

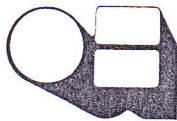
I.R.S.I.A.  
Institut pour l'Encouragement de la Recherche  
Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture  
Rue de Crayer, 6  
B-1050 Bruxelles (Belgique)

## VITROCULTURE ET PHYTOPATHOLOGIE

(Synthèse des recherches 1982-1992)

**C. ANCEAU, P. LEPOIVRE, J. SEMAL**

**JUIN 1994**



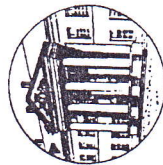
*I.R.S.I.A. - Institut pour l'Encouragement de la  
Recherche Scientifique dans l'Industrie et  
l'Agriculture  
rue De Crayer 6, 1050 Bruxelles*

## VITROCULTURE ET PHYTOPATHOLOGIE

(Synthèse des recherches 1982-1992)

Publication réalisée dans le cadre du  
Centre de Lutte Intégrée en Phytopathologie (I.R.S.I.A.)

Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux



C. ANCEAU, P. LEPOIVRE, J. SEMAL

JUIN 1994

## PREFACE

La recherche en matière d'amélioration des plantes dans le domaine phytopathologique présente des caractéristiques particulières. Les ennemis à combattre sont à la fois très divers et génétiquement instables. C'est dire qu'il s'agit de phénomènes d'interactions hôte x pathogène complexes dont l'étude requiert des travaux de longue durée.

Au cours de la première moitié du 20ème siècle, l'introduction de gènes de résistance via l'hybridation interspécifique a joué un rôle bénéfique majeur, tout en rencontrant rapidement des limites tant technologiques qu'économiques. Il s'agissait le plus souvent de résistances s'exprimant par hypersensibilité, et aboutissant rapidement à des « écroulements » résultant de la sélection de nouveaux biotypes virulents au sein des populations de parasites. Par ailleurs, la durée des cycles de végétation, spécialement chez des plantes ligneuses, rend de tels programmes de sélection très coûteux.

Au début des années 80 s'ouvrait une ère nouvelle avec le développement des biotechnologies végétales. Des progrès importants se concrétisaient en matière de vitroculture des végétaux cultivés. D'une part, la vitropropagation conforme devait permettre d'obtenir des quantités quasi illimitées de descendants à partir d'un seul individu, tandis que d'autre part, un nouveau mode d'obtention de génotypes variants était mis en évidence via la culture *in vitro* en conditions de propagation non conforme. Enfin, certains résultats laissaient entrevoir la possibilité de méthodes de sélection de plantes résistantes aux agents pathogènes via des techniques basées sur la vitroculture.

Les recherches présentées dans le présent ouvrage ont porté sur l'identification des potentiels de la vitroculture en vue de la sélection pour la résistance des plantes aux maladies, tout en déterminant les limites d'utilisation de cette approche.

Nous avons pu bénéficier à cet effet de plusieurs facteurs synergiques: l'I.R.S.I.A. qui a financé notre Centre de Recherches, la Faculté de Gembloux qui nous a apporté le concours de son potentiel humain et de ses infrastructures et l'appui des Stations de Recherche qui ont constitué l'aval indispensable à nos travaux.

Tout au long de nos recherches, nous avons rencontré auprès de nos interlocuteurs de l'I.R.S.I.A. à la fois rigueur et courtoisie, assorties de conseils avisés tant en matière de programmation que pour ce qui concerne l'évaluation des résultats. Nous exprimons toute notre reconnaissance à l'égard de la Direction et des Conseillers de l'I.R.S.I.A. pour cette parfaite synergie.

Que les Autorités et nos Collègues de la Faculté de Gembloux, ainsi que des différentes Stations de Recherche avec lesquelles nous avons collaboré, reçoivent ici l'expression de nos remerciements et de notre estime.

P. LEPOIVRE

J. SEMAL

## AVERTISSEMENT

Le présent ouvrage présente et discute les travaux réalisés entre 1982 et 1992 par le Centre de Lutte Intégrée en Phytopathologie (C.L.I.P.), subsidié par l'Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (I.R.S.I.A.).

Ces recherches ont été réalisées dans le cadre du Laboratoire de Pathologie végétale de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, par Christine ANCEAU, Marc MEULEMANS et Jacques VISEUR sous la direction de Jean SEMAL et Philippe LEPOIVRE.

Elles ont bénéficié de la collaboration de Mmes Dominique DUCHENE et Anne BEHRIN, assistantes attachées au CLIP, du Dr. J. KUMMERT, assistant au Centre de Phytovirologie (I.R.S.I.A.), ainsi que de l'assistance technique de Mme Marie-Louise LALLEMAND-BOULLE, MM Jean DERAECK, Christian JOSSE et Angelo LOCICERO.

Nous remercions Mmes Anne-Marie POLLART, Eliane SCHIFFERS, Paulette WERA et M. Francisco BELMONTE CESPEDES pour leur aide précieuse dans la mise en oeuvre des programmes CLIP.

Ont également participé à certaines recherches, le Professeur Paul SEILLEUR et le Dr. Patrick du JARDIN, de l'Unité de Génétique et Amélioration des Plantes de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, ainsi que les étudiants et les doctorants Abdallah BEN ABDALLAH, Jorge CABRA, Koenraad DUHEM, Ligia GUTTIEREZ, Samir EL JAAFARI, Eiko KURAMAE, Marie-Odile LUTUN, Khosro PIRI, Jorge ROJAS et Lijian ZHANG.

Les essais d'évaluation des pommes de terre au champ ont été réalisés en étroite association avec la Station de Haute Belgique à Libramont (MM. Robert BISTON et Guy FOUARGE). Les

travaux sur le poirier ont bénéficié de la collaboration de la Koninklijk Opzoekingsstation van Gorsem (MM. Clement VERHEYDEN et Tom DEKKERS) et de la Station des Cultures Fruitières et Maraîchères de Gembloux (M. Philippe BOXUS). Les souches de *Fusarium culmorum* nous ont été aimablement fournies par M. Marc CAVELIER, de la Station de Phytopathologie de Gembloux. Les recherches sur le blé ont reçu l'appui de la Station d'Amélioration des Plantes de Grande Culture de Gembloux (MM. Georges CLAMOT et Jean VANDAM).

## TABLE DES MATIERES

|  |    |
|--|----|
| Préface  | 3  |
| Avertissement  | 5  |
| Table des matières   | 7  |
| <b>Chapitre 1. Introduction</b>  | 9  |
| <b>Chapitre 2. La pomme de terre</b>   | 13 |
| 2.1. Techniques d'amélioration de la pomme de terre  | 13 |
| 2.2. Vitroculture chez la pomme de terre   | 14 |
| 2.3. Vitrosélection chez la pomme de terre   | 18 |
| 2.3.1. <i>Phytophthora infestans</i> , agent du mildiou  | 18 |
| a. Vitrosélection  | 19 |
| b. Sélection au champ  | 22 |
| 2.3.2. <i>Streptomyces scabies</i> , agent de la gale commune  | 24 |
| a. Vitrosélection  | 25 |
| b. Sélection en serre  | 25 |
| c. Sélection au champ  | 27 |
| 2.3.3. Virus Y de la pomme de terre  | 28 |
| a. Sélection en serre  | 30 |
| b. Sélection au champ  | 30 |
| 2.3.4. <i>Erwinia carotovora ssp. atroseptica</i> , agent de la jambe noire des tiges et de la pourriture molle du tubercule       | 31 |
| a. Vitrosélection  | 33 |
| b. Sélection en serre  | 33 |
| 2.4. Caractérisation moléculaire des variants de pomme de terre  | 34 |
| 2.4.1. Origine de la variation somaclonale   | 34 |
| 2.4.2. Recherche de marqueurs protéiques   | 36 |
| 2.4.3. Recherche de marqueurs au niveau du DNA   | 36 |
| a. Clonage de séquences de DNA de pomme de terre en vue de la constitution des sondes pour une étude de type « RFLP » des variants | 37 |

- b. Recherche de polymorphismes de restriction du DNA entre les variants et le cultivar Désirée originel 40
- c. Nature des régions chromosomiques polymorphes entre les variants et le cultivar d'origine 42

### Chapitre 3. Le blé tendre

- 3.1. Techniques d'amélioration du blé 45
- 3.2. Vitroculture chez le blé tendre 45
  - 3.2.1. Variation somaclonale 46
  - 3.2.2. Haplodiploïdisation par culture *in vitro* d'anthers (androgénèse) 47
    - a. Organogénèse 47
    - b. Embryogénèse 50
  - 3.2.3. Variation gamétoclonale 51
- 3.3. Sélection du blé vis-à-vis d'agents pathogènes 53
  - 3.3.1. Vitrosélection vis-à-vis de *Septoria nodorum* 53
  - 3.3.2. Sélection pour la résistance du blé vis-à-vis de *Fusarium culmorum* 53
    - a. Evaluation comparée de la résistance au champ de variétés de blé 55
    - b. Recherche de critères précoces d'évaluation 61

### Chapitre 4. Le poirier et le pommier

- 4.1. Vitroculture du poirier et du pommier 63
- 4.2. Technique de criblage pour la résistance vis-à-vis de l'agent du feu bactérien 63
- 4.3. Sélection de variants somaclonaux de poiriers et de pommiers résistants au feu bactérien 66

### Chapitre 5. Conclusions générales

- 5.1. Obtention des variants 73
- 5.2. Techniques de sélection 74
- 5.3. Caractérisation moléculaire des variants 75
- 5.4. Valorisation des résultats 76
- 5.5. Perspectives d'avenir 77

### Summary

### Bibliographie

79  
81

## CHAPITRE 1. INTRODUCTION

Classiquement, l'obtention de plantes cultivées résistantes ou tolérantes vis-à-vis d'agents de stress repose sur l'exploitation d'une variabilité préexistante ou à créer. La sélection des génotypes résistants ou tolérants s'opère ensuite en exposant les individus ou les populations aux facteurs perturbants et en retenant les types qui expriment les comportements les plus favorables. Ces types sont analysés quant à l'expression du nouveau caractère dans la descendance sexuée ou lors de la propagation végétative. On retient ceux chez lesquels le caractère nouveau est homogène et stable dans la descendance; on les soumet ensuite à des essais comparatifs multiloceaux, puis on les introduit dans les conditions et à l'échelle de la pratique de production. L'ensemble de ce processus dure normalement plus de 10 ans.

La culture des végétaux *in vitro* (ou vitroculture) s'est développée depuis les années 1950, suite à la découverte du rôle des facteurs de croissance induisant les différentes phases du développement des bourgeons, des tiges et des racines en milieu de culture artificiel. Il en est résulté un foisonnement de techniques visant à régénérer des plantes complètes à partir d'explants divers obtenus par dissociation des organes, tissus ou cellules: bourgeons (nocuds), méristèmes, entrenœuds, feuilles, fleurs, pollen, ovules, cellules isolées, protoplastes.

L'exploitation de ces différentes techniques de culture *in vitro* s'est faite dans deux directions principales: d'une part la propagation clonale rapide et conforme, et d'autre part l'obtention de nouveaux génotypes via la vitrovariation (variants induits par la culture *in vitro*) ou par le génie génétique (incorporation de DNA exogène dans le génome d'une plante).

Au début des années 1980, notre laboratoire s'est orienté vers l'étude de la vitroculture de végétaux cultivés en tant que source de variabilité et comme outil de sélection, en vue d'évaluer les

techniques susceptibles d'être mises en oeuvre à cet effet et d'en apprécier les limites d'utilisation.

L'objectif de ces recherches, initiées en 1982 dans le cadre du CLJP, visait à évaluer les techniques de sélection de génotypes végétaux pour leur résistance ou leur tolérance vis-à-vis d'agents phytopathogènes.

