actinomycine révèle que le grain de pollen est déterminé embryologiquement dès la première heure de culture.

### 3.3. Les différentes voies morphogénétiques

SOZINOV et al., (1981), les résumant par le schéma suivant, lorsque les masses cellulaires échappées par rupture de l'exine du pollen au bout de 3 - 10 semaines forment les cals ou les embryoïdes :



Ils montrent l'intérêt des embryoïdes dans la rapidité d'obtention de plantes à partir de cultures d'anthères de triticales. De plus l'on n'obtient pas de chimères et l'on réduit l'effet mutagène des facteurs de culture.

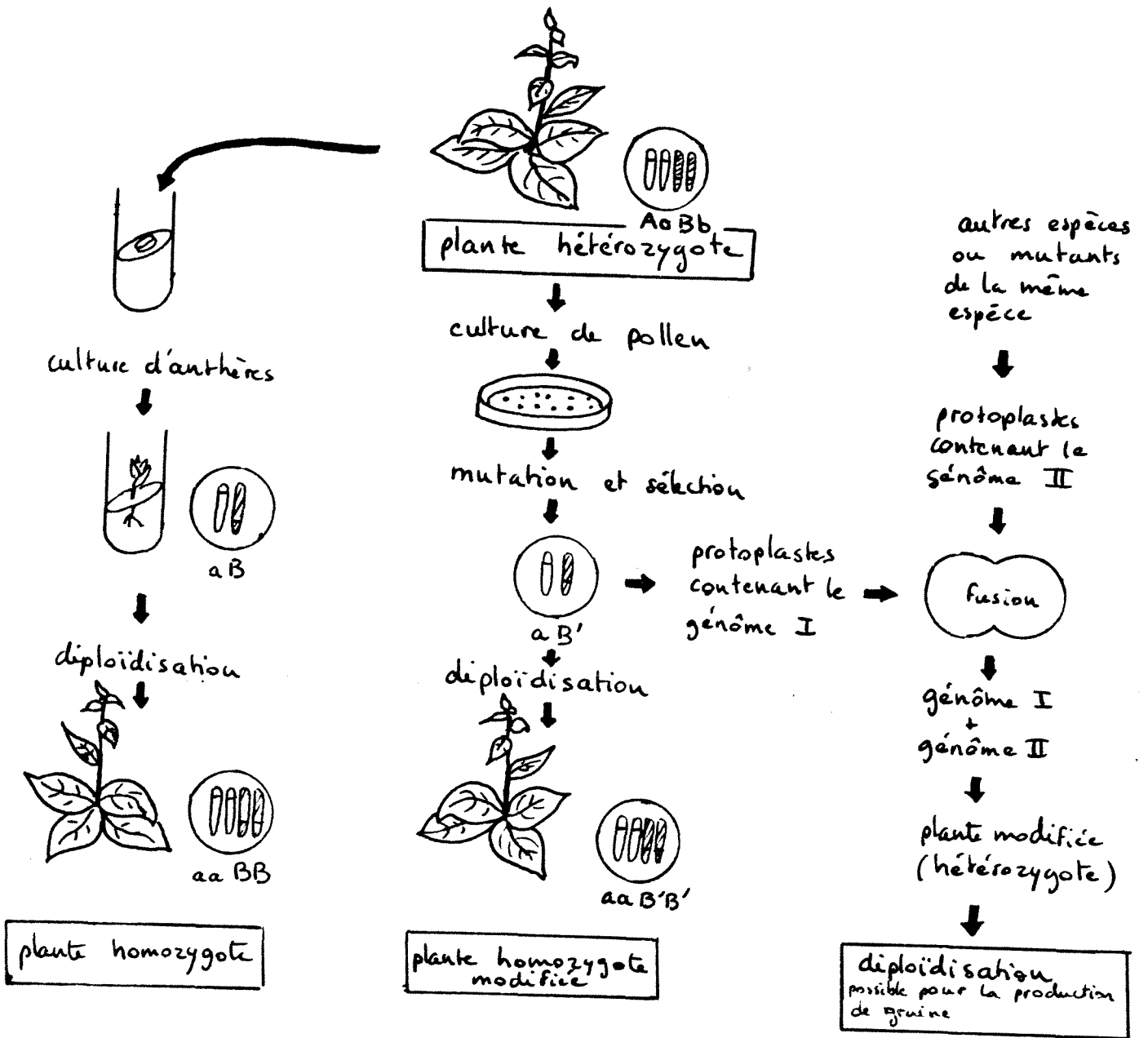
Cependant, il est bien souvent nécessaire de passer par des cals chez les céréales, car l'embryogenèse directe est plus rare, même si elle est préférable.

Par ailleurs, SOZINOV et al. (1981), montrent que les haploïdes permettent de révéler une variété surprenante de différents caractères morphologiques : taille, adaptation, forme et tallage chez le triticales hexaploïde ; forme de l'épi, taille, largeur de la feuille, grosseur de la paille et degré de pubescence, chez le triticales octoploïde.

#### 3.4. Le problème des plantes albinos :

Les albinos sont un phénomène classique pour les plantes obtenues à partir du pollen des Graminées. Leur fréquence varie de 5 à 90 % selon les cultivars et la température de culture. Quand celle-ci croît, on obtient plus d'albinos (WANG et al., 1977 ; d'après CHU, 1982 ; BERNARD, 1980). Les autres facteurs cultureux in vitro ne semblent pas avoir d'influence.

La cause de l'albinisme n'est pas encore trouvée. Les plantes albinos, contenant des plastes (CLAPHAM, 1973, SUN et al., 1974), ne peuvent provenir de cellules mères sans plastes. Peut-être l'absence d'ARN 23S et 16S, et d'une fraction protéique dans ces plantes montre-t-elle que l'albinisme est dû à une modification de l'ADN (SUN et al., 1978) ; ou bien un pollen avec une aberration chromosomique en serait la cause (CHU et al., 1978) ; ou encore la mauvaise réorganisation des plastes après la régression des protoplastes durant la méiose (NILSON-TILGREN et von WETTSTEIN-KNOWLES, 1970) ; ou enfin des facteurs physiologiques agissant in vitro (BERNARD, 1980). (d'après CHU, 1982).



SCHEMA N ° 7 : UTILISATION DES CULTURES D'ANTHERES ET DE POLLEN

Les haploïdes offrent un intérêt très grand en ce qui concerne la génétique, à la fois dans le domaine appliqué (sélection) et le domaine fondamental (recherche). (voir le schéma N ° 7 , d'après MAESHWARI et al., 1982).

#### 4.1. Obtention d'haploïdes doublés

Les plantes ou les tissus haploïdes sont souvent utilisés comme tels, car l'haploïdie est intéressante quand l'état hémizygote simplifie l'observation ou l'identification des caractères contrôlés par des facteurs génétiques récessifs. Cependant, la plupart des haploïdes sont stériles et la maintenance de la lignée haploïde, ou la production de graines et la manipulation génétique plus poussée de la lignée, nécessitent l'établissement de l'état diploïde.

Il existe trois méthodes différentes de doublement des haploïdes :

\* La première, la diploïdisation spontanée, concerne un faible pourcentage de plantes ou de fragments de plantes haploïdes qui retournent spontanément à l'état diploïde. Cela peut-être obtenu chez le seigle (WENZEL et al., 1977 ) lors d'une absence de réduction du pollen. Mais ce phénomène ne serait pas de règle chez le blé (OUYANG et al., 1973), d'après CHU, 1982.

Cela peut provenir également du milieu de culture. Les chercheurs (HENRY et de BUYSER, 1979 ; AMSSA, 1980 ), montrent pour le blé qu'un milieu qui accélère la sortie des embryons, les divisions embryonnaires évite en partie cette diploïdisation, car ils supposent que le doublement se produit durant les premiers jours de culture.

Le prétraitement au froid (HU communication personnelle à HENRY et de BUYSER, 1979 ; AMSSA, 1980) des épis à 3°C durant



3 à 5 jours accroît le taux de diploïdes spontanés de 22 à 40 %. L'augmentation de la durée, par contre, n'a pas d'effet au-delà de 3 jours.

En outre, chez le colza, KELLER et ARMSTRONG (1978), montrent l'influence de la température de culture. Ils obtiennent uniquement des diploïdes, triploïdes, tétraploïdes etc..., à 25 ° C, mais par contre 22 % d'haploïdes après un début de culture à 30 ° C. En outre, l'élagage, la taille des plantes haploïdes serait aussi facteur de doublement (COLLINS, 1977).