Un tel projet postule quatre étapes fondamentales:

- (1) l'induction d'une variabilité,
- (2) la sélection rapide des types résistants ou tolérants,
- (3) la caractérisation des types sélectionnés,
- (4) l'évaluation pratique des types sélectionnés.

Plusieurs modèles ont été étudiés chez trois espèces végétales très différentes: la pomme de terre, le blé tendre et le poirier, avec, dans chaque cas, des agents pathogènes particulièrement dommageables (tableau 1).

En ce qui concerne l'induction de la variabilité, les techniques suivantes ont été utilisées:

- chez la pomme de terre: la variation somaclonale,
- chez le blé: la variation gamétoclonale via l'haploïdisation et l'hybridation,
- chez le poirier: la variation somaclonale.

Comme agents pathogènes vis-à-vis desquels la résistance ou la tolérance était recherchée, on a choisi parmi ceux qui causent des maladies particulièrement menaçantes pour l'espèce ou la variété considérée.

Pour ce qui concerne les variétés de pomme de terre Bintje et Judith, nous avons retenu la maladie du mildiou qui leur est particulièrement dommageable. La variété Désirée étant très sensible à la « gale commune » et à la « jambe noire », représentait un modèle adéquat pour la recherche de résistance à ces deux maladies. La sensibilité au virus Y de la variété Roxane, qui limite l'exploitation de cette variété, a également retenu notre attention.

Chez le blé, nous avons retenu la septoriose et la fusariose, deux maladies fongiques de l'épi prenant une importance croissante au cours de la période de nos recherches.

Pour ce qui est du poirier, nous avons étudié le feu bactérien, introduit en Belgique à l'époque où ont débuté nos travaux.

**Tableau 1.** Couples hôte-parasite ayant fait l'objet d'une recherche de technique de sélection via la vitroculture

| HOTE                                     | AGENT PATHOGENE  |
|--|--|
| Pomme de terre: cv. Bintje<br>cv. Judith | <i>Phytophthora infestans</i><br>(agent du mildiou)  |
| cv. Désirée                              | <i>Streptomyces scabies</i><br>(agent de la gale commune)<br><i>Erwinia carotovora</i><br>(agent de la jambe noire et de la pourriture molle du tubercule) |
| cv. Roxane                               | Virus Y  |
| Blé (diverses variétés)                  | <i>Septoria nodorum</i><br>(agent de la septoriose)<br><i>Fusarium culmorum</i><br>(agent de la fusariose de l'épi)  |
| Poirier cv. Durondeau                    | <i>Erwinia amylovora</i><br>(agent du feu bactérien)   |

## CHAPITRE 2. LA POMME DE TERRE

### 2.1. Techniques d'amélioration de la pomme de terre

La propagation végétative par tubercules, voie de multiplication classique de la pomme de terre, assure généralement une transmission conforme et homogène des caractères au cours des générations successives. Par ailleurs, l'obtention de nouvelles variétés par semis de graines botaniques résultant de l'hybridation est connue de longue date. L'introduction de nouveaux génotypes en provenance d'Amérique du Sud, ainsi que le choix judicieux des géniteurs dans la réalisation de croisements, allaient contribuer à la diversification des pommes de terre cultivées en Europe aux 19ème et 20ème siècles. La sélection fut orientée vers l'obtention de types plus trapus, à photopériode et thermopériode adaptées, avec un accroissement de la surface foliaire, un raccourcissement des stolons, une réduction du nombre de tubercules et une augmentation de leur volume.

Par ailleurs, le développement de maladies telles le mildiou et les viroses, liées aux nouvelles introductions de pomme de terre en Europe et en Amérique du Nord au 19ème siècle, fit prendre en compte le problème de la résistance des nouveaux cultivars vis-à-vis de ces agents pathogènes.

A la fin du siècle dernier et au début du 20ème siècle, les améliorateurs ont perçu l'avantage d'exploiter la diversité génétique des espèces sauvages proches de la pomme de terre cultivée, *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*, pour y introduire de nouveaux caractères, le plus souvent liés à la résistance aux maladies. Cependant, le croisement des *S. tuberosum* cultivés avec des types sauvages pose de nombreux problèmes. En effet, la plupart des variétés cultivées sont tétraploïdes ( $4x = 48$  chromosomes), alors que bon nombre d'espèces sauvages de *Solanum* sont diploïdes. Il fallut donc passer par des croisements intermédiaires.

Aujourd'hui, de nombreuses variétés de pomme de terre contiennent des gènes provenant d'espèces sauvages et les hybridations interspécifiques ont certainement encore une place dans l'amélioration pour la résistance aux maladies chez cette plante. Toutefois, l'utilisation de l'hybridation sexuée est limitée par différents facteurs:

- 1) elle n'est pas applicable aux espèces ou variétés dépourvues de floraison et elle est peu adaptée aux types à propagation végétative, pour lesquels la conformité représente un impératif majeur.
- 2) elle fournit généralement des hybrides porteurs de facteurs de résistance aux maladies qui sont mono- ou oligogéniques, vis-à-vis desquels les populations de parasites développent rapidement des souches pathogènes virulentes, ce qui aboutit à l'« effondrement » de la résistance introduite.
- 3) elle est inapplicable dans nombre de cas où les gènes de résistance/tolérance ne sont pas disponibles dans les génotypes susceptibles de fournir des hybrides acceptables par les utilisateurs.
- 4) elle nécessite des durées très longues pour la fixation et la caractérisation des hybrides.

## 2.2. Vitroculture chez la pomme de terre

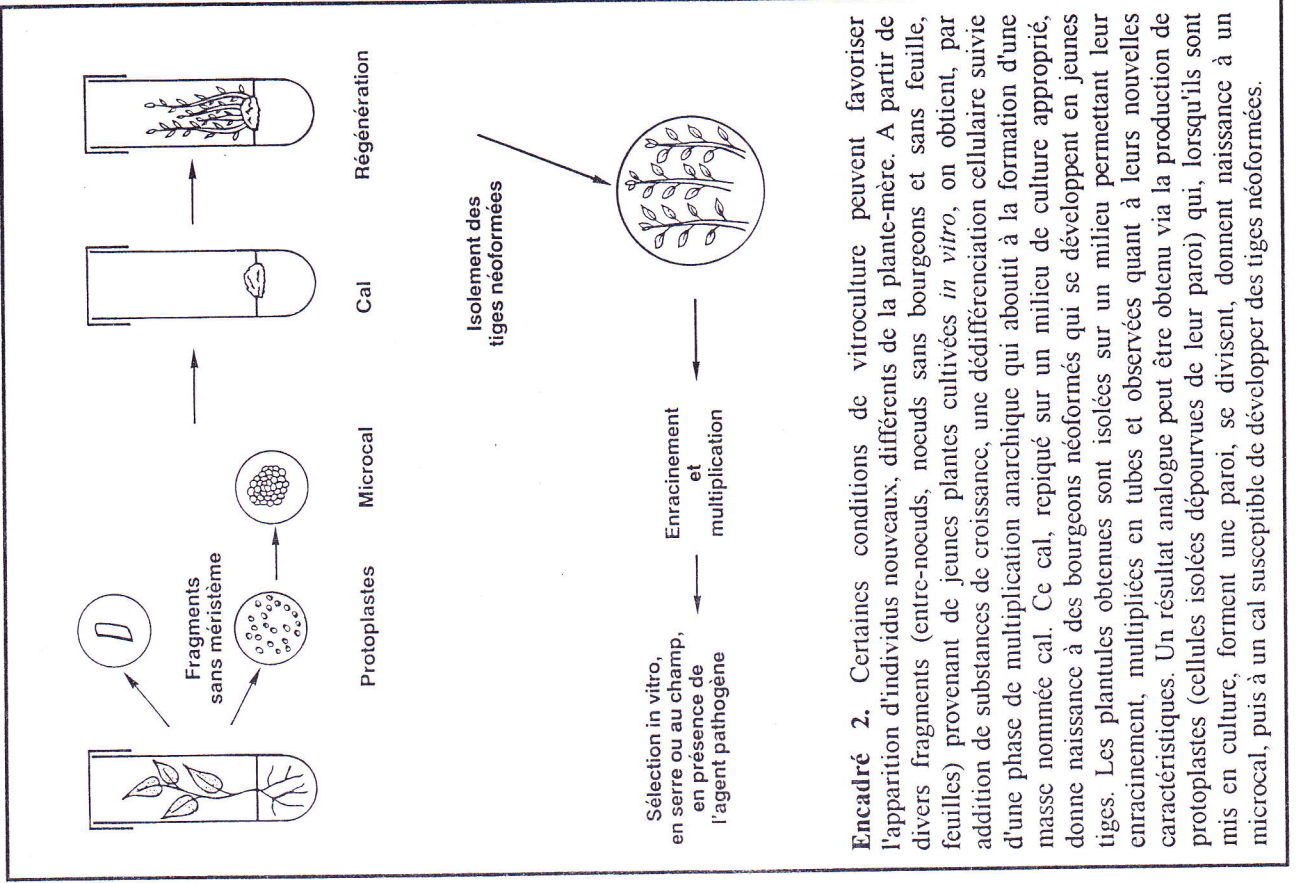
La multiplication végétative classique de la pomme de terre garantit la conformité variétale; elle présente toutefois le risque d'entraîner au fil des ans l'accumulation de différents agents pathogènes (bactéries, champignons, viroïdes, virus). Or, le potentiel de production dépend, à côté des caractéristiques génétiques de la variété, de la qualité sanitaire du plant et de la vigueur des tubercules-mères.

Depuis les années 1950, la multiplication conforme *in vitro* a constitué un outil performant appliqué à la pomme de terre. Les techniques de culture *in vitro*, associées aux méthodes sérologiques de diagnostic rapide des maladies virales, ont permis l'assainissement, la mise en culture, la conservation et la multiplication par microbouturage ou par microtubérisation de nombreuses variétés de pomme de terre.