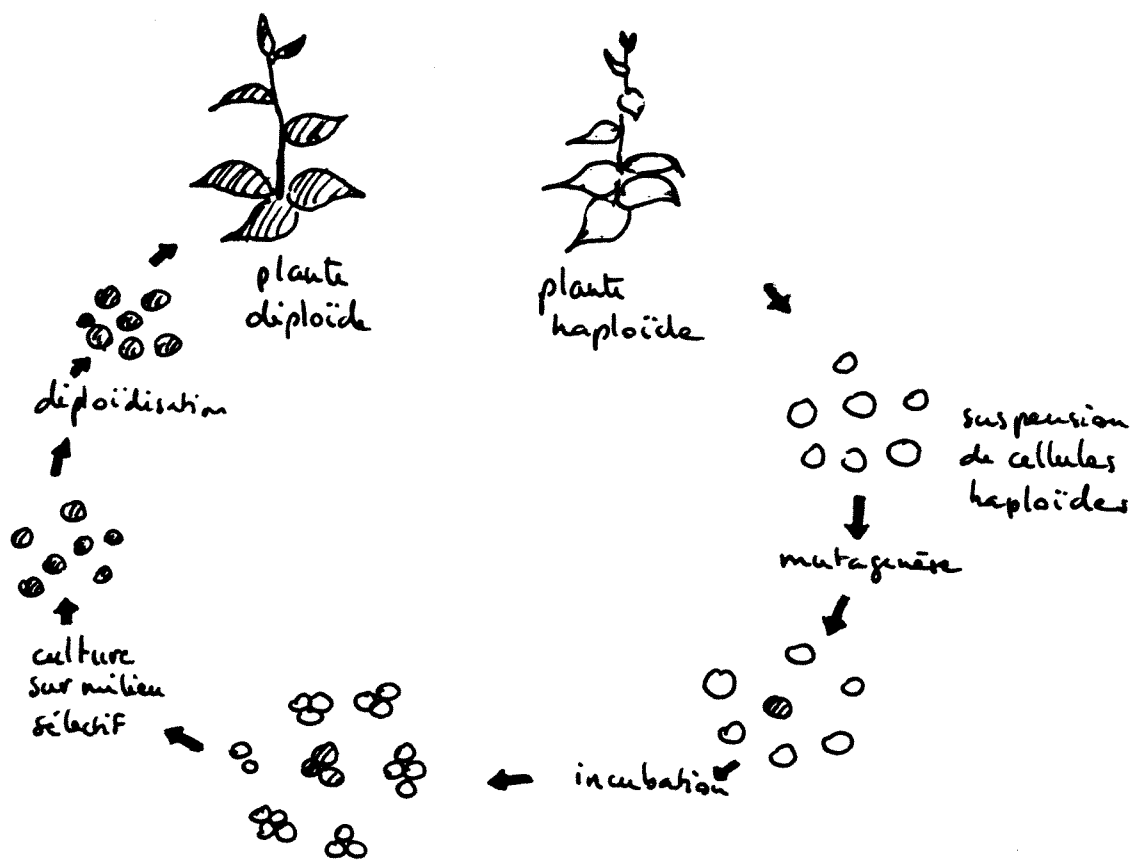
- \* La seconde méthode consiste à utiliser de la colchicine, qui empêche la migration bipolaire des chromosomes lors de la mitose. Il existe diverses techniques dans ce domaine. HENRY et de BUYSER (1979) montrent la complémentarité de 2 techniques, selon le nombre de talles obtenus dans un traitement aseptique ou en serre.
- \* La troisième méthode consiste à cultiver des cals de feuilles, de tiges ou de racines de plantes haploïdes (KASPERBAUER et COLLINS, 1972 , d'après COLLINS, 1977.

Les critères d'utilisation des haploïdes doublés sont (d'après DUMAS de VAULX, conférence des 2 - 3 mai 1984 à la Faculté de la Doua.

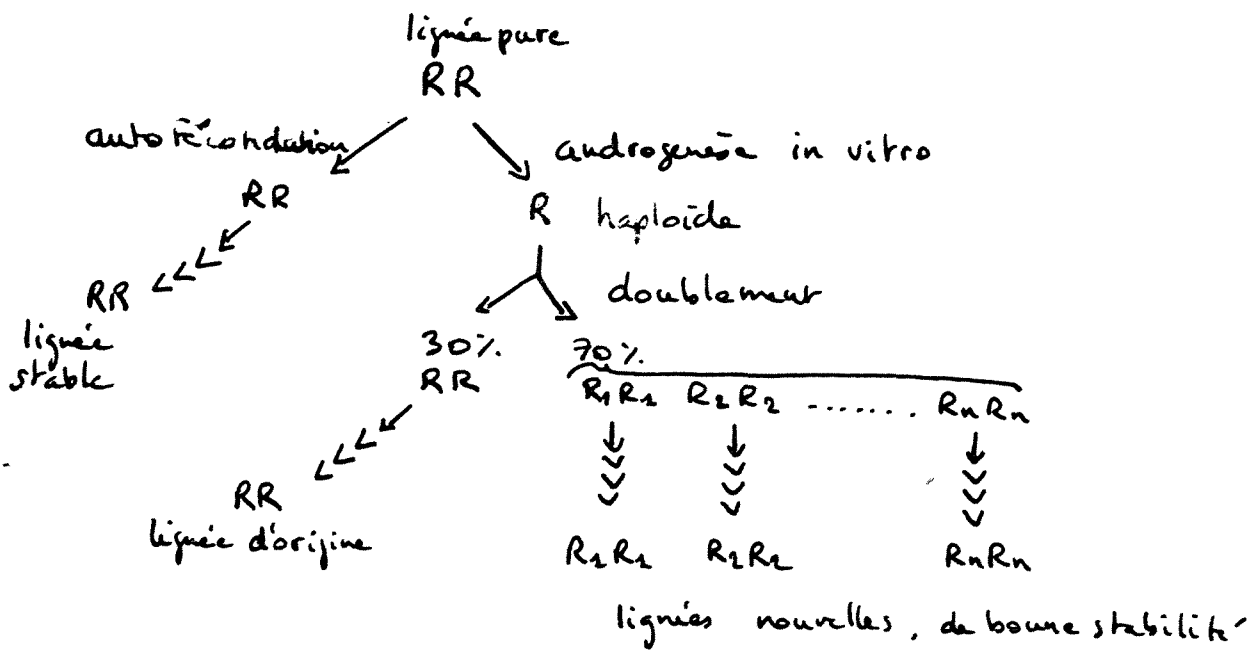
- 1 ) la quantité: les haploïdes doivent être obtenus facilement, en grand nombre ( 5 plantes haploïdes pour 100 anthères cultivées), dans des génotypes variés.
- 2 ) la qualité : les haploïdes doivent représenter un échantillon au hasard des gamètes parentaux; les lignées haploïdes doublées doivent être cytologiquement stables et phénotypiquement normales.

#### 4.2. Utilisation des haploïdes dans l'explication de la différenciation cellulaire et de la morphogénèse.

Les spécialistes ont trouvé dans les étapes de la réorientation d'une cellule sexuelle mâle vers un stade embryonnaire une



SCHEMA N ° 8 : SELECTION DE MUTANTS A PARTIR D'HAPLOIDIE



SCHEMA N ° 9 : SELECTION DE MUTANTS A PARTIR DU DOUBLEMENT D'HAPLOIDIE

source d'analyses tout à fait exceptionnelle (rôle des organites cytoplasmiques, importance de l'apparition des parois pectocellulosiques, etc...). Nous avons abordé divers hypothèses explicatives dans le paragraphe 3 précédent.

#### 4.3. Utilisation des haploïdes dans l'explication de la mutagenèse

L'haploïdie est particulièrement intéressante dans les programmes d'étude de la mutagenèse artificielle. Grâce à l'existence d'un seul lot de chromosomes et à l'absence de relations de dominance-récessivité, la mutation d'un gène s'exprime immédiatement.

La possibilité de travailler sur des populations de millions de cellules, physiologiquement très larges et uniformes du point de vue du développement, permet de sélectionner des cellules et des plantes résistantes ( voir le schéma N° 8 , d'après CHALEFF, 1983). Des mutants ont été induits et sélectionnés à partir de microspores irradiées dans des cultures d'anthères (XUAN et al. 1978, d'après CHU, 1982). Des mutants résistants aux antibiotiques, aux toxines, aux acides aminés et aux herbicides ont été ainsi découverts.

Mais ces progrès restent malheureusement le fait de quelques espèces, qui peuvent maintenir leur haploïdie et régénérer des plantes (CHU, 1982).

CHALEFF (1983) ajoute qu'une limite de la sélection des mutants in vitro est qu'une modification exprimée à l'état cellulaire n'est pas forcément valable au niveau de la plante hautement différenciée. Ainsi, bien que certains caractères agronomiques comme les tolérances par rapport aux métaux lourds, au sel, aux herbicides et aux pH extrêmes du sol, soient accessibles par la technique in vitro, d'autres, comme le rendement, la résistance au stockage et la période de floraison et de maturité sont encore à l'étude.

DEMARLY (1977) montre que l'apparition d'infidélités géniques peut intervenir lors de la reconstitution de diploïdes après l'androgenèse. A partir de lignées pures, l'androgenèse aboutit

à la création d'haploïdes doublés, quasi totalement stables en autofécondation, mais possédant plusieurs caractères variants (hauteur, tallage, longueur du grain, port, couleur...) (voir le schéma N° 9, d'après DEMARLY, 1977).

HENRY et al. (1980) utilisent une technique nouvelle d'analyse génétique, l'électrophorèse des gliadines, et confirment la stabilité et l'homogénéité des haploïdes doublés. La variabilité diffèrerait selon le niveau et le schéma de sélection utilisé.