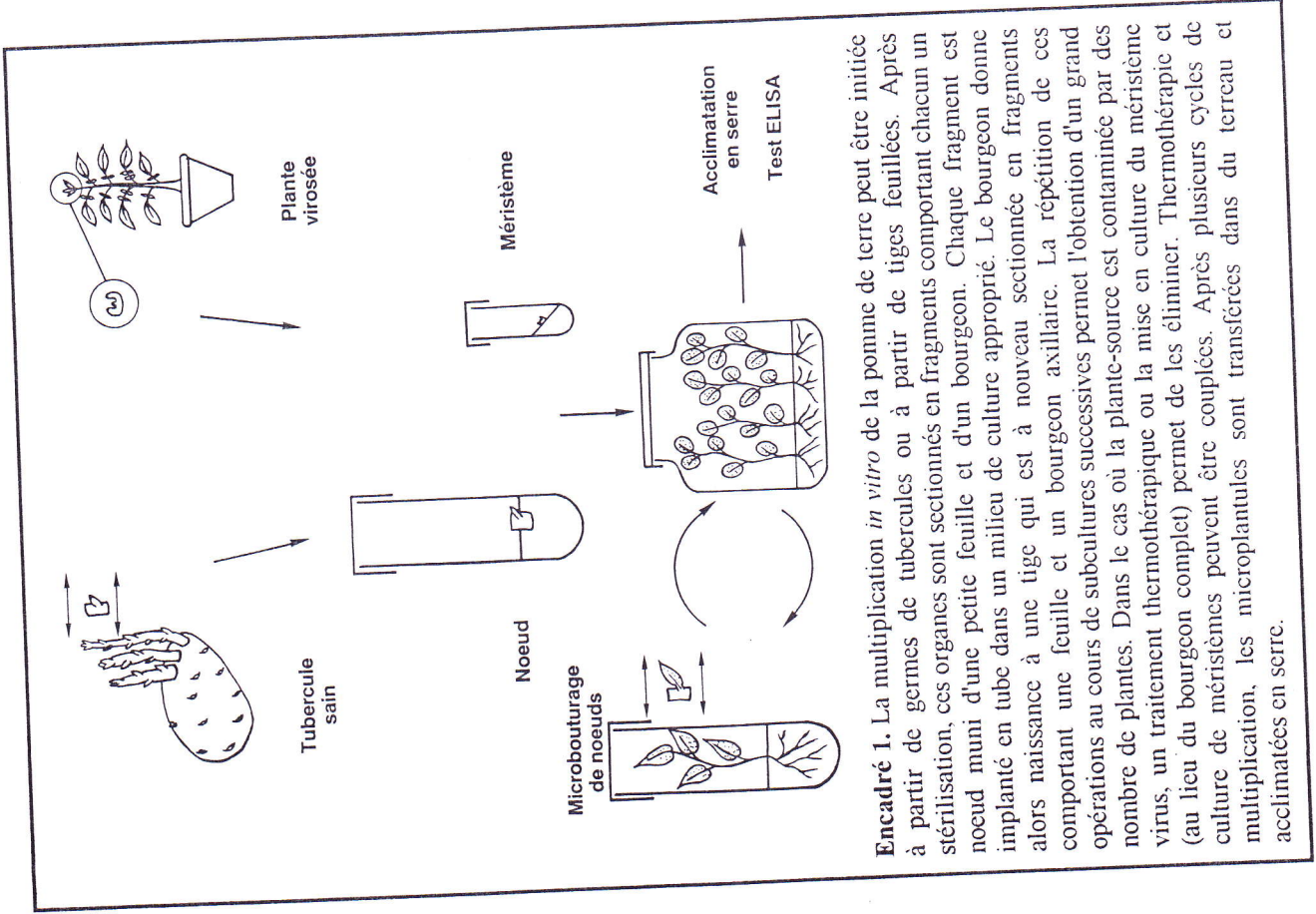
Elles permettent de contrôler l'état sanitaire et d'assurer la diffusion rapide des variétés, tout en maintenant leur conformité (voir encadré 1).

Dans un premier temps, la vitroculture a été utilisée comme une méthode sophistiquée de propagation asexuée, offrant un taux de multiplication élevé. On considérait que les descendants obtenus étaient identiques au type parental, ce qui était globalement vrai lors de l'utilisation d'explants méristématiques ou de bourgeons axillaires préexistants (noeuds).

Par ailleurs, des plantes de pommes de terre ont pu être régénérées *in vitro* à partir d'explants divers, dépourvus de méristème préexistant: limbes foliaires, rachis, pétioles, entre-noeuds, racines ou fragments de tubercules ébourgeonnés. Les bourgeons adventifs proviennent alors de cellules ayant conservé un caractère méristématique ou capables de différenciation. Grâce à la présence de régulateurs de croissance adéquats, un cal se forme à la base de l'explant (phase de callogénèse). En modifiant les rapports hormonaux, des bourgeons sont néoformés au niveau du cal et vont se développer en microplantules (phase de caulogénèse). Celles-ci sont ensuite isolées et placées sur un milieu d'enracinement. On a observé dans certains cas des modifications phénotypiques par rapport au pied-mère, principalement lorsque les explants subissaient une phase de différenciation cellulaire au sein d'un cal (voir encadré 2). En 1981, Larkin et Scowcroft voient dans ce type de modifications une source nouvelle de variabilité qu'ils ont appelée « variation somaclonale ». Rietveld *et al.* (1991) notent les grandes potentialités d'exploitation de la variation somaclonale, principalement chez les plantes à multiplication asexuée. La pomme de terre est particulièrement concernée, en raison de la difficulté à intégrer des caractères nouveaux dans ses génomes polyploïdes. La culture de cellules et de protoplastes engendre également une variation parmi les plantes régénérées par passage via la callogénèse. Les protoplastes sont obtenus par macération des tissus dans des solutions enzymatiques adéquates (pectinase, cellulase, hémicellulase), ce qui permet la digestion rapide des parois cellulaires. Ils sont cultivés dans des milieux complexes où le contrôle de la pression osmotique est essentiel.



**Encadré 2.** Certaines conditions de vitroculture peuvent favoriser l'apparition d'individus nouveaux, différents de la plante-mère. A partir de divers fragments (entre-noeuds, noeuds sans bourgeons et sans feuille, feuilles) provenant de jeunes plantes cultivées *in vitro*, on obtient, par addition de substances de croissance, une différenciation cellulaire suivie d'une phase de multiplication anarchique qui aboutit à la formation d'une masse nommée cal. Ce cal, repiqué sur un milieu de culture approprié, donne naissance à des bourgeons néoformés qui se développent en jeunes tiges. Les plantules obtenues sont isolées sur un milieu permettant leur enracinement, multipliées en tubes et observées quant à leurs nouvelles caractéristiques. Un résultat analogue peut être obtenu via la production de protoplastes (cellules isolées dépourvues de leur paroi) qui, lorsqu'ils sont mis en culture, forment une paroi, se divisent, donnent naissance à un microcal, puis à un cal susceptible de développer des tiges néoformées.



**Encadré 1.** La multiplication *in vitro* de la pomme de terre peut être initiée à partir de germes de tubercules ou à partir de tiges feuillées. Après stérilisation, ces organes sont sectionnés en fragments comportant chacun un noeud muni d'une petite feuille et d'un bourgeon. Chaque fragment est implanté en tube dans un milieu de culture approprié. Le bourgeon donne alors naissance à une tige qui est à nouveau sectionnée en fragments comportant une feuille et un bourgeon axillaire. La répétition de ces opérations au cours de subcultures successives permet l'obtention d'un grand nombre de plantes. Dans le cas où la plante-source est contaminée par des virus, un traitement thermothérapie ou la mise en culture du méristème (au lieu du bourgeon complet) permet de les éliminer. Thermothérapie et culture de méristèmes peuvent être couplées. Après plusieurs cycles de multiplication, les microplantules sont transférées dans du terreau et acclimatées en serre.

*infestans* virulentes vis-à-vis des nouveaux génotypes « résistants » de pomme de terre se manifeste rapidement, d'autant que depuis quelques années, on observe en Europe et en Amérique du Nord une reproduction sexuée de ce champignon, qui n'existait pas auparavant.

Les variétés de pomme de terre sélectionnées pour leur résistance au mildiou ont rarement connu une forte diffusion et aucune n'est parvenue à supplanter les anciennes variétés sensibles, comme la Bintje, toujours très prisées aujourd'hui pour ses multiples qualités. C'est pourquoi la sélection de variants somaclonaux résistants au mildiou à partir de cette variété a été envisagée, d'autant que la stérilité femelle du cv. Bintje constitue un handicap à une amélioration par hybridation classique. La variété Judith, une obtention de la Station de Libramont particulièrement sensible au mildiou, a également été incluse dans nos essais.

#### a. Vitrosélection vis-à-vis de *Phytophthora infestans*

Un certain nombre de travaux antérieurs ont porté sur la sélection *in vitro* de génotype de pomme de terre résistant au mildiou. Behnke (1979) sélectionne des cals de pomme de terre sur un milieu contenant du filtrat de culture de *P. infestans*. La résistance des plantules régénérées à partir des cals sélectionnés se manifeste par une croissance plus lente des lésions foliaires causées par le champignon. Par co-culture *in vitro* de *P. infestans* et de tissus de pomme de terre, on a mis en évidence que la résistance par hypersensibilité liée à l'introduction de gènes R dans *S. tuberosum* à partir de *S. demissum*, pouvait s'exprimer *in vitro*.

En vue de tester *in vitro* les propriétés de résistance de la pomme de terre vis-à-vis de *P. infestans*, nous avons mis au point une méthode d'inoculation de microplantules croissant en bocal, par pulvérisation axénique d'une suspension de sporanges de *P. infestans* biotype « 0 » (figure 1). L'inoculation par aspersion *in vitro* intègre à la fois le processus de pénétration et de progression du champignon dans le tissu de l'hôte, ainsi que la faculté pour l'agent pathogène d'y sporuler.

Au cours des premières phases de culture, les protoplastes régénèrent une paroi, se divisent et forment des microcolonies (protocoles). Ultérieurement, les cals qui en dérivent (protocals) donnent naissance à la néoformation de plantules. La variation somaclonale est également importante à considérer pour la création de plantes transgéniques (avec incorporation de gènes extérieurs), qui implique généralement une phase de vitroculture. Il faudra distinguer, à cet égard, les effets dus au processus de vitroculture, de ceux liés à la transgénèse.

### 2.3. Vitrosélection chez la pomme de terre

Nous avons exploité la variation somaclonale induite par la culture *in vitro* de la pomme de terre en vue d'obtenir des plantes résistantes vis-à-vis de quatre agents pathogènes: *Phytophthora infestans*, *Streptomyces scabies*, le virus Y et *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*. Des variétés sensibles ont été choisies comme matériel de départ pour chaque agent. Après une phase de développement *in vitro*, nous avons cherché à mettre en oeuvre des méthodes de vitrosélection. La caractérisation des plantes sélectionnées *in vitro* a été effectuée en serre et/ou au champ.

#### 2.3.1. *Phytophthora infestans*, agent du mildiou

La maladie du mildiou est causée par le champignon *Phytophthora infestans*, qui est l'un des parasites ubiquistes les plus importants de la pomme de terre. Les feuilles des variétés sensibles sont rapidement infectées par ce champignon, ce qui peut conduire à une destruction complète du feuillage avec réduction corrélative du rendement. Par ailleurs, l'infection des tubercules peut entraîner des pertes sévères, spécialement durant la conservation, soit par colonisation directe, soit en ouvrant la voie à des agents de pourriture.