SCHAEFFER (1982), en plus de la découverte des caractères récessifs grâce à l'androgenèse suivie de diploïdisation, découvre chez le riz qu'un caractère comme le nanisme s'accroît dans la descendance de plantes haploïdes doublés issues de cultures d'anthères, de génération en génération. Il propose trois hypothèses d'explication de ce phénomène :

- soit le gène du nanisme est amplifié dans les conditions in vitro
- soit il est modifié par de telles conditions,
- soit il est amplifié par l'instabilité génétique et/ou la variabilité cytogénétique.

RIVES et PICARD (1977) trouvent que la fréquence de grains de pollen "anormaux" (à cytoplasme non stratifié), qui sont à l'origine des haploïdes obtenus chez le blé par androgenèse est très nettement plus élevée chez les haploïdes doublés ainsi obtenus ; et qu'il s'agit par conséquent d'un trait héritable.

Ils émettent l'hypothèse que le mécanisme de contrôle de ce trait résulte de recombinaisons internes dans les zones de régulation de l'activité des gènes de structure responsables suivant les modèles de CRICK (1971) et KASS et WALLACE (1974), en le rapprochant du phénomène d'assimilation génétique de WADDINGTON (1961 - 1969).

#### 4.4. Utilisation des haploïdes dans la sélection

##### 4.4.1. Production et utilisation de lignées homozygotes

Les lignées homozygotes peuvent être obtenues à partir des haploïdes par le doublement du stock chromosomique, et même pour des espèces allogames, dioïque ou à multiplication végétative.

Ces lignées offrent plusieurs intérêts :

- \* sélection par croisement : les haploïdes doublés issus d'hybrides permettent de produire très rapidement, en supprimant des générations d'autofécondation, de nouveaux cultivars.

De BUYSER et al (1981) sélectionnent ainsi des lignées d'haploïdes doublés de blés, en temps réduit, aux rendements supérieurs à ceux des meilleures variétés cultivées.

Plus efficace est la sélection de caractères à contrôle bien souvent récessif (obtention d' $\frac{1}{2}n$  haploïde doublés homozygotes récessifs au lieu de  $\frac{1}{2}n$  en croisement normal). Cela s'est avéré intéressant pour le riz (YIN et al., 1976 ; ANONYME, 1976 a)<sup>(1)</sup>, pour le blé (TSUN, 1978)<sup>(1)</sup>, pour B. napus (KELLER et STRINGHAM, 1978).

Il reste des difficultés quant à la vitalité des haploïdes doublés. Pour certaines espèces, autogames, comme le riz ou le blé, cette vitalité ne diminue pas (HU et al., 1979). Pour les allogames, par contre, on observerait des cas de rachitisme.

- \* Utilisation de l'hétérosis chez les espèces hétérogamiques : la pureté homozygotique des haploïdes doublés permet de produire des hybrides avec le maximum d'hétérosis. Wu et al, (1980 d'après CHU, 1982) constatent que les hybrides entre des lignées d'haploïdes doublés et de lignées sélectionnées par inbreeding sont supérieurs du point de vue du rendement, de la vigueur et de l'homogénéité à ceux des lignées

\* (1) d'après CHU, 1982

obtenues par inbreeding.

L'haplométhode permet en outre la production d'hybrides chez des espèces hétérogames comme le navet, le colza ou B. oleracea (KELLER et STRINGHAM, 1978).

#### 4.4.2. Application à l'hybridation à distance

Les généticiens sont également preneurs de plantes haploïdes en ce qui concerne l'hybridation. Il existe plusieurs possibilités théoriques.

##### \* obtention de lignées fertiles stables d'hybrides interspécifiques

Par la culture d'anthères d'hybrides des sous espèces de riz japonica et indica, on a pu obtenir des diploïdes spontanés homozygotes et fertiles pour plus de 50 %. De même, pour le blé, HENRY et de BUYSER (1980) régénèrent des diploïdes spontanés homozygotes à partir de cultures d'anthères de blé mâle stérile cytoplasmique mais possédant les gènes de restauration.

##### \* Transfert de gènes d'une espèce à une autre :

Les cultures d'anthères d'un hybride interspécifique, dont les chromosomes s'apparient imparfaitement à la méiose, permettent d'obtenir des lignées où la translocation hétérozygote des chromosomes rend possible le transfert des gènes de bonne qualité, de rendement, et de résistance, d'une espèce à une autre.

Par exemple, BARCLAY (1975)<sup>(1)</sup> obtenait des haploïdes de blé intéressants pour le caractère de nouaison, en pollinisant le cultivar Chinese spring avec Hordeum bulbosum 2 ou 4 x.

L'hybridation entre d'autres cultivars incompatibles avec H. bulbosum et Chinese spring, suivie de l'androgénèse in vitro permet aussi le transfert des gènes récessifs responsables de cette nouaison et l'obtention de nouvelles lignées homozygotes les possédant (AL JANABI et PICARD, 1981).

\* (1) d'après AL JANABI et PICARD, 1981.

T. aestivum x S. cereale  
(21 IIW) (7 IIR)

↓  
hybride dihaploïde  
(21 IW + 7 IR)

↓  
doublement des chromosomes

↓  
amphidiploïde x T. aestivum  
(21 IIW + 7 IIR) (21 IIW)

↓  
hybride né du backcross  
(21 IIW + 7 IR)

↓  
culture d'anthers

↓  
additions haploïdes  
(21 IW + n IR, n = 0-7)

↓  
doublement des chromosomes

↓  
additions diploïdes  
(21 IIW + n IIR, n = 0-7)

SCHEMA N ° 10 : PROCESSUS D'ADDITION

DE CHROMOSOMES CHEZ TRITICUM SECALE

T. aestivum x S. cereale  
(21 IIW) (7 IIR)

↓  
hybride dihaploïde  
(21 IW + 7 IR)

↓  
culture d'anthers

↓  
substitutions haploïdes  
(n IW + n IR, n = 0-28)

↓  
doublement des chromosomes

↓  
substitutions diploïdes  
(n IIW + n IIR, n = 0-28)

SCHEMA N ° 11 : PROCESSUS DE

SUBSTITUTION DE CHROMOSOMES CHEZ

TRITICUM SECALE

\* Production d'addition ou de substitution de chromosomes

Les cultures d'anthères d'un hybride obtenu lors du croisement en retour entre un amphidiploïde et l'un de ses parents permettent aisément d'obtenir des lignées avec un nombre de chromosomes supérieur (voir schéma N°10 , d'après CHU, 1978, chez le *Triticum Secale*).

Il est par contre plus difficile de produire des substitutions. CHU, (1978), n'obtient que 2 calcs sur 10 000 anthères d'hybrides dihaploïdes de *Triticum secale* (voir schéma N°11 d'après CHU, 1978). NITZSCHE et WENZEL (1977) n'obtiennent que 4 plantes albinos sur 18 000 anthères de *Festuca pratensis* x *lolium multiflorum*.

4.4.3. Analyse génétique des lignées sélectionnées

Si l'haploïdisation suivie de diploïdisation permet la fixation de lignées homozygotes, et la production d'hybrides intéressants, c'est une technique qui ne favorise pas bien la recombinaison. Dans les programmes de sélection récurrente, qui permet la recombinaison de caractères recherchés, l'haploïdisation permet de mesurer la valeur génétique des lignées sélectionnées.

Ainsi, CHEN et al., (1982) montrent que 2 gènes nal et lg responsables de l'étroitesse de la feuille et de l'absence de la ligule, sont liés chez le riz.

De BUYSER et al (1981) montrent aussi que la sélection en première et seconde multiplication est encore imparfaite, même à partir d'haploïdes doublés, et que le rôle du sélectionneur est important, quant aux choix des croisements à tester, mais aussi des haploïdes doublés (H.D.).

Actuellement, pour eux, plusieurs utilisations de l'androgenèse semblent possibles.

- à partir de matériel avancé en sélection classique (F 6),



Obtenir des rendements équivalents à ceux des lignées classiques.

A partir de matériel F 2, il est possible, soit de tester la valeur du croisement, soit de créer des lignées intéressantes, avec un nombre d'M.D. relativement faible. Pour le blé, ils estiment plus utile de faire porter les efforts des chercheurs sur le test d'un plus grand nombre d'origines, plutôt que de rechercher de plus grands effectifs d'M.D.

#### 4.5. Apparition du phénomène de contrôle épigénique

Il peut se produire des variations héréditaires, mais non mendéliennes, lorsque l'on analyse le comportement en croisement d'haploïdes doublés. On a appelé épigénique ce contrôle de la forme d'expression du gène.

DEMARLY (1977) distingue ainsi 4 types d'infidélités génétiques qui se manifestent lors de l'apparition de variants par reconstitution de dihaploïdes après androgenèse :

- 1 . une infidélité génique : quand de nouveaux caractères apparaissent
- 2 . une infidélité chromosomique : quand on obtient des plantes au génôme complètement dépersonnalisé, aneuploïdes, polyploïdes.
- 3 . une infidélité cytoplasmique : quand on obtient des plantes généralement intactes du point de vue génotypique, mais variant considérablement sur le plan phénotypique, à cause des modifications du cytoplasme (stérilité, résistances ou adaptation par rapport à certaines substances), stables et s'héritant naturellement.
- 4 . une infidélité de programme de développement .

DEMARLY (1977) propose pour ces infidélités une hypothèse d'explication basée sur "le relâchement in vitro" de l'activation génique, celle du "linleat".

FORMATION DU  
GRAIN DE POLLEN



plante-mère

PRODUCTION  
PRELEVEMENT  
ISOLEMENT



CULTURE  
IN VITRO



DEVELOPPEMENT



calli



embryons



plantules

\* préciser l'action de la longueur de la photopériode, des caractéristiques spectrales (effet inhibiteur de la lumière rouge), de l'humidité de l'air sur les plantes-mères

\* étudier précisément la formation de la paroi cellulaire dans la spore de pollen au niveau de l'ultrastructure

\* trouver une méthode de description cytologique du pollen par rapport à la sélection des épis et des bourgeons

\* approfondir le rôle des facteurs extrinsèques comme les manipulations la densité de culture, l'atmosphère du récipient.

\* connaître le rôle des hormones exogènes (auxine  $\rightarrow$  cal, kinétine  $\rightarrow$  plante) et de tous les facteurs stimulateurs ou inhibiteurs de la croissance (rôle du micro-organisme ?)

\* approfondir le rôle des hormones endogènes du pollen et de l'anthere.

\* découvrir les origines des calli donnant les albines et autres expressions phénotypiques.

SCHEMA N ° 12 : PRINCIPALES PISTES DE RECHERCHE DANS LA PRODUCTION  
DES HAPLOIDES VIA L'ANDROGENESE

Les plantes haploïdes, et plus précisément leur production et leur utilisation, font l'objet d'un intérêt très particulier des chercheurs agronomes et botanistes.

Elles apportent un matériel biologique nouveau qui suscite de nombreux travaux de biologie fondamentale (approche et compréhension du phénomène de différenciation cellulaire, modalités d'expression des gènes, relations entre l'épigénique et le code génétique dans la sélection).

Déjà, elles ont permis d'améliorer les techniques de multiplication et de sélection :

- en permettant une production plus grande et plus rapide et une meilleure utilisation des lignées homozygotes.
- par des applications à l'hybridation à distance,
- en fournissant des moyens d'analyse génétique des lignées sélectionnées.

Cependant, le matériel d'investigation reste très diversifié, et les techniques de recherche, encore empiriques, ne permettent pas de dégager de véritables normes de production des haploïdes et de leurs dérivés.

Par ailleurs, plusieurs limites gênent l'initiative des chercheurs :

- 1) beaucoup de plantes restent réfractaires à l'haploïdie.
- 2) pour celles qui s'y prêtent, le taux de réponse est encore très faible.
- 3) pour beaucoup, l'embryogenèse s'arrête au stade des cals.
- 4) chez les Céréales, le passage par des cals est obligatoire, ce qui favorise les anomalies et la formation d'albinos.
- 5) le maintien de l'haploïdie est souvent contrarié par la formation de cals à l'endomitose.
- 6) chez les plantes de ploïdie très élevée, il est difficile de sélectionner les gènes.

Ainsi, il semble important, en conclusion de notre étude, de dégager plusieurs pistes de recherche (voir schéma N°12) qui retiennent l'attention des chercheurs, pour qu'une meilleure compréhension des étapes fondamentales de la physiologie de la reproduction débouche sur des techniques plus efficaces d'amélioration et de production des végétaux.

BIBLIOGRAPHIE

---

1. AL JANABI K. et PICARD E., 1981 : Transfert chez le blé tendre par androgenèse in vitro des gènes de compatibilité avec Hordeum bulbosum (kr 1, kr 2). C.R. Acad. Sc. Paris, 292, 247 - 250.
2. AMOS J.A. et SCHOLL R.L., 1978 : Induction of haploid callus from anthers of four species of Arabidopsis. Z. Pflanzenphysiol., 90, 33 - 43.
3. AMSSA M., 1980 : Etude des modalités de l'induction du doublement chromosomique spontané des embryons androgénétiques de blé tendre (Triticum aestivum L.). Thèse 3 ème cycle : Amélior. Plantes, Paris 11/1980/2920.
4. BERNARD S., 1980 : In vitro androgenesis in hexaploid triticale : détermination of physical conditions increasing embryoid and green plant production . Z. Pflanzenzuchtg, 85, 308 - 321.
5. BERNARD S., PICARD E., DE BUYSER J., 1976 : Obtention de plantes haploïdes de Triticale hexaploïde ( x Triticosecale Wittmack) par culture in vitro d'anthères. C.R. Acad. Sc. Paris, 283, 235-238.
6. BOUHARMONT J., 1977 : Cytology of microspores and calli after anther culture in Hordeum vulgare . Caryologia, 30, 351-360.
7. BULLOCK W.P. , BAEZINGER P.S., SCHAEFFER G.W., BOTTINO P.J., 1982 : Anther culture of wheat (Triticum aestivum L.) F<sub>1</sub>'s and their reciprocal crosses. Theor. Appl. Genet., 65, 155-159.
8. CHALEFF R.S., 1983 : Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. Science, 219, 676-682.
9. CHEN C.C., 1977 : In vitro development of plants from microspores of rice. In Vitro, 13, 484-489.
10. CHEN Y., XUO Q., LI S., 1980 : the effects of cold pretreatment and preculture of anthers on initiation and development of isolated Rice pollen in vitro. Ann. Rep. Inst. Genet., Acad. Sin., 77-78.
11. CHEN C.M., CHEN C.C., LIN M.H., 1982 : Genetic analysis of anther-derived plants of rice. The J. of Hered., 73, 49-52.
12. CHIEN Y.C., KAO K.N., 1983 : Effects of osmolality, cytokinin and organic acids on pollen callus formation in triticale anthers . Can. J. Bot., 61, 3, 639-655.
13. CHU C.C., 1978 : the N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. Proceed. Symp. Plant Tissue Cult., 25-30 mai, Science Press, Pekin, 43-50.
14. CHU C.C., 1982 : Haploids in plant improvement. In "Plant Improvement and somatic call genetics". Academic Press, 129-158.
15. CLAPHAM D., 1977 : Haploid induction in cereal. In "Applied and Fundamental aspects of Plant Cell Tissue and Organ Culture", ed. J. REINERT and Y.P. BAJAJ, 279-298.
16. COLLINS G.B., 1977 : Production and utilization of anther-derived haploids in Crop Science, 17, 583-586.
17. COSSETTE F., PAUZE F.J., 1983 : La production de lignées d'orge haploïdes et diploïdes homozygotes par culture d'anthères. Rev. Can. Biol. esp, 42 (1), 45-49.
18. COULIBALY Y., DEMARLY Y., 1978 : sur les conditions de survie des microspores de Nicotiana tabacum et d'Oryza sativa soumises à la température de l'azote liquide (- 196 ° C). C.R. Acad. Sc. Paris, 286, 1065-1068.
19. COULIBALY Y., DEMARLY Y., 1979 : Androgenèse in vitro chez Oryza sativa (Var. Cigalon) à partir d'anthères conservées dans l'azote liquide. L'Agronomie Tropicale, 34, 74-79.
20. DE BUYSER J., HENRY Y., 1979 : Androgenèse sur des blés tendres en cours de sélection. 1. L'obtention des plantes in vitro. Z. Pflanzenzuchtg., 83, 49-56.