Le mildiou est principalement combattu par voie chimique, où il requiert un grand nombre de traitements du feuillage faisant appel à des avertissements. La résistance génétique a été également utilisée pour lutter contre cette maladie, mais l'écroulement de la résistance par sélection de souches de *P.*

**Tableau 2.** Comparaison entre les interactions *in vitro* de microplantules de pomme de terre avec *Phytophthora infestans* et leur résistance au champ vis-à-vis du mildiou

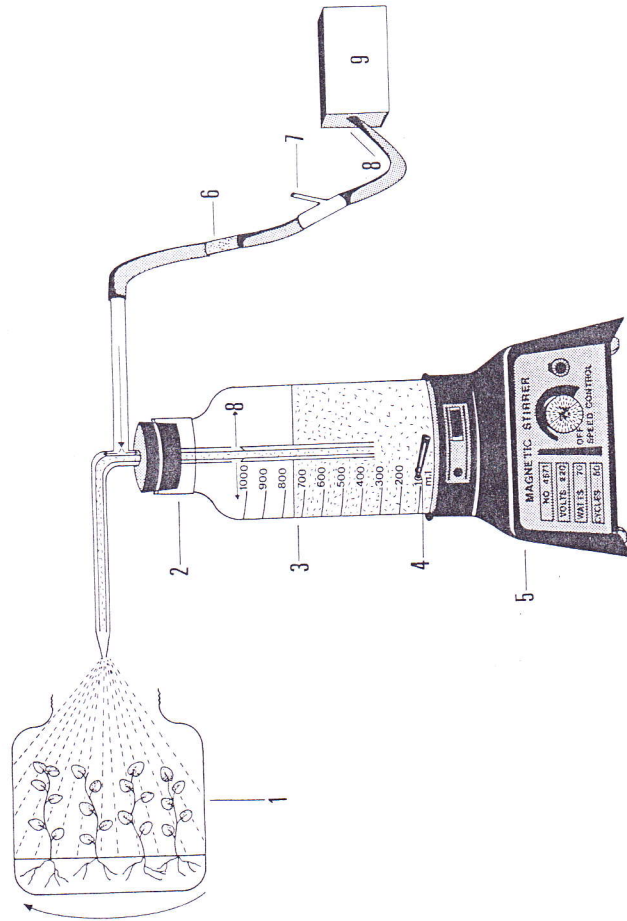
| Génotype de pomme de terre | Infection <i>in vitro</i> de microplantules |                           |                      | Résistance du feuillage au champ (2) |
|----------------------------|---|---------------------------|----------------------|--------------------------------------|
|                            | Durée d'incubation (jours)                  | Indice de sporulation (1) | Indice de maladie(2) |                                      |
| Alpha                      | 3   | 3,3                       | 7,0                  | 5,6                                  |
| Binjje                     | 3   | 4,4                       | 9,0                  | 8,7                                  |
| Désirée                    | 3   | 3,9                       | 7,6                  | 6,7                                  |
| Graso(*)                   | 4   | 1,1                       | 1,0                  | 1,5                                  |
| Judith                     | 3   | 3,6                       | 7,1                  | 7,0                                  |
| M5nxB522                   | 4   | 2,3                       | 3,1                  | 3,6                                  |
| Pimpernel                  | 3   | 3,7                       | 7,2                  | 5,2                                  |
| Roxane                     | 3   | 4,9                       | 8,6                  | 8,5                                  |

(\*) = possédant des gènes de résistance au mildiou  
 (1) = indice de sporulation basé sur une échelle visuelle (0 - 5): 0 = absence de sporulation; 1 = légère sporulation; 2-3 = niveaux de sporulation intermédiaires; 4-5 = sporulation abondante  
 (2) = indice global de maladie basé sur l'échelle du Centre International de la Pomme de terre (1-9): 1 = résistance totale; 9 = très sensible

Ce test *in vitro* a été utilisé pour inoculer 7.560 plantules de la variété Judith régénérées à partir de protocals issus de protoplastes, ou de cals provenant d'entre-nocuds ou de limbes. Il a permis de sélectionner 3% à 5% d'individus résistants *in vitro*, alors que les plantules témoins, issues du microbouturage conforme de la variété Judith se montrèrent toutes sensibles à ce test d'inoculation.

Cependant, en conditions épidémiologiques naturelles au champ, les 255 variants de Judith sélectionnés pour leur résistance *in vitro* à *P. infestans* ont montré la même sensibilité au mildiou que les plantes conformes de la variété obtenues par microbouturage de nocuds. L'absence de résistance au champ vis-à-vis de *P. infestans*, pour les clones issus de Judith et sélectionnés pour leur résistance *in vitro* au biotype « 0 » de *P.*

Cette technique a été appliquée à la comparaison de divers génotypes de pomme de terre de sensibilité différente au mildiou (tableau 2). Une certaine corrélation a été obtenue entre le comportement *in vitro* et le comportement au champ.



**Figure 1.** Dispositif utilisé pour l'inoculation stérile de microplantules de pomme de terre avec une suspension axénique de sporanges de *Phytophthora infestans*

1. bocal en verre contenant les microplantules de pomme de terre
2. bouchon en caoutchouc
3. suspension de sporanges de *P. infestans*
4. pastille magnétique
5. agitateur magnétique
6. bourre de coton
7. orifice bouché manuellement pendant la pulvérisation
8. surpression
9. compresseur

**Figure 1.** Dispositif utilisé pour l'inoculation stérile de microplantules de pomme de terre avec une suspension axénique de sporanges de *Phytophthora infestans*

*infestans*, ne semble pas liée à une attaque par d'autres biotypes plus virulents du champignon présents en conditions naturelles. En effet, des feuilles prélevées au champ sur les 255 variants sélectionnés se sont révélées être également sensibles au biotype « 0 ». Il apparaît dès lors que la résistance que nous avons observée *in vitro* est liée à une morphologie et/ou à une physiologie particulières des microplantules, ne se marquant pas au champ.

Ce comportement peut être lié aux différences de structure des feuilles entre plantes produites *in vitro* et plantes cultivées à l'air libre. Ceci limite l'intérêt de la méthode d'inoculation *in vitro*, eu égard à l'importance de l'épiderme foliaire lors des infections vis-à-vis de *P. infestans*. Cette technique ne peut donc servir comme méthode de sélection de variants résistants au mildiou qui soit transposable dans les conditions pratiques de culture. Nous avons dès lors modifié la méthode de sélection en soumettant les plantes régénérées *in vitro* directement à l'infection naturelle au champ.

#### b. Sélection au champ pour la résistance au mildiou

Parmi 300 plantules néoformées *in vitro* par bourgeonnement adventif d'entre-nœuds de la variété Bintje, 2 clones variants, issus d'un même explant, ont montré une résistance au champ dans le feuillage vis-à-vis du mildiou, que ce soit après inoculation artificielle avec une suspension de sporanges de *P. infestans* (biotype « 0 »), ou en conditions d'infection naturelle prévalant au cours de l'été 1982.

Ces deux clones (numéros 227 et 228) ont présenté une résistance au mildiou dans les étages foliaires supérieurs, avec notamment une nette réduction du nombre de foyers d'infection, couplée à une sensibilité dans les étages inférieurs, alors que dans ces conditions, la variété Bintje, utilisée comme témoin, se montrait sensible à tous les niveaux du feuillage. Les variants résistants présentent une morphologie foliaire particulière, avec un port érigé, de nombreuses ramifications, des pétioles petits et un feuillage aéré. Ces caractéristiques sont proches de celles rencontrées chez certaines formes ancestrales de pomme de terre.

L'examen microscopique a montré que les variants plus résistants sont des aneuploïdes, caractérisés par la perte d'un chromosome ( $2n = 47$ ) par rapport à la variété Bintje ( $2n = 48$ ). Cet état aneuploïde pourrait avoir favorisé l'expression de caractères récessifs.

Les variants 227 et 228 ont été soumis en 1991 et 1992 à des essais en grandes parcelles plantées avec des microplantules obtenues par micropropagation conforme *in vitro*. Les cultures se sont avérées très homogènes au sein de chaque variant et ont présenté des différences notables de port par rapport à la variété Bintje, avec des plantes plus hautes et une fermeture des lignes plus rapides.

Des essais comparatifs, sans traitement fongicide ou avec 1 à 2 traitements fongicides, ont été réalisés. Dans tous les cas, on a observé une destruction totale du feuillage par le mildiou chez la Bintje. Les variants 227 et 228 conservaient des étages foliaires supérieurs verts, même en fin de saison culturale, leurs étages foliaires inférieurs étant détruits par le mildiou (photo 1).

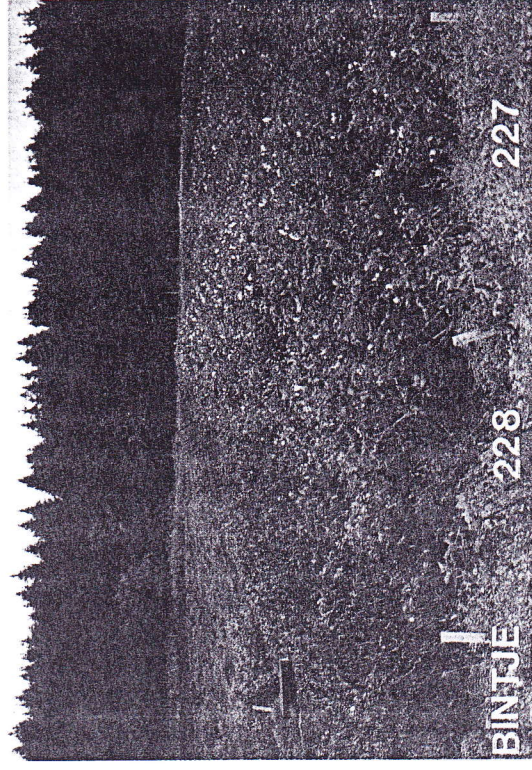


Photo 1. Symptômes de mildiou dans les parcelles de la variété Bintje et des variants 227 et 228 (Libramont 02/10/1992)

### a. Vitrosélection vis-à-vis de la gale commune

Des essais d'inoculation *in vitro* par l'agent de la gale, ont été réalisés avec une suspension de *Streptomyces scabies* sur des microtubercules de différentes variétés de sensibilité connue. Après inoculation, la bactérie envahit le milieu de culture, ce qui empêche le développement normal des microtubercules et conséquemment l'expression des symptômes. Cette technique de sélection *in vitro* s'est donc avérée inadaptée au but poursuivi.

### b. Sélection en serre vis-à-vis de la gale commune

En vue d'une sélection en serre, on a inoculé un mélange de souches de *S. scabies* dans un substrat de terreau. Des plantules obtenues par vitroculture à partir de calcs d'entre-noeuds du cv. Désirée ont été plantées en pot dans ce substrat, en vue d'identifier d'éventuels variants somaclonaux résistants.

Dans une première expérimentation effectuée en 1983, sur 766 plantules néoformées à partir du cv. Désirée, un variant (60B1) a montré une résistance à la gale commune en serre pendant 4 générations successives via la descendance végétative par tubercules, dans des conditions où le témoin Désirée montrait une forte sensibilité à la maladie. D'autres variants ont présenté une résistance, qui s'est cependant révélée instable après propagation via le tubercule.

Au cours d'une seconde expérimentation réalisée en 1984, 1.776 plantules ont été régénérées à partir de bourgeons adventifs, de calcs d'entre-noeuds, de limbes, de pétioles ou de noeuds ébourgeonnés du cv. Désirée. Après acclimatation en serre, ces plantes ont été placées dans un substrat infecté par *S. scabies* et testées pour la résistance de leurs tubercules à la gale; elles ont fourni 500 plantes moins sensibles que le cv. Désirée. Après la seconde année de culture (1985), nous avons sélectionné 20 clones dont l'indice moyen de symptômes, allait de 0 à 7,4 sur une échelle de 0 à 100 (voir encadré 3), alors que l'indice moyen de symptômes chez le témoin Désirée était de 26,4.

A la récolte, le rendement pondéral des variants 227 et 228 s'est avéré inférieur à celui de la Bintje. Les tubercules avaient souvent une forme plus allongée que chez la variété mère et présentaient autant, sinon plus, de symptômes de mildiou et de pourritures associées.

### 2.3.2. *Streptomyces scabies*, agent de la gale commune

Agent causal de la gale commune de la pomme de terre, *Streptomyces scabies* est une bactérie filamenteuse, parasite facultatif, capable de développement saprophytique et se conservant dans le sol, même en absence de culture. La gale de la pomme de terre provoque des altérations plus ou moins profondes de l'épiderme des tubercules.

Maladie cosmopolite, la gale commune a un impact économique important en raison de la dépréciation de la qualité esthétique des tubercules atteints. En outre, les lésions d'une certaine profondeur augmentent le déchet à l'épluchage. L'absence de gale constitue dès lors un critère important pour l'exportation de semenceaux de pomme de terre et la législation belge régissant leur commerce autorise un maximum de 5% en poids de tubercules ayant plus d'un tiers de la surface couverte de gale.

Les périodes chaudes et sèches représentent les conditions climatiques idéales pour l'extension de la maladie, d'où les exigences particulièrement sévères des pays méditerranéens en la matière. Le succès remporté dans ces pays par une variété sensible à la gale commune, telle que «Désirée», crée une difficulté particulière pour les multiplicateurs belges qui exportent du plant en Afrique du Nord. Pour prévenir la gale, il n'existe actuellement qu'un seul moyen pratique, mais onéreux: maintenir l'humidité du sol par l'irrigation.