21. DE BUYSER J., HENRY Y., 1980 : Induction of haploïd and diploïd Plants through in vitro anthers culture of haploïd Wheat ( $n = 3 \times = 21$ ). Theor. Appl. Genet., 57, 57-58.
22. DE BUYSER J., HENRY Y., LAUR R., LONNET P., 1981 : Utilisation de l'androgénèse in vitro dans des programmes de sélection du blé tendre (Triticum aestivum L.) Z. Pflanzenzuchtg, 87, 290 - 299.
23. DEMARLY Y., 1977 : Etude génétique des organismes dissociés. A. du Tabac. Sect.2, Bergerac. SEITA, N° Spécial.
24. DEMARLY Y., 1983 : Les plantes haploïdes, le courrier du CNRS, Mars, 1983, 35-40.
25. DUNWELL J.M., 1978 : Division and differentiation in cultured pollen . In "Frontiers of Plant Tissue Culture", Proc. Fourth Int. Congr. of Plant Tissue and cell Culture, Calgary, August, 20-25, 103-112.
26. DUNWELL J.M., 1979 : Anther culture in Nicotiana tabacum : the role of the culture vessel atmosphere in pollen embryo induction and growth. J. Exp. Bot., 30, 419 - 428.
27. DUNWELL J.M., CORNICH M., Mc COURCEL A.C.L. , MIMMLE F.E.R., WILLIAMS J.E., 1983 : Induction and growth of microspore derived embryos of Brassica napus ssp oleifera. J. Exp. Bot., 34, 1768 - 1778.
28. FOUROUGHY-WEHR B. , MIX G., GAUL H., WILSON H.M., 1976 : Plant production from cultured anthers of Hordeum vulgare L. . Z. Pflanzenzüchtg, 77, 198- 203.
29. FOUROUGHY - WEHR B., FRIEDT W., WENZEL G., 1982 : On the genetic improvement of androgenetic haploïd formation in Hordeum vulgare. Theor. Appl. Genet, 62, 233-239.
30. GENOVESI A.D. et MAGILL C.W., 1979 : Improved rate of callus and green plant production from Rice anther culture following cold shock. Crop Science, 19, 662-664.
31. GENOVESI A.D. et COLLINS G.B., 1982 : In Vitro production of haploid plants of corn via anther culture. Crop Science, 22, 1137-1144.
32. GEORGE L. et RAO P.S., 1982 : In vitro production of pollen embryos and plantlets in Brassica juncea through anther culture. Plant Science Letters, 26, 111-115.
18. COULIBALY Y., DEMARLY Y., 1978 : sur les conditions de survie des microspores de Nicotiana tabacum et d'Oryza sativa soumises à la température de l'azote liquide (-196 ° C). C.R. Acad. Sc. Paris, 286, 1065-1068.
19. COULIBALY Y., DEMARLY Y., 1979 : Androgénèse in vitro chez Oryza sativa (Var, Cigalou) à partir d'anthères conservées dans l'azote liquide. L'Agronomie Tropicale, 34, 74-79.
20. DE BUYSER J., HENRY Y., 1979 : Androgénèse sur les blés tendres en cours de sélection . I. L'obtention des plantes in vitro. Z. Pflanzenzüchtg, 83, 49-56.
21. DE BUYSER J., HENRY Y., 1980 : Induction of haploïd and diploïd Plants Throuhg in vitro anthers culture of haploïd Weat ( $n = 3 \times = 21$ ).
22. DE BUYSER J., HENRY Y., LAUR R., LONNET P., 1981 : Utilisation de l'androgénèse in vitro dans des programmes de sélection du blé tendre (Triticum aestivum L.). Z. Pflanzenzuchtg., 87, 290-299.
23. DEMARLY Y., 1977 : Etude génétique des organismes dissociés. A. du Tabac. Sect.2, Bergerac, SEITA , N° spécial.
24. DEMARLY Y., 1983 : Les plantes haploïdes, le courrier du CNRS, Mars 1983, 35-40.
25. DUNWELL J.M., 1978 : Division and differentiation in cultured pollen. In : "Frontiers of Plant Tissue Culture", Proc. Fourth Int. Congr. of Plant Tissue and Cell Culture, Calgary, August, 20-25, 103-112.
26. DUNWELL J.M., 1979 : Anther culture in Nicotiana tabacum : the role of the culture vessel atmosphere in pollen embryo induction and growth. J.Exp. Bot., 30, 419-428.
27. DUNWELL J.M., CORNISH M., Mc COURCEL A.C.L., MIMMLE F.E.R., WILLIAMS J.E., 1983 : Induction and growth of microspore derived embryos of Brassica napus ssp oleifera. J. Exp. Bot., 34, 1768-1778.

28. FOUROUGHI - WEHR B., MIX G., GAUL H., WILSON H.M., 1976 : Plant production from cultured anthers of Hordeum vulgare L. Z. Pflanzenzüchtg., 77, 198-203.
29. FOUROUGHI - WEHR B., FRIEDT W., WENZEL G., 1982 : On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in Hordeum vulgare. Theor. Appl. Genet., 62, 233-239.
30. GENOVESI A.D. et MAGILL C.W., 1979 : Improved rate of callus and green plant production from Rice anther culture following cold shock. Crop Science, 19, 662-664.
31. GENOVESI A.D. et COLLINS G.B., 1982 : In vitro production of haploid plants of corn via anther culture. Crop Science, 22, 1137-1144.
32. GEORGE L. et RAO P.S., 1982 : In vitro production of pollen embryos and plantlets in Brassica juncea through anther culture. Plant Science Letters, 26, 111-115.
33. HANSSON B., 1978 : Temperature choker - et sätt att Kraftigt höja frekvensen av embryoïdbildningar vid antherkultur av Raps (Brassica napus). Sveriges Utsidesforenings tidskrift, 88, 141-148.
34. HEBERLE - BORS E., 1980 : interaction of activated charcoal and iron chelates in anther cultures of Nicotiana and Atropa belladonna. Z. Pflanzenphysiol. 99, 339 - 347.
35. HEBERLE - BORS E., REINERT J., 1977 : Factors of haploid production by isolated pollen cultures - Naturwissenschaften, 64, 100-101.
36. HEBERLE - BORS E., 1980 : Isolated pollen culture and pollen dimorphism. Naturwissenschaften, 67, 311-312.
37. HENRY Y., DE BUYSER J., 1979 : Androgenèse sur les blés tendres en cours de sélection . 1. L'obtention des plantes in vitro. Z. Pflanzenzüchtg., 83, 49-56.
38. HENRY Y., DE BUYSER J., 1980 : Androgenèse sur des blés tendres en cours de sélection. 2. L'obtention des grains. Z. Pflanzenzüchtg., 84, 9-17.
39. HENRY Y., DE BUYSER J., LE BRUN J., 1980 : Androgenèse sur des blés tendres (Triticum aestivum), en cours de sélection. 3. Electrophorèse des glindines de quelques haploïdes doublés. Z. Pflanzenzüchtg., 85, 322 - 327.
40. HOFFMANN F., THOMAS E., WENZEL G., 1982 : Anther culture as a breeding tool in Rape . 2. Progeny analyse of androgenetic lines and induced mutants from haploid mutants. Theor. Appl. Genet. 61, 225 - 232.
41. HORNER H., PRATT M.L., 1979 : Amino-acid analysis of in vitro androgenic anthers of Nicotiana tabacum. Protoplasma, 98, 279-282.
42. JACOBSON E., SOPORY S.K., 1978 : The influence and possible recombination of genotypes on the production of microspores embryoïds and anther culture of Solanum tuberosum and dihaploid hybrids. Theor. Appl. Genet., 52, 119-123.
43. JOHANSSON L., ANDERSSON B., ERIKSSON T., 1982 : Improvement of anther culture technique activated charcoal bound in agar medium in combination with liquid medium and elevated CO<sub>2</sub> concentration. Physiol. Plant., 54, 24-30.
44. KAO K.N., 1981 : Plant formation from Barley and the cultures with Ficoll media. Z. Pflanzenphysiol., 103, 437-443.
45. KAS PER BAUER M.J., COLLINS G.B., 1972 : Reconstitution of diploid from leaf tissue and anther. derived haploïds in tobacco. Crop Science, 12, 98-101.
46. KEATHLEY D.E., SCHOLL R.L., 1982 : Culture of Arabidopsis thaliana in liquid medium. Z. Pflanzenphysiol., 106, 199-212.
47. KELLER W.A., ARMSTRONG K.C., 1977 : Embryogenesis and plant regeneration in Brassica napus anther culture. Can. J. Bot., 55, 1383-1388.
48. KELLER W.A., ARMSTRONG K.C., 1978 : High frequency production of microspore-derived plants from Brassica napus anther cultures. Z. Pflanzenzücht., 80, 100 - 108.

49. KELLER W.A., ARMSTRONG K.C., 1979 : Stimulation of embryogenesis and haploid production in Brassica campestris anther cultures by elevated temperature treatments. *Theor. Appl. Genet.*, 55, 65-67.
50. KELLER W.A., STRINGHAM G.R., 1978 : Production and utilization of microspore-derived haploid plants. In "Frontiers of Plant Tissue Culture", ed. T.A. THORPE, Proc. Fourth Int. Cong. of Plant Tissue and Cell Culture, Calgary, August 20-25, P7.
51. KLIMASZEWSKA K. , KELLER W.A., 1983 : The production of haploids from Brassica hirta Moench (Sinapis alba L.) anther culture : *Z. Pflanzenphysiol.*, 109, 235-24.
52. KOHLENBACH H.W. , WERNICKE W., 1978 : Investigations on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. *Z. Pflanzenphysiol.*, 86, 463 - 472.
53. LICHTER R., 1981 : Anther culture of Brassica napus in a liquid culture medium. *Z. Pflanzenphysiol.*, 103, 229-237.
54. LICHTER R., 1982 : Induction of haploids plants from isolated pollen of Brassica napus. *Z. Pflanzenphysiol.*, 105, 427-434.
55. LOH C.S. , INGHAM D.S., 1982 : Production of haploid plant from anther culture and secondary embryoïds of winter oil-seed rape, Brassica napus ssp oleifera. *New Phytol.* , 91, 507 - 516.
56. MAESHWARI S.C., RASHID A., TYAGI A.K., 1982 : Haploids from pollen grains. Retrospect and prospect. *Amer. J. Bot.*, 69, 865-869.
57. MAESHWARI S.C., TYAGI A.K., MALHOTRA K., 1980 : Induction of haploidy from pollen grains in Angiosperms. The current status. *Theor. Appl. Genet.*, 58, 193 - 206.
58. MII M., 1980 : Effect of pollen degeneration on the pollen embryogenesis in anther culture of Nicotiana tabacum L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 99, 349-355.
59. NITZSCHE W., 1970 : Herstellung haploider pflanzen aus Festuca lolium bastardier. *Naturwissenschaften*, 57, 199-200.
60. NITZSCHE W., WENZEL G., 1977 : Haploids in plant breeding. In "Advances in Plant Breeding", ed. HORN W., ROBBELEN G., 8, 101p.
61. PICARD E., 1973 : Influence de modifications dans les corrélations internes sur le devenir du gamétophyte mâle de Triticum aestivum L. in situ et en culture "in vitro". *C.R. Acad. Sc.*, Paris, 277, 777-778.
62. PICARD E., DE BUYSER J., 1977 : High production of embryoïds in anther culture of pollen derived homozygous spring wheats. *Ann. Amélior. Plants*, 27, 483 - 488.
63. RAGHAVAN V., 1976 : Role of the generative cell in androgenesis in Henbane. *Science*, 191, 388-389.
64. RAGHAVAN V., 1979 : An autoradiographic study of RNA synthesis during pollen embryogenesis in Hyoscyamus niger (Henbane). *Amer J. Bot.*, 66, 784-795.
65. RAQUIN C., AMSSA M., HENRY Y., DE BUYSER J., ESSAD S., 1981 : Origine des plantes polyploïdes obtenues par culture d'anthères. Analyse cytophotométrique in situ et in vitro des microspores de Petunia et du Blé tendre. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 89, 265 - 277.
66. RASHID A., REINERT J., 1980 : Selection of embryogenic pollen from cold-treated buds of Nicotiana tabacum var Badisher Burley and their development into embryos in cultures. *Protoplasma*, 105, 161-167.
67. RASHID A., REINERT J., 1981 : Differentiation of embryogenic pollen in cold-treated buds of Nicotiana tabacum var. Badisher Burley and nutritional requirements of the isolated pollen to form embryos. *Protoplasma*, 106, 137-144.
68. RENARD M. et DOSBA F., 1980 : Investigations on haploid rape seed (Brassica napus var. oleifera). In "The Plant Genome", eds. D.R. DAVIES et D.A. HOPWOOD, Second Int. Haploid Conference, Norwich, September 1979, 257-258.



70. RIVES M., 1984 : L'amélioration des plantes. La Recherche, 155, mai 1984.
71. RIVES M. et PICARD E., 1977 : A case of genetic assimilation : selection through androgenesis or parthenogenesis of haploïd producing systems (an hypothesis). Ann. Amel. Plantes, 27, 489-491.
72. SANGWAN-NORREEL B.S., 1977 : Androgenic stimulating factors in the anther and isolated pollen grain culture of Datura innoxia MILL. J. Exp. Bot. 28, 843-852.
73. SCHAEFFER G.W., 1982 : Recovery of heritable variability in anther derived doubled haploïd rice. Crop Science, 22, 1160-1164.
74. SCHAEFFER G.W., BAEZINGER P.S., WORLEY J., 1979 : Haploid plant development from anthers and in vitro embryo culture of wheat. Crop Science, 19, 697-702.
75. SHIMADA T., 1981 : Haploïd plants regenerated from the pollen callus of wheat (Triticum aestivumL.). Jap. J. Genet., 56, 581-588.
76. SOPORY S.K., 1980 : Establishment of conditions for the induction of androgenetic embryoids in cultured anthers of dihaploid potatoe. In "Plant Tissue Culture Genetic Manipulation and Somatic Cell Hybridation of Plant Cells " ; Eds P.S. RAO, M.R. HEBLE et M.S. CHADA : Proc. Nat. Symp., Bhabha Atomic Research Centre, 27-29 février 1980 , Bombay, 85-91.
77. SOPORY S.K., JACOBSEN E., WENZEL G., 1978 : Production of monohaploïd embryoids and plantlets in cultured anthers of Solanum tuberosum. Plant Science letters, 12, 47-54.
78. SOZINOV A.A. , LUKJANUK S.F., IGNATOVA S.A., 1981 : Anther cultivation and induction of haploid plants in Triticale. Z. Pflanzenzüchtg., 86, 272-285.
79. SUNDERLAND N., 1978 : Stratégies in the improvement of yields in anther culture. Roc. Symp. on Plant Tissue Culture, 25-30 mai, Pekin, 65-86.
80. SUNDERLAND N. et DUNWELL J.M., 1977 : Anther and Pollen culture. In H.E. STREET (Ed.) Plant Tissue and Cell Culture, Blackwell Scientific Publication, Oxford, 223-265.
81. SUNDERLAND N. et EVANS L.J., 1980 : Multicellular pollen formation in cultured barley anthers. 2. The A,B, and C pathways. J. Exp. Bot., 31, 501-504.
82. SUNDERLAND N. et ROBERTS M., 1977 : New approach to pollen culture. nature, 270, 236-238.
83. SUNDERLAND N., ROBERTS M., EVANS L.J., WILDON D.C., 1979 : Multicellular pollen formation in cultured burley anthers. 1. Independant division of the generative and vegetative cells. J. Exp. Bot., 30, 1133-1144.
84. SUNDERLAND N. et WILDON D.C., 1979 : A note on the pretreatment of excised flower buds in float culture of Hyoscyamus anthers. Plant Sci. Lett., 15, 169- 175.
85. TYAGI A.K., RASHID A. et MAESHWARI S.C., 1979 : High frequency production of embryos in Datura innoxia from isolated grains by combined cold treatment and cereal culture of anthers in liquid medium. Protoplasma, 90, 11-17.
86. TYAGI A.K., RASHID A. et MAESHWARI S.C., 1980 : Enhancement of pollen embryo formation in Datura innoxia from isolated pollen grains by different culture conditions. In : "Plant Tissue Culture. Genetic Manipulation and Somatic hybridisation of Plant Cells"., Eds. P.S. RAO, M.R. HEBLE et M.S. CHADHA, Proc. Nat. Symp., Bhabha Atomic Research Center, 28-29 février, Bombay. 92-99.
87. TYAGI A.K., RASHID A. et MAESHWARI S.C., 1981 : Promotive effects of polyvinyle-pyrrolidone ou pollen embryogenesis in Datura innoxia . Physiol. Plant., 53, 405-406.
88. WEATHERHEAD M.A., BURDON J., HENSHAW G.C., 1978 : Some effects of activated charcoal and additive to plant tissue culture media. Z. Pflanzenphysiol., 89, 141-147.
89. WEATHERHEAD M.A. et HENSHAW G.C., 1979 : The induction of embryoids in free pollen cultures of potatoe. Z. Pflanzenphysiol., 94, 441-447.

90. WENZEL G., HOFFMANN F. et THOMAS E., 1977 : Increased induction and chromosome doubling of androgenetic haploid rye. *Theor. Appl. Genet.*, 51, 81-86.
91. WERNICKE W. et KHOLENBACH H.W., 1977 : Experiments on the culture of isolated microspores in Nicotiana and Hyoscyamus. *Z. Pflanzenphysiol.*, 81, 333-340.
92. WERNICKE W., HARMS C.T., LORZ H., THOMAS E., 1978 : Selective enrichment of embryogenic microspore populations. *Naturwissenschaften*, 65, 540-541.
93. WILSON M.H., MIX G., FOUROUGHI-WEHR B., 1978 : Early microspore divisions and subsequent formation of microspore calluses at high frequency in anthers of Hordeum vulgare L. *J. Exp. Bot.*, 30, 1133-1144.

INDEX DES NOMS BOTANIQUES  
INDEX DES NOMS BOTANIQUES

---

(Les numéros réfèrent aux noms d'auteurs).

GENERALITES : 8 - 13 - 14 - 15 - 15 - 16 - 23 - 24 - 25 - 31 - 35 - 36 - 43 - 44 -  
50 - 52 - 56 - 57 - 60 - 70 - 71 - 79 - 79 - 82 - 88 - 92 -

GRAMINEES :

Festuca 59  
Hordeum bulbosum 1  
H. vulgare 6 - 17 - 28 - 29 - 69 - 81 - 83 - 84 - 93 -  
Lolium 59  
Oryza sativa 9 - 90 - 11 - 18 - 19 - 30 - 73 -  
Secale cereale 4 - 5 - 12 - 78 -  
Triticale 9 - 10 - 11 - 18 - 19 - 30 - 73 -  
Triticum aestivum 3 - 7 - 20 - 21 - 22 - 37 - 38 - 39 -  
61 - 62 - 65 - 74 - 75 -

CRUCIFERES :

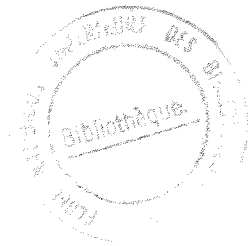
Arabidopsis thaliana : 2 - 46 -  
Brassica campestris - 49 -  
B. hirta - 51 -  
B. juncea - 32 -  
B. napus - 27 - 33 - 47 - 48 - 53 - 54 - 55 - 68 -

AUTRES FAMILLES :

Atropa belladonna - 34 -  
Datura innoxia - 72 - 85 - 86 -  
Hyoscyamus niger - 63 - 64 - 91 -  
Nicotiana tabacum - 18 - 26 - 34 - 41 - 45 - 58 - 66 - 67 - 91 -  
Petunia - 65 -  
Solanum tuberosum - 42 - 76 - 77 - 89 -