La sélection de variants somaclonaux de Désirée résistants à la gale commune représentait dès lors un objectif particulièrement intéressant sur le plan économique.

Une troisième série d'expériences effectuées en 1987 a porté sur l'étude de l'association entre variation somaclonale et mutagénèse par irradiation aux rayons gamma. A partir de noeuds ou de cals d'explants du cv. Désirée, irradiés ou non, 9.260 plantes ont été régénérées et transférées à la Station de Haute Belgique à Libramont.

Des travaux conduits dans cette Station ayant montré que l'inoculation artificielle des substrats (mélange de terre du champ et de terreau) avec *S. scabies* n'était pas indispensable, étant donné l'infestation naturelle des sols où était prélevée la terre utilisée, la sélection s'est faite après plantation dans des substrats naturellement infectés.

### c. Sélection au champ vis-à-vis de la gale commune

A l'issue de la sélection en serre, la descendance des plantes dont les tubercules avaient montré peu de gale a été transférée au champ et soumis à l'infection naturelle à la Station de Haute Belgique à Libramont.

Certains somaclones ont montré une moindre sensibilité à la gale commune, avec une pigmentation de l'épiderme du tubercule plus pâle que chez le cv. Désirée. Quant aux plantes régénérées à partir d'explants irradiés, elles ont présenté un taux élevé de tubercules difformes et/ou bicolores (rose et jaune), ce qui a conduit à leur rejet.

Certains clones de variants somaclonaux ont été observés au champ pendant plusieurs années de culture consécutive. Chez la plupart, la tolérance à la gale commune s'est écroulée après une, deux ou trois années d'observation. Dans d'autres cas, cette tolérance était insuffisante pour justifier la poursuite de la sélection. Par contre, le variant somaclonal 60BI, issu d'un cal d'entre-noeud de la variété Désirée, a subi avec succès l'ensemble du processus de sélection et a été retenu pour les essais en grandes parcelles en 1991, 1992 et 1993.

Après multiplication conforme via la culture de noeuds, les parcelles ont été mises en place au champ et les parcelles ont reçu les traitements fongicides et insecticides classiques. En

**Encadré 3.** Pour apprécier l'incidence de la gale commune sur les tubercules, Bjor et Roer (1980) évaluent la sévérité des lésions et la surface galeuse relative sur base des échelles suivantes:

SL = Sévérité des lésions (1 à 3):

1 = gale superficielle; 2 = gale moyennement profonde ou gale relevée;  
3 = gale profonde

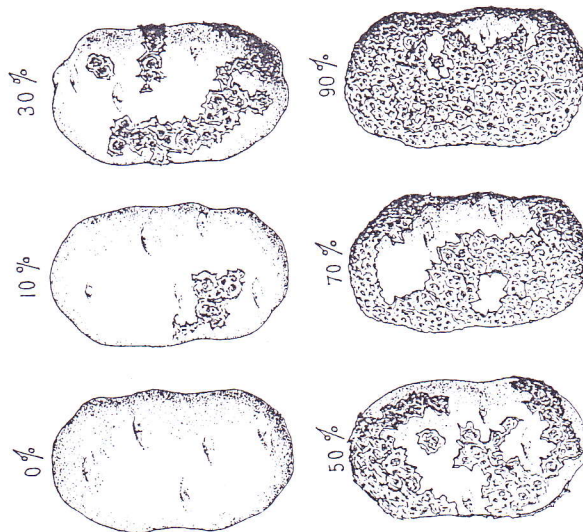
SGR = Surface galeuse relative (indice de sévérité de 0 à 9):

|   |    |      |       |       |       |       |       |       |     |
|---|----|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| 0 | 1  | 2    | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9   |
| 0 | <5 | 5-10 | 10-25 | 25-50 | 50-75 | 75-90 | 90-95 | 95-99 | 100 |

% de surface couverte

Le produit des deux valeurs permet de calculer un indice de gale (0 à 100) selon la formule:

$$\text{Indice de gale} = \frac{\text{SL} \times \text{SGR} \times 100}{27}$$



Tubercules présentant différents pourcentages de surface couverte de lésions de gale commune (d'après Clark *et al.*, 1938)

cours de végétation, on a noté le pourcentage de recouvrement et la hauteur des plantes. Au cours de la première année de culture (1991), un retard de croissance a été observé chez le variant 60B1 par rapport à la variété Désirée.

A la récolte, on a observé un rendement en tubercules inférieur de 36% chez le variant 60B1 par rapport au cv. Désirée, suite à une réduction des plus gros calibres. L'observation des symptômes a mis en évidence un taux de gale commune nettement inférieur chez les tubercules du variant 60B1 que chez ceux de la variété Désirée (photos 2 et 3).

En 1992, des essais multiloceaux ont montré une réduction de l'ordre de 15% du rendement en tubercules du variant 60B1 par rapport à la variété Désirée. Comme en 1991, cette réduction de rendement résultait d'une diminution des calibres supérieurs. Par ailleurs, le variant 60B1 présentait dans tous les essais un indice de gale commune inférieur à celui de la Désirée. Chez ce variant, les taches de gale demeurent localisées, sans s'étendre, comme c'est le cas chez la variété Désirée. Dans certains essais, on observe, après lavage, une coloration des tubercules légèrement plus pâle chez le variant 60B1 que chez la variété Désirée.

### 2.3.3. Virus Y de la pomme de terre

La variété de pomme de terre Roxane a été créée à la Station de Haute Belgique à Libramont en 1959 (Mélard, 1971) et a été inscrite à la liste officielle belge en 1971. Malgré d'excellentes qualités culinaires et gustatives (Nys, 1973) et un potentiel de rendement élevé, la diffusion de Roxane fut très limitée à cause de sa sensibilité au virus Y.

Le virus Y (PVY), virus type du groupe des Potyvirus, cause une des principales maladies virales de la pomme de terre (Beemster et De Bokx, 1987). Transmis par pucerons sur le mode non-persistant, il se propage rapidement dans les cultures, et peut

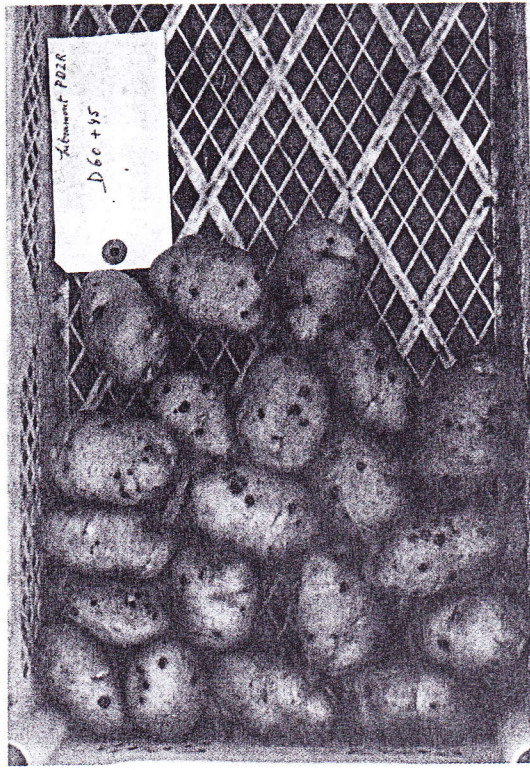


Photo 2. Tubercules du variant 60B1 issu de la variété Désirée (Libramont 1991)

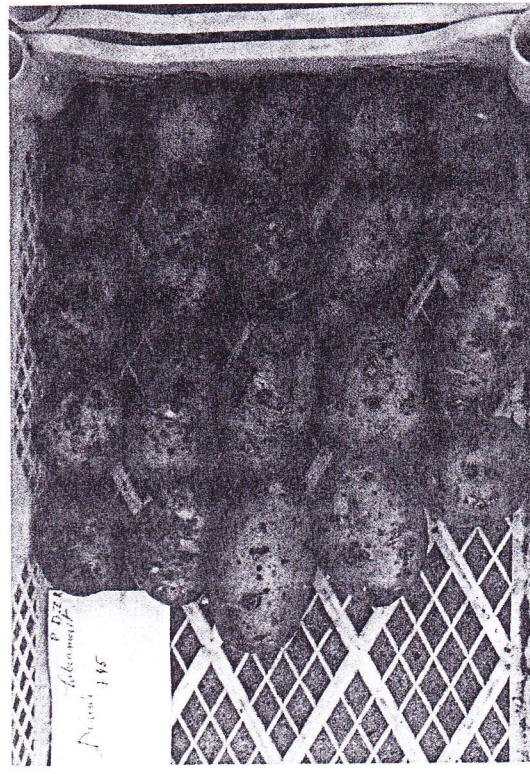


Photo 3. Tubercules de la variété Désirée (Libramont 1991)

provoquer une dépréciation de la production pouvant aller jusqu'à 80%, selon le cultivar, la souche du virus, et les conditions de culture. *Myzus persicae* est un vecteur très efficace de PVY, mais, en pratique, d'autres espèces d'aphides peuvent également transmettre ce virus.

#### a. Sélection en serre vis-à-vis du virus Y

Nous avons observé la colonisation en serre par *Myzus persicae* de plantules régénérées *in vitro* par bourgeonnement adventif d'entre-nœuds de la variété Roxane. La plupart des régénérats, ainsi que les plants de Roxane, furent fortement attaqués par les pucerons. Toutefois, chez quelques individus obtenus par vitroculture, la colonisation aphidienne était nettement réduite. Ce matériel a été conservé et multiplié *in vitro* en vue de tester la colonisation de sa descendance par *M. persicae*.

En collaboration avec le Centre de Phytovirologie (I.R.S.I.A.), section de Gembloux, nous avons testé comparativement la résistance au virus Y de 400 plantes issues d'entre-nœuds de la variété Roxane. Toutes les plantes, provenant tant des variants que de la variété, ont été inoculées par pucerons à partir de plantes-sources du cv. Roxane porteuses du virus Y; elles se sont avérées infectées de façon égale par le virus Y.

#### b. Sélection au champ vis-à-vis du virus Y

En 1989, 5 variants de Roxane, parmi ceux retenus en serre pour leur moindre colonisation par *M. persicae*, ont été observés en petites parcelles à la Station de Haute Belgique à Libramont. Au terme des deux saisons culturales, le variant R-Y/5 a présenté à la récolte le nombre le plus élevé de tubercules non épurés, qui tous se sont avérés indemnes de virus Y.

Suite à ces observations, le variant R-Y/5 a été micropropagé et comparé en grandes parcelles avec la variété Roxane durant les saisons culturales 1991 et 1992. Ces essais n'ont cependant pas montré de différences phytotechniques ou phytopathologiques majeures entre Roxane et le variant RY5, sauf pour ce qui concerne les dates de floraison et la coloration du feuillage. A la

récolte, aucune différence de taux d'infection par le virus Y n'a été mise en évidence entre le variant et la variété Roxane d'origine.