INDEX DES SOURCES

- "Advances in Plant Breeding " Eds W. HORN et G. ROBBELEN : 60
- Amel. Plantes, Paris 11 : 3
- Am. J. Bot. : 56 - 64
- Ann. Amel. Plantes : 62 - 71
- Annales du Tabac : 23
- Ann. Rep. Inst. Genet., Acad. Sin. : 10
- "Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue and Organ Culture ",  
Eds. J. REINERT et Y.P. BAJAJ. : 15
- Can. J. Bot. : 12 - 47
- Caryologia : 6
- C.R. Acad. Sc. Paris : 1 - 5 - 18 - 61 -
- Crop Science : 16 - 30 - 31 - 45 - 69 - 73 - 74 -
- " Frontiers of Plant Tissue Culture", Proc. Fourth Int. Congr. of Plant Tissue  
and Cell Culture : 25 - 30
- In Vitro : 9
- Jap. J. Genet. : 75
- J. Exp. Bot. : 26 - 27 - 72 - 81 - 83 - 93 -
- L'Agronomie Tropicale : 19
- La Recherche : 70
- Le Courrier du C.N.R.S. : 24
- Nature : 82
- Naturwissenschaften : 35 - 36 - 59 - 92 -
- New Phytol. : 55
- Physiol. Plant : 37 - 43 -
- " Plant Improvement and somatic cell genetics", Acad. Press. : 14
- Plant Science Letters : 32 - 77 - 84 -
- Plant Tissue Culture : 76 - 86
- Plant Tissue and Cell Culture : 80
- Proc. Symp. on Plant Tissue Culture : 13 - 79
- Protoplasma : 41 - 66 - 67 - 85 -
- Rev. Can. Biol. exp. : 17
- Science : 8 - 63 -
- Sveriges Utsidesforenings Tidskrift : 33
- The J. of Hered. : 11
- Theor. Appl. Genet. : 7 - 21 - 29 - 40 - 42 - 49 - 57 - 90 -
- "The Plant Genome", eds D.R. DAVIES et D.A. HOPWOOD, Second Int. Haploid Conference  
Norwich : 68
- Z. Pflanzenphysiol. : 2 - 34 - 44 - 46 - 51 - 52 - 53 - 58 - 88 - 89 - 91 -
- Z. Pflanzenzüchtg. : 4 - 20 - 22 - 28 - 37 - 38 - 39 - 48 - 65 - 78 -



ANNEXES

BASE DE DONNEES: :PASCAL  
\*\*\*\*\*

*stratégie de recherche  
n° 1 sur PASCAL*

PARAMETRES DE L'EDITION  
-----

NB DOCUMENTS A EDITER : 241  
NO PREMIER DOCUMENT.. : 1  
NO DERNIER DOCUMENT.. : 241  
PAS DE LA BOUCLE..... : 1

STRATEGIE DE RECHERCHE n° 1  
-----

ETAPE DE RECHERCHE : 1  
CYTODIFFERENCIATION OU DIFFERENCIATION OU ANDROGENESE

ETAPE DE RECHERCHE : 2  
DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE OU HAPLOID??

ETAPE DE RECHERCHE : 3  
1 OU 2

ETAPE DE RECHERCHE : 4  
POLLEN? OU ANTHERE?

ETAPE DE RECHERCHE : 5  
3 ET 4

ETAPE DE RECHERCHE : 8  
4 ET IN VITRO

ETAPE DE RECHERCHE : 9  
5 SAUF 8

ETAPE DE RECHERCHE : 10  
9 SAUF RUS /LA

ETAPE DE RECHERCHE : 12  
10 SAUF CHI /LA

ETAPE DE RECHERCHE : 13  
12 SAUF ITA /LA

RESULTATS : 241

*Une page d'édition de  
références en différé  
sur PASCAL*

## -1- 3170669 C.PASCAL

NO PASCAL : INRA.83-X-0429368  
 ENGLISH TITLE : MALE GAMETOPHYTE NUCLEAR DNA CONTENT EVOLUTION  
 DURING ANDROGENIC INDUCTION IN DATURA INNOXIA MILL.  
 AUTEUR(S) : SANGWAN-NORREEL B. S.  
 AFFILIATION : LAB. CYTOLOGIE MORPHOGENESE VEGETALES/PARIS  
 75230/FRA  
 TYPE DOCUMENT : TP,LA  
 SOURCE : Z. PFLANZENPHYSIOL., DEU; DA. 1983; VOL. 111; NO 1;  
 PP. 47-54; BIBL. 2 P.; LOC. INRA/P234  
 LANGUE : ENG  
 CODE CLASSEMENT : 381.F.05.E  
 DESCRIPT. FRANCO.: CULTURE TISSU; ANTHERE; TENEUR; DNA; GAMETOPHYTE;  
 MALE; EMBRYON, HOMOZYGOTIE; MICRODENSITOMETRIE;  
 DATURA INNOXIA; PLANTE MEDICINALE; ANDROGENESE  
 ENGLISH DESCRIPT: TISSU CULTURE, ANTHER; CONTENT; DNA; GAMETOPHYTE;  
 MALE; EMBRYO; HOMOZYGOZITY; MICRODENSITOMETRY;  
 DATURA INNOXIA; MEDICINAL PLANT

## -2- 3156755 C.PASCAL

NO PASCAL : INRA.83-X-0414585  
 ENGLISH TITLE : OAT ANther CULTURE: GENOTYPE EFFECTS ON CALLUS  
 INITIATION AND THE PRODUCTION OF A HAPLOID PLANT  
 AUTEUR(S) : RINES H. W.  
 AFFILIATION : ARS, UNIV. MINNESOTA, DEP. AGRONOMY PLANT  
 GENETICS/ST. PAUL MN 55108/USA  
 TYPE DOCUMENT : TP,LA  
 SOURCE : CROP. SCI./CROP SCIENCE; ISSN 0011-183X; USA; DA.  
 1983; VOL. 23, NO 2; PP. 268-272; BIBL. 23 REF.;  
 LOC. CNRS-1533  
 LANGUE : ENG  
 CODE CLASSEMENT : 363.A.16.B; 381.F.06.C  
 DESCRIPT. FRANCO.: CULTURE TISSU, ANTHERE; HAPLOIDIE; REGENERATION;  
 AVENA SATIVA; VEGETAL; PLANTE CEREALIERE  
 ENGLISH DESCRIPT: TISSU CULTURE, ANTHER; HAPLOIDY; REGENERATION; AVENA  
 SATIVA; VEGETALS; CEREAL CROP

## -3- 3147438 C.PASCAL

NO PASCAL : INRA.83-X-0404064  
 ENGLISH TITLE : SEED SET IN 4X X 2X CROSSES AS RELATED TO 2N  
 POLLEN FREQUENCY  
 AUTEUR(S) : SCHROEDER S. H.; PELOQUIN S. J.  
 AFFILIATION : UNIV. WISCONSIN, DEP. HORTICULTURE GENETICS/MADISON  
 WI 53706/USA  
 TYPE DOCUMENT : TP,LA  
 SOURCE : AM. POTATO J., USA; DA. 1983; VOL. 60; NO 7; PP.  
 527-536; ABS. SPA; BIBL. 21 REF.; LOC. INRA-PATHOL.  
 LANGUE : ENG  
 CODE CLASSEMENT : 331.F.06.C  
 DESCRIPT. FRANCO.: FRUCTIFICATION; GRAINE; HYBRIDE; TETRAPLOIDIE;  
 DIPLOIDIE; HAPLOIDIE; SOLANUM TUBEROSUM; PLANTE

stratégie n° 2  
sur BIOSIS.

? S CC=32500; F ANTHOR DR POLLEN?; S BC=252?; S BC=255?  
24 145249 CC=32500  
25 790 ANTHOR  
26 9066 POLLEN?  
(W)S(W)BC=252?  
SET NUMBER SYNTAX ERROR  
(W)S(W)BC=255?  
SET NUMBER SYNTAX ERROR  
27 9556 25+26  
? S TC=252?  
S TC=252?  
INPUT I/O ERROR  
? C 24 OAND 27  
28 586 24 AND 27  
? F BC=25200S BC=25200  
29 23240 BC=25200  
? C 28 AND 29  
30 17 28 AND 29  
? S BC= 25202; S BC=25500; C 31 OR 32; C 33 AND 28  
31 944 BC=25202  
32 1871 BC=25500  
33 2137 31 OR 32  
34 0 33 AND 28  
? T 30/6/1-5

TYPE 30/6/1-5  
72055150 Biological Abstracts  
PROSPECTS OF FREEZE PRESERVATION OF PLANT TISSUE CULTURES

70020667 Biological Abstracts  
THE USE OF PLANT CULTURE IN AGRICULTURAL SCIENCE AND PRACTICE

69020671 Biological Abstracts  
TECHNOLOGY AND PROSPECTS OF CRYO PRESERVATION OF GERM-PLASM

69002745 Biological Abstracts  
NATURAL AND INDUCED HA PLOIDS AND THEIR IMPORTANCE

65000028 Biological Abstracts  
PRODUCTION AND UTILIZATION OF ANTHOR DERIVED HA PLOIDS IN CROP  
PLANTS

? S BC=25375; S BC=25345; C 28 AND 35; C 28 AND 36  
35 1976 BC=25375  
36 14603 BC=25345  
37 0 28 AND 35  
38 40 28 AND 36  
? T 38/6/1-5

TYPE 38/6/1-5  
77014825 Biological Abstracts  
EFFECT OF TOLUIDINE BLUE ON POLLEN GERMINATION AND DIVISION OF  
GENERATIVE CELLS IN-VITRO IN 5 SPECIES OF THE LILIACEAE

76087741 Biological Abstracts  
ANTHOR CULTURE OF HORDEUM-VULGARE GENOTYPIC EFFECT AND INFLUENCE  
OF A COLCHICINE ANTHOR PRE TREATMENT

75083516 Biological Abstracts  
DIS ORIENTED GROWTH OF POLLEN TUBES OF LILIUM-LONGIFLORUM INDUCED  
BY PROLONGED TREATMENT WITH THE CALCIUM CHELATING ANTIBIOTIC  
CHLORTETRACYCLINE

75061718 Biological Abstracts  
POLY HA PLOID PRODUCTION THROUGH ANTHOR CULTURE IN COMMON WHEAT

75026205 Biological Abstracts  
STUDIES ON THE ANTHOR CULTURE OF HORTICULTURAL CROPS 4.  
REGENERATION OF PLANTLETS FROM SHOOTS OBTAINED THROUGH THE ANTHOR  
CULTURE OF ASPARAGUS-OFFICINALIS

? CS BC=25305; C 39 AND 28  
39 11031 BC=25305  
40 0 39 AND 28



TYPE 40/6/1-5  
77024150 Biological Abstracts  
HYBRIDS BETWEEN AGROPYRON-TACHYCAULUM AND AGROPYRON-INTERMEDIUM  
77014697 Biological Abstracts  
GENETIC AND HISTOLOGICAL EVIDENCE FOR MICRO SPORE ORIGIN OF ANTHOR  
DERIVED PLANTS OF RICE ORYZA-SATIVA  
77014693 Biological Abstracts  
EFFECTS OF OSMOLALITY CYTO KININ AND ORGANIC ACIDS ON POLLEN  
CALLUS FORMATION IN TRITICALE ANTHERS  
76087741 Biological Abstracts  
ANTHER CULTURE OF HORDEUM-VULGARE GENOTYPIC EFFECT AND INFLUENCE  
OF A COLCHICINE ANTHOR PRE TREATMENT  
76077162 Biological Abstracts  
ANTI IDIOTYPE REGULATION OF THE FORMATION OF IMMUNO GLOBULIN E  
ANTIBODY TO TIMOTHY GRASS POLLEN 2. IN-VITRO INDUCTION OF SUPPRESSOR  
T CELLS IN MINI MARBROOK CULTURES  
? S BC=25325; C 28 AND 41  
41 1084 BC=25325  
42 1 28 AND 41  
? T 42/6/1

TYPE 42/6/1  
65026393 Biological Abstracts  
POLLEN VIABILITY IN SOME IRIS SPECIES FROM PRIMORYE USSR  
? S BC=25235; C 28 AND 43  
43 968 BC=25235  
44 1 28 AND 43  
? T 44/1/6/1

TYPE 44/6/1  
16054644 Biological Abstracts/RRM  
EFFECT OF SUCROSE LEVEL MEDIUM COMPOSITION AND PH ON THE IN-VITRO  
GERMINATION OF POLLEN FROM SPATHIPHYLLUM-FLORIBUNDUM AND  
VRIESEA-MALZINEI  
? C 30 OR 38 OR 44  
45 58 30 OR 38 OR 44

? TPR 45/4/1-50  
Printed 45/4/1-50  
? PR 40/4/2-20  
Printed 40/4/2-20  
? S CONTAT ANNE  
46 R CONTAT ANNE

Une page d'édition de références en différé  
sur BIOSIS

USER 862 PAGE 5 (ITEM 17 OF 19)

75060208 Biological Abstracts

ANTHER DEVELOPMENT MEIOSIS AND POLLEN FORMATION IN ZEA-MAYS TASSELS  
CULTURED IN DEFINED LIQUID MEDIUM

POLOWICK P L; GREYSON R I

DEPARTMENT OF PLANT SCIENCES, UNIVERSITY OF WESTERN ONTARIO, LONDON,  
ONTARIO N6A 5B7, CANADA

PLANT SCIENCE LETTERS(NETHERLANDS) 1982. Vol 26, no 2-3 p139-146,  
English Coden: PTSLA

Concept Codes: 02504/ 10062/ 32500-/ 51000/ 51510\*/ 51512-/ 51514-/  
51524/ 52504

BioSystematic Codes: 25305

Terms: KINETIN

75054035 Biological Abstracts

POLLEN CALLUS CULTURE IN TRITICUM-AESTIVUM

WEI Z M

DIVISION OF CELL PHYSIOLOGY, SHANGHAI INSTITUTE OF PLANT PHYSIOLOGY,  
ACADEMIA SINICA, 3000 FONGLIN ROAD, SHANGHAI 200032, CHINA

INTERNATIONALE ZEITSCHRIFT FÜR THEORETISCHE UND ANGEWANDTE  
GENETIK(WEST GERMANY) 1982. Vol 63, no 1 p71-73, English Coden: THAGA

Concept Codes: 03504-/ 10060/ 10614/ 11107/ 23001/ 25508/ 32500-/  
51000/ 51503-/ 51510-/ 51512-/ 51524/ 52504\*

BioSystematic Codes: 25305

Terms: PLANTLETS REGENERATION

75052476 Biological Abstracts

DIFFERENTIATION POTENTIAL AND CHROMOSOME STABILITY OF POLLEN CALLUS  
OF MAIZE IN SUB CULTURES

GU M-G; ZHANG X-Q; CAO Z-Y; GUO C-Y

INST. GENETICS, ACADEMIA SINICA

ACTA BOTANICA SINICA(CHINA) 1982. Vol 24, no 4 p319-325, Chinese  
Coden: CHWA

Concept Codes: 02504/ 03504-/ 32500/ 50100/ 51510\*/ 51512/ 51524/  
52504

BioSystematic Codes: 25305

Terms: TOTIPOTENCY PLOIDY

? IN VITRO

\*\*\* 1 \*\*\* RESULTAT :

? CRUCIFERES OU GRAMINÉES

\*\*\* 2 \*\*\* RESULTAT : 437

PROCEDURE OU ETAPE DE RECHERCHE 3  
? 2 ET 1

\*\*\* 3 \*\*\* RESULTAT : 3

PROCEDURE OU ETAPE DE RECHERCHE 4  
? M:PO

\*1\*

REFER : 83-18786

NDOC : INRA-VERSAILLES-P4171

AUT : ROUSSELLE, P.; EBER, F.

TIT : CROISEMENTS INTERSPECIFIQUES ENTRE QUELQUES BRASSICAE <CHOUX, MOUTARDES> ET BRASSICA NAPUS L. ANALYSE GENOMIQUE DES HYBRIDES ET PERSPECTIVES D'OBTENTION DE SYSTEMES D'ANDROSTERILITE CHEZ LE COLZA <STERILITE MALE, CYTOGENETIQUE, CULTURE D'EMBRYON IN VITRO, FERTILITE POLLINIQUE>

REV : AGRONOMIE; (FRA)

NUMREV : 2

DCA : 1983

CO : P.153-159;3V.3

P(OS.) NN? PP? PS?/E(LIM.)/V(IDEO) OU M(ICROF.)/CONTI.(O/N) ?  
?

<STERILITE MALE, CYTOGENETIQUE, CULTURE D'EMBRYON IN VITRO, FERTILITE POLLINIQUE>

REV : AGRONOMIE; (FRA)

NUMREV : 2

DCA : 1983

CO : P.153-159;3V.3

P(OS.) NN? PP? PS?/E(LIM.)/V(IDEO) OU M(ICROF.)/CONTI.(O/N) ?  
?0

\*2\*

REFER : 79-29258

NDOC : INRA-VERSAILLES

AUT : HENRY, M.; MARIE, B.; GUIGNARD, J.L.

TIT : LA REGENERATION DE PLANTES ENTIERES A PARTIR DE CULTURE DE CELLULES IN VITRO CHEZ CHEIRANTHUS CHEIRI L. ET CARDAMINE PRATENSIS L. (CRUCIFERES)

REV : BULLETIN DE LA SOCIETE BOTANIQUE DE FRANCE; (FRA)

DATREV : 1979

CO : V. 126(2) P. 143-147

P(OS.) NN? PP? PS?/E(LIM.)/V(IDEO) OU M(ICROF.)/CONTI.(O/N) ?  
?

IN VITRO CHEZ CHEIRANTHUS CHEIRI L. ET CARDAMINE PRATENSIS L. (CRUCIFERES)

REV : BULLETIN DE LA SOCIETE BOTANIQUE DE FRANCE; (FRA)

DATREV : 1979

CO : V. 126(2) P. 143-147

P(OS.) NN? PP? PS?/E(LIM.)/V(IDEO) OU M(ICROF.)/CONTI.(O/N) ?  
?0

\*3\*

REFER : 79-21130

NDOC : INRA-VERSAILLES

AUT : MARGARA, J.

TIT : MISE AU POINT D'UNE GAMME DE MILIEUX MINERAUX POUR LES COURTES

stratégie de recherche  
n° 3 sur RESAGRI

Edition des  
Références