#### 2.3.4. *Erwinia carotovora ssp. atroseptica*, agent de la jambe noire des tiges et de la pourriture molle du tubercule

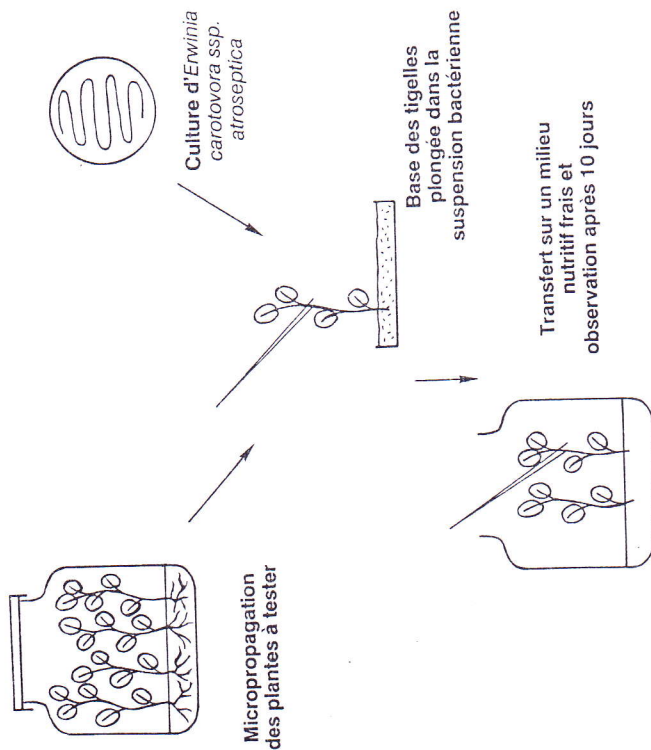
Les bactéries du groupe *Erwinia carotovora* induisent la pourriture de différentes espèces végétales, dont la pomme de terre. Elles appartiennent à trois espèces qui diffèrent par leur température optimale de croissance. *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* est généralement associée aux symptômes de « jambe noire » des tiges et est présente dans les régions tempérées. *Erwinia carotovora ssp. carotovora* s'étend sur une aire géographique plus vaste et infecte un nombre plus important d'espèces végétales. *Erwinia chrysanthemi* est pathogène sur de nombreuses plantes en milieu tropical, subtropical et tempéré chaud.

On peut distinguer différents types de symptômes causés par *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* au champ:

- perte à la levée si le tubercule-mère est infecté;
- symptômes de jambe noire si la bactérie migre du tubercule-mère vers la tige;
- pourriture des tubercules-fils infectés à partir de pieds-mères malades;
- contaminations des parties aériennes et des tubercules par les bactéries via les pluies, les insectes, les opérations culturales, le sol infecté.

*Erwinia carotovora ssp. atroseptica* est responsable de pertes importantes favorisées par l'humidité, les températures élevées, l'anaérobiose, les blessures des tubercules, la présence d'autres agents de pourriture. Le génotype, l'âge physiologique et la teneur en calcium des tubercules peuvent jouer un rôle significatif en la matière. Les infections au champ par cette bactérie sont favorisées en conditions humides, notamment au cours des années pluvieuses.

**Encadré 4.** Inoculation de microplantules de pomme de terre *in vitro* par *Erwinia carotovora ssp. atroseptica*.



Évaluation des symptômes:

Chaque plantule observée reçoit une cote (x), comprise entre 0 et 4, qui est représentative de l'intensité des symptômes, selon les notations suivantes:

- 0 = aucun symptôme;
- 1 = nécrose au point d'inoculation;
- 2 = développement d'une nécrose le long de la tige sans symptôme secondaire (jaunissement ou flétrissement des feuilles);
- 3 = développement d'une nécrose et symptômes secondaires;
- 4 = tige totalement nécrosée, plante morte.

Pour chaque bocal de 15 plantules, on obtient un indice de symptômes (I), compris entre 0 et 100, en appliquant l'équation suivante, où  $n_x$  est le nombre de plantules présentant la cote x:

$$I = \left( \sum_{x=0}^4 x \cdot n_x \right) \cdot \frac{25}{15}$$

Chez les tubercules en conservation, les *Erwinia* provoquent généralement des pourritures molles, débutant autour des lenticelles et des blessures. Au cours des années récentes, l'évolution des pratiques culturales (augmentation de la mécanisation de la récolte avec accroissement des blessures), ainsi que les mauvaises conditions de récolte, de transport et de stockage, ont contribué à l'accroissement des dégâts d'*Erwinia* chez la pomme de terre.

En l'absence de possibilités pratiques de lutte directe contre les *Erwinia* sur pomme de terre, on a mis en oeuvre un ensemble de mesures prophylactiques visant à réduire le niveau d'inoculum dans les cultures et à créer des conditions qui défavorisent la multiplication et la transmission de l'agent pathogène en cause.

**a. Vitro-sélection vis-à-vis de *E. carotovora ssp. atroseptica***

Nous avons mis au point un test d'évaluation *in vitro* de la sensibilité de variétés de pomme de terre vis-à-vis de *E. carotovora ssp. atroseptica* (voir encadré 4) et nous avons observé le comportement vis-à-vis de l'inoculation *in vitro* par la bactérie, d'une population de variants formés à partir de protoplastes du cv. Désirée. Environ 1.200 calcs ont été obtenus à partir de ces protoclonnes, dont 300 présentaient des morphotypes modifiés par rapport à la variété de départ.

Après sélection des plantules issues de protoclonnes sur base de leur vigueur, de leur croissance *in vitro* et de l'homogénéité de leurs phénotypes, on les a inoculées par trempage de la base des tiges dans une suspension de *E. carotovora ssp. atroseptica*. Après incubation, les protoclonnes CA9d, CA77a, et CA66c ont été sélectionnés sur base de leurs symptômes moins marqués que ceux du cv. Désirée.

**b. Sélection en serre vis-à-vis de *E. carotovora ssp. atroseptica***

Des plantules descendant du protocclone CA66c (sélectionné pour sa résistance *in vitro* vis-à-vis d'*E. carotovora ssp. atroseptica*)

ont été enracinées en tubes, puis transférées en serre. Après acclimatation, les plantules ont été inoculées par piqûre avec un cure-dent contaminé par une suspension bactérienne. Les résultats ont montré que les symptômes formés sur les tiges sont nettement moins prononcés pour le protocclone CA66c, que pour le cv. Désirée. Par contre, les tranches de tubercules inoculées au niveau médullaire par *E. carotovora* ssp. *atroseptica* présentent une macération plus rapide pour le variant CA66c que pour le cv. Désirée. Ceci indique que le test de macération des tranches de tubercules, largement utilisé pour tester la résistance à *E. carotovora*, donne des résultats différents de ceux obtenus après inoculation des tiges.

Le protocclone CA66c présente diverses particularités phénotypiques par rapport à la variété Désirée: entre-noeuds plus courts, tiges plus grosses, feuilles entières, presque cordées avec un limbe épais. L'analyse par cytométrie de flux a montré que le variant CA66c possédait un contenu en DNA supérieur de 50 % à celui de la variété de départ Désirée (tétraploïde 4X), ce qui équivaudrait à un état hexaploïde.

#### 2.4. Caractérisation moléculaire des variants somaclonaux de pomme de terre

Travail réalisé sous la direction du Dr. du JARDIN par les doctorants J. CABRA et J. ROJAS.

##### 2.4.1. Origine de la variation somaclonale

Plusieurs hypothèses ont été élaborées pour expliquer les bases moléculaires de la variation somaclonale: changements au niveau nucléaire, au niveau des génomes extra-nucléaires et/ou au niveau épigénétique.

Historiquement, les variations observées parmi les plantes régénérées en culture de tissus ont été attribuées tout d'abord à des variations de leur niveau de ploïdie. On observe en effet des cas de polyploïdie et d'aneuploïdie, résultant de la culture *in vitro* de tissus possédant des modifications caryotypiques préexistantes (chimères). Une autre source de changements consiste en la rupture de chromosome et les événements qui en

sont la conséquence (translocations, inversions, délétions et duplications). Parmi les mécanismes généraux d'innovation génétique, la recombinaison homologue (intervention de « crossing over » entre des séquences nucléotidiques identiques ou similaires), est d'un intérêt particulier. Bien connue dans le cas de l'échange réciproque de segments chromosomiques homologues à la méiose, elle peut intervenir théoriquement à tout moment entre deux séquences homologues présentes sur un même chromosome ou sur deux chromosomes différents. Les chromosomes asymétriquement appariés, les chromosomes non homologues, les régions contenant du DNA hautement répété, sont des candidats potentiels de « crossing over », avec comme résultat éventuel des modifications du nombre de copies de certains gènes.

Dans les organismes supérieurs, le nombre de copies de gènes spécifiques peut être amplifié ou réduit pendant le processus de différenciation cellulaire, ou en réponse à des situations de stress via l'environnement. L'amplification de gènes codant pour des enzymes ou pour des RNA ribosomiques a été mise en évidence, de même que des phénomènes d'amplification ou de réduction étaient détectés au niveau du DNA répétitif. Les DNA répétitifs sont particulièrement susceptibles de connaître des appariements incorrects pendant la méiose, donnant lieu à la perte de séquences répétées chez un chromosome avec un gain chez l'autre. En outre, diverses séquences répétées, disposées à travers le génome, ont des caractéristiques similaires à celles des transposons (Marx, 1984), éléments génétiques se déplaçant d'un endroit à un autre dans le génome de la plante et décrits par Mc Clintock (1950) pour expliquer certaines mutations instables chez le maïs. Des mutations ponctuelles peuvent également se produire, aussi bien sous une forme récessive que sous une forme dominante.

Enfin, la relation entre le degré de méthylation du DNA et la régulation des gènes, ainsi que l'inhibition de l'activité de certains transposons ayant un degré élevé de méthylation, ont amené à considérer les changements de méthylation comme une cause possible de la formation de somaclones chez les tissus végétaux cultivés *in vitro*.

#### 2.4.2. Recherche de marqueurs protéiques des somaclones

La mise au point d'une carte d'identité moléculaire des variants est indispensable à l'établissement des parentés entre eux et la variété-mère et à la protection des droits de l'obteneur. Elle peut se baser sur la caractérisation des protéines ou des acides nucléiques.

L'analyse par électrofocalisation des protéines constitue une méthode satisfaisante et efficace pour caractériser les variétés de pomme de terre (Rajapakse *et al.*, 1991) et l'application de cette technique, dans le cadre de nos recherches, a révélé effectivement un net polymorphisme entre variétés. Par contre, aucun polymorphisme n'a été observé entre les cultivars d'une part et leurs variants somaclonaux d'autre part.

Le terme « isoenzyme » est utilisé pour décrire les différentes formes moléculaires d'enzymes ayant la même spécificité de substrat. Les isoenzymes ont été largement utilisées comme marqueurs pour étudier la variation génétique et les relations phylogénétiques chez la tomate, chez le maïs, chez le blé, chez le riz et chez la pomme de terre. Cependant la caractérisation des isoenzymes par électrophorèse est limitée par l'insuffisance de polymorphisme entre génotypes très proches (Beckmann et Solter, 1983).

Nous avons testé trois isoenzymes pour tenter de caractériser nos clones de pomme de terre. Les  $\alpha$ -estérases ( $\alpha$ EST) ont montré un polymorphisme marqué entre cultivars, tandis que pour la glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et la malate déshydrogénase (MDH), le polymorphisme était observé entre certains cultivars seulement. Aucun polymorphisme n'a été observé entre les cultivars et leurs variants somaclonaux.

#### 2.4.3. Recherche de marqueurs au niveau du DNA génomique

Parmi les techniques permettant de dresser la carte d'identité d'un génotype, par exemple celui d'un variant somaclonal de pomme de terre, l'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction du DNA est la plus répandue. Cette approche est désignée par l'abréviation de sa traduction

anglais: « RFLP » pour « Restriction Fragment Length Polymorphism » (voir encadré 5). Le DNA extrait de l'individu à caractériser est soumis à l'action d'endonucléases de restriction qui sont des enzymes capables de couper la double hélice de DNA en des sites très précis, caractérisés par une séquence de nucléotides propre à chaque enzyme. Celle-ci « lit » la suite des nucléotides jusqu'à trouver le signal de clivage et coupe le DNA à cet endroit.

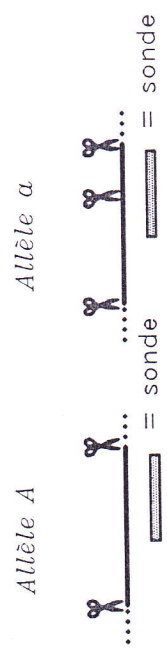
L'analyse des produits de la réaction permet d'identifier les positions des motifs nucléotidiques cibles dans le DNA. Les enzymes de restriction générant le plus souvent des centaines de milliers de fragments différents, l'utilisation d'une sonde radioactive de DNA spécifique permet de visualiser, par autoradiographie, les fragments porteurs de la séquence de cette sonde (de un à quelques dizaines), ce qui permet la caractérisation et l'identification d'un individu.

Dans le cas d'une population issue de propagation végétative ou de l'autofécondation de lignées pures, tous les individus sont en théorie génétiquement identiques et la carte d'identité dressée sera donc caractéristique de la population.

##### a. Clonage de séquences de DNA de pomme de terre en vue de la constitution des sondes pour une étude de type « RFLP » des variants somaclonaux

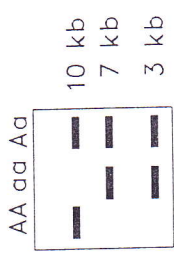
Les sondes moléculaires visualisent, parmi les produits de clivage du DNA, ceux qui sont homologues de leurs propres séquences nucléotidiques. Pour obtenir une probabilité maximale de mettre en évidence un polymorphisme de restriction entre deux génotypes proches, on utilisera comme sonde des séquences a priori génétiquement instables, susceptibles d'être préférentiellement touchées par les variations somaclonales, telles que les séquences répétées.

Celles-ci formant des substrats particulièrement propices aux recombinaisons et étant fréquemment incriminées dans la production de polymorphismes au niveau du DNA (voir encadré 6), des sondes correspondant à des séquences répétées dans le génome de la pomme de terre constituent de bons candidats pour



Produits de clivage présentant une zone de chevauchement avec la sonde :  
 ————— = 10 kb  
 ————— = 7 kb  
 ————— = 3 kb

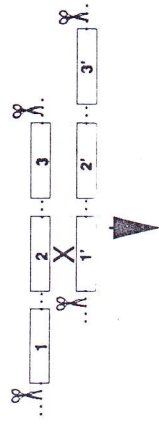
Autoradiographie des produits de clivage séparés par électrophorèse et reconnus par la sonde :



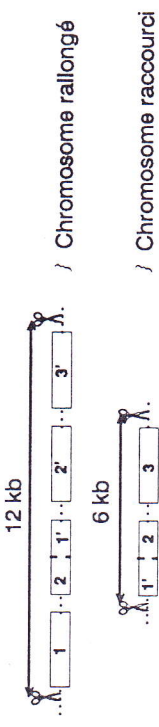
**Encadré 5.** Principe de l'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction du DNA (« RFLP »). Deux molécules de DNA sont polymorphes au niveau du locus A (allèles A et a). Les allèles diffèrent en particulier par la présence/absence d'un site de coupure par enzyme de restriction (représenté par les paires de ciseaux) à l'intérieur du gène. Cette différence a pour origine une séquence nucléotidique légèrement différente entre les deux allèles. Lorsque le DNA d'individus diploïdes de constitution AA, aa ou Aa est coupé par l'enzyme de restriction et que les produits de clivage correspondant au locus A sont révélés par la sonde de DNA telle que positionnée sur la figure, l'autoradiographie distingue sans ambiguïté les génotypes homo- ou hétérozygote. Les bandes autoradiographiques polymorphes dessinent ce que l'on appelle un « patron RFLP », qui révèle sur le plan moléculaire les caractéristiques génétiques de l'individu.



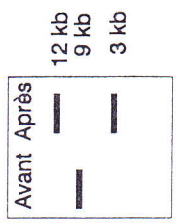
Appariement imprécis et crossing over entre deux motifs répétés :



Production de deux types nouveaux de chromosomes recombinés :



Analyse RFLP utilisant le motif répété comme sonde :



**Encadré 6.** Instabilité génétique associée à la présence de séquences de DNA répétées « en tandem » et détection des produits de remaniement par analyse « RFLP ». Un appariement imprécis de deux doubles hélices de DNA au niveau de séquences répétées, suivi d'un « crossing over » entre deux motifs homologues, génère des formes chromosomiques nouvelles qui seront propagées au cours des cycles de division cellulaire ultérieurs. Si une enzyme de restriction coupe le DNA dans les régions adjacentes aux motifs dupliqués, une analyse « RFLP » utilisant le motif répété comme sonde permettra de détecter l'accident génétique lié à l'événement de recombinaison homologue.

révéler des polymorphismes de restriction du DNA entre génotypes proches. Leur utilisation sera dès lors envisagée préférentiellement à celle de sondes qui seraient sélectionnées au hasard dans une banque de DNA de pomme de terre.

Dans le cadre de notre travail, le point de départ du clonage de DNA répété a été l'observation selon laquelle du DNA de pomme de terre digéré par l'enzyme de restriction HindIII laisse une fraction inaltérée, réfractaire à la digestion, migrant lentement lors d'une électrophorèse et se retrouvant systématiquement en haut du profil des produits de digestion. L'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer cette observation est qu'un motif de DNA dépourvu de séquence cible HindIII se trouve à l'état répété en enfilade (« en tandem ») un nombre élevé de fois dans le génome de la pomme de terre. La région concernée devrait être particulièrement instable, du fait de la recombinaison homologue intra- et intermoléculaire et serait donc susceptible de fournir des sondes intéressantes pour l'identification des variants somaclonaux.

La fraction résistante à HindIII a donc été séparée du reste du DNA génomique par électrophorèse en gel d'agarose, extraite de ce gel et clivée par une autre enzyme de restriction ayant des sites de coupure dans cette région. Après ligation à un vecteur de clonage plasmidique, les fragments ont été introduits et clonés dans la bactérie *Escherichia coli*. L'hybridation moléculaire a permis de vérifier ensuite que les fragments de DNA de pomme de terre clonés étaient effectivement présents en de nombreuses copies dans le génome de la plante.

#### b. Recherche de polymorphismes de restriction du DNA entre les variants et le cultivar Désirée originel

Le DNA total extrait des variants somaclonaux et du cultivar Désirée originel a été soumis indépendamment à des digestions par six endonucléases de restriction. Après électrophorèse sur gel d'agarose et transfert sur membrane de nylon selon la technique de « Southern », les fragments clonés ont été utilisés successivement pour l'hybridation sur les mêmes membranes. Le marquage des fragments utilisés comme sondes a été réalisé au moyen d'une technique non radioactive, consistant à coupler

chimiquement une peroxydase au DNA monobrin et à révéler la fixation de la sonde sur la membrane par autoradiographie au moyen de substrats chémoluminescents.

La figure 2 présente les résultats obtenus pour une des sondes polymorphes. Chez le variant 60B1, ce fragment de DNA révèle un produit de clivage par BamHI d'une longueur de 15 kb (1 kb = 1000 paires de bases), non détecté chez le cultivar Désirée. Chez un deuxième variant issu de Désirée (clone CA66c), l'enzyme de restriction TaqI présente un produit de digestion qu'on ne retrouve pas chez le cultivar Désirée. D'autres combinaisons « sonde x enzyme » révèlent des polymorphismes additionnels, qualitatifs (présence de bandes autoradiographiques supplémentaires) ou quantitatifs (modification de l'intensité relative de bandes).

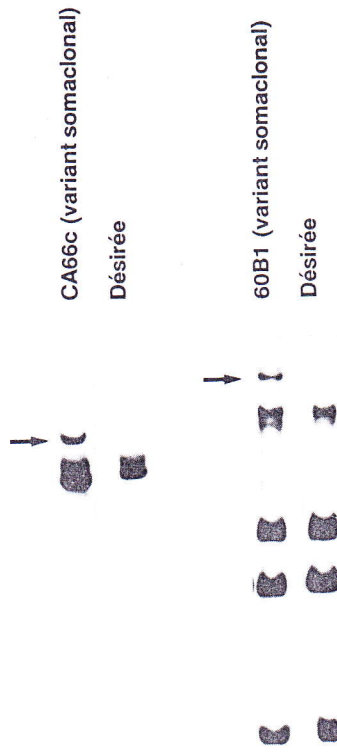


Figure 2. Empreintes génétiques des somaclones de pomme de terre 60B1 et CA66c au moyen d'une sonde de DNA clonée dans le cadre de ce travail. Les autoradiographies révèlent la présence de bandes supplémentaires chez les variants (indiquées par les flèches), comparativement au cultivar Désirée d'origine. Ces bandes permettent de distinguer sans ambiguïté un tubercule variant et un tubercule du cultivar Désirée.

### c. Nature des régions chromosomiques polymorphes entre les variants et le cultivar d'origine

Les sondes sélectionnées s'avèrent révéler des polymorphismes dans le DNA à une fréquence remarquablement élevée. D'autres variants, non repris dans la présente étude, ont pu être également caractérisés par ces mêmes sondes. La nature des régions présentant une instabilité chez les clones ayant subi un passage *in vitro* a été étudiée en déterminant partiellement la séquence nucléotidique des sondes utilisées. Les séquences obtenues ont indiqué une correspondance avec les séquences de rDNA (régions de DNA transcrits en RNA ribosomique) connues chez d'autres espèces végétales. Par ailleurs, nos sondes ont pu être hybridées avec les RNA ribosomiques de la pomme de terre (technique de « northern blot »), prouvant ainsi l'homologie de séquence.

Le rDNA est organisé dans le DNA nucléaire des plantes de façon très particulière: un segment de DNA unitaire est transcrit en un long précurseur de RNA dont le clivage ultérieur produit les RNA des sous-unités ribosomiques. Le segment unitaire polyfonctionnel de DNA (« polycistronique ») est répété en enfilade plusieurs centaines ou plusieurs milliers de fois. Un tel agencement a précisément été proposé pour les séquences réfractaires à la digestion par HindIII qui ont servi de base à l'établissement de nos sondes.

Les approches moléculaires présentées livrent plusieurs informations intéressantes. Tout d'abord, elles fournissent les cartes d'identité (empreintes génétiques) permettant la valorisation des variants. Ensuite, elles confirment que des variations phénotypiques obtenues en vitroculture et qui s'avèrent stables et homogènes lors de la culture au champ, peuvent être associées à des modifications proprement génétiques (liées à la structure du DNA), et pas seulement à des changements de nature épigénétique, résultant d'altérations plus ou moins stables de l'expression du génome sans modification de sa structure. La fréquence élevée des mutations observées au moyen de nos sondes, tend à indiquer que la recombinaison homologue entre séquences répétées représente un phénomène significatif lors des processus de régénération *in vitro* du cultivar de pomme de terre Désirée.

Rien ne permet cependant d'affirmer que les remaniements génétiques détectés sont en relation directe avec les nouveaux phénotypes observés chez les variants. En effet, les gènes contrôlant les caractères agronomiques intéressants observés chez les variants ne sont pas nécessairement localisés dans les mêmes régions chromosomiques que les séquences de DNA révélées par les sondes.

## CHAPITRE 3. LE BLE TENDRE

### 3.1. Techniques d'amélioration du blé

Céréale présentant une autogamie naturelle, le blé tendre *Triticum aestivum* L. est cultivé principalement sous forme de lignées pures homozygotes. Du point de vue de l'amélioration génétique de l'espèce, la castration des fleurs d'une lignée (par enlèvement des anthères) et leur fécondation par le pollen d'une autre lignée conduisent à la réalisation d'un hybride, point de départ de toute sélection. On laisse la plante hybride se reproduire par autofécondation, le taux d'homozygotie augmentant de moitié à chaque génération. Au cours des générations successives, différentes méthodes de sélection peuvent être appliquées et conduisent à l'inscription d'une nouvelle variété après 10 à 12 ans. Ces méthodes de sélection génétique ont concouru pour 50% à 60% à l'accroissement de productivité observée au cours des 40 dernières années. Cependant des risques de diminution d'impact du progrès génétique sont à craindre (Picard, 1988) pour les raisons suivantes :

- perte de variabilité due à l'élimination de grandes quantités de lignées au cours des schémas de sélection classiques;
- accroissement de la consanguinité par l'emploi répété des mêmes géniteurs;
- emploi insuffisant de la recombinaison aux stades où elle est la plus efficace, c'est-à-dire en début de sélection, au moment où l'hétérozygotie est maximum.

Pour éviter une telle perte de variabilité conduisant à une base génétique de sélection de plus en plus étroite, il faut élargir la variabilité génétique disponible soit en créant des populations à partir de nombreux parents (large base génétique), soit en exploitant de nouvelles techniques basées sur la biologie moléculaire et les cultures de cellules (l'hybridation intraspécifique et interspécifique, la mutagenèse, la variation gamétoclonale, la variation somaclonale, la transformation

génétique). De plus, il faut séparer les deux opérations que sont la constitution du matériel de départ et la sélection variétale.

En complément des schémas classiques conduisant à l'homozygotie, de nouvelles technologies se sont développées notamment l'haplodiploïdisation, dont l'un des intérêts majeurs est de raccourcir le délai d'obtention de la lignée pure homozygote. Ceci permet au sélectionneur d'apprécier plus rapidement et avec plus de précision la valeur génétique d'un hybride. Par ailleurs, sur du matériel haploïde doublé, la réponse à la sélection sera meilleure. L'haplodiploïdisation est la seule méthode qui permette de conserver intégralement fixées les associations alléliques générées par la méiose. Elle a encore bien d'autres intérêts, sur le plan de l'analyse génétique des interactions entre gènes à différents loci, de la détection des groupes de liaison génétique (linkage), de l'estimation du nombre de gènes responsables d'un caractère donné, ou de la prévision de la valeur des croisements.

### 3.2. Vitroculture chez le blé tendre

#### 3.2.1. Variation somaclonale chez le blé tendre

Nos recherches ont porté sur la mise en culture d'embryons matures et immatures de blé tendre avec obtention de cals régénérants. Des variations phénotypiques (nombre d'épis par plante, taille des plantes, épis barbus ou non, forme et fertilité des épis) ont été observées au cours de 2 générations successives de descendants issus des variants par autofécondation. La plupart des lignées obtenues présentaient un phénotype homogène en F1. Certains des caractères nouveaux furent transmis en F2, tandis que d'autres ne se maintinrent pas dans la descendance.

Le pourcentage de lignées comportant des plantes aneuploïdes était d'environ 5%, le nombre de chromosomes de ces aneuploïdes étant compris entre 38 et 44, avec une majorité comportant 41 et 43 chromosomes. L'aneuploïdie semble donc être un facteur mineur de la variation somaclonale chez le blé, la plupart des variants morphologiques observés étant euploïdes.

#### 3.2.2. L'haplodiploïdisation par culture *in vitro* d'anthers (androgénèse)

La production de plantes haploïdes de blé via l'androgénèse par culture *in vitro* d'anthers a commencé au début des années 1970 (voir encadré 7). Elle a abouti en 1985 à l'inscription de la variété Florin obtenue par haplodiploïdisation.

La fréquence d'obtention *in vitro* de plantes vertes haploïdes est déterminée par trois paramètres majeurs: le taux d'induction de développement chez les anthers mises en culture, la capacité de régénération à partir des structures induites et la formation de plantes albinos. Ces paramètres dépendent des conditions de croissance des plantes mères, du stade de différenciation cellulaire du pollen, du génotype, ainsi que des milieux et des conditions de culture.

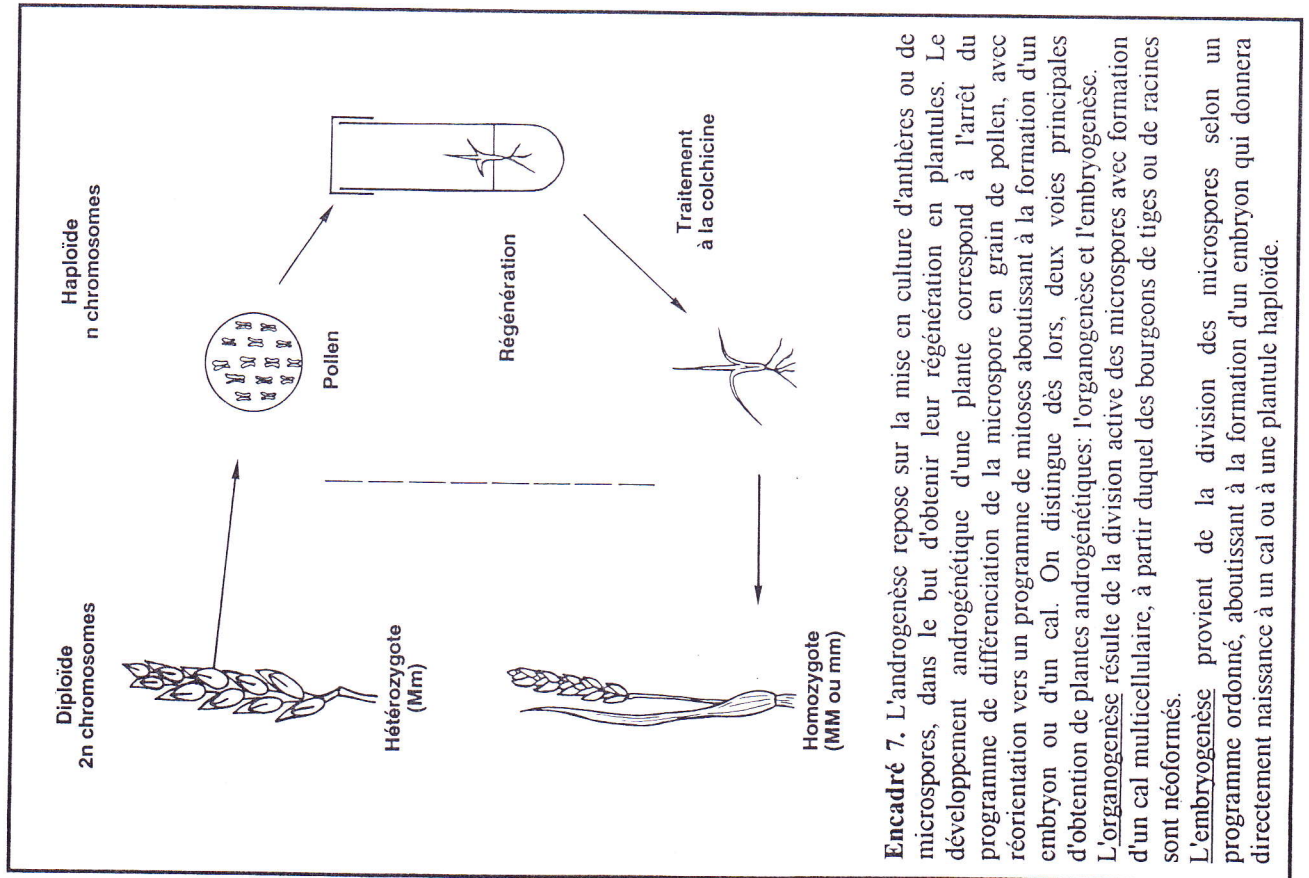
#### a. Organogénèse

La régénération du blé à partir de culture d'anthers est généralement réalisée en 2 étapes: l'induction de cal à partir de pollen et la différenciation des plantules.

L'utilisation de l'haplodiploïdisation en amélioration du blé a été longtemps limitée par le faible taux de production de plantules à partir d'anthers. En 1987, en collaboration avec la Station d'Amélioration des plantes de Gembloux, nous avons cherché à améliorer ce taux.

Six génotypes de blé ont été semés au champ en vue de la production d'anthers: les blés de printemps Sabine, Lignée 7, Atys et Echo et les hybrides F1 de blés d'hiver W1 (obtention de la Station d'Amélioration des plantes de Gembloux) et W2 (obtention de Nicholson).

En comparant plusieurs milieux d'induction, nous avons montré que le milieu « Potato-2 » de Chuang *et al.* (1978), modifié par addition de glutamine, par traitement du saccharose au charbon



**Encadré 7.** L'androgénèse repose sur la mise en culture d'anthers ou de microspores, dans le but d'obtenir leur régénération en plantules. Le développement androgénétique d'une plante correspond à l'arrêt du programme de différenciation de la microspore en grain de pollen, avec réorientation vers un programme de mitoses aboutissant à la formation d'un embryon ou d'un cal. On distingue dès lors, deux voies principales d'obtention de plantes androgénétiques: l'organogénèse et l'embryogénèse. L'organogénèse résulte de la division active des microspores avec formation d'un cal multicellulaire, à partir duquel des bourgeons de tiges ou de racines sont néoformés.

L'embryogénèse provient de la division des microspores selon un programme ordonné, aboutissant à la formation d'un embryon qui donnera directement naissance à un cal ou à une plantule haploïde.

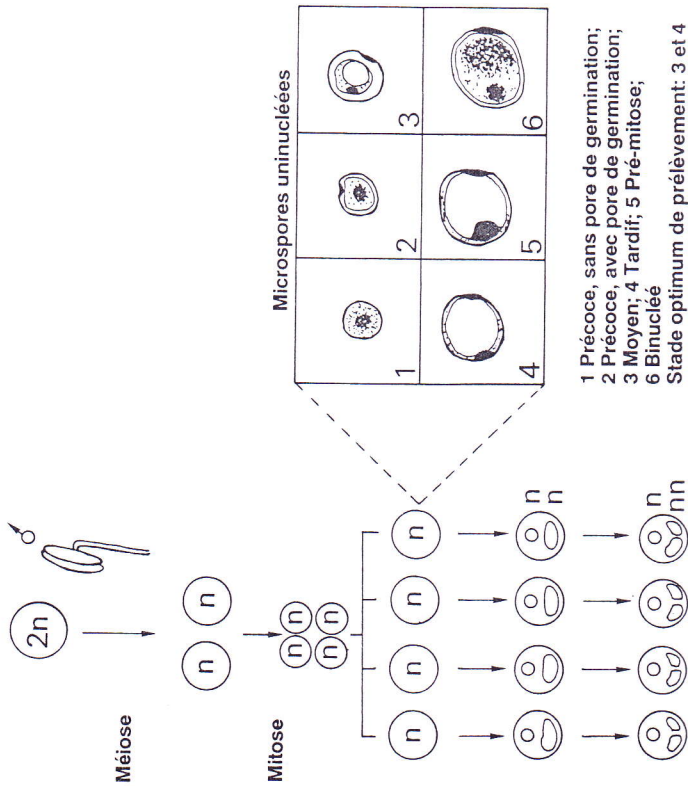
de bois activé et par remplacement de l'agar par de l'agarose, donnait les meilleurs résultats (Zhang, 1987). Le pourcentage moyen d'anthers produisant au moins un cal est passé de 9,1% (avec le milieu Potato-2 original) à 21,6% avec le milieu modifié, tandis que le pourcentage moyen des plantes chlorophylliennes régénérées passait de 2,5% (50 plantes vertes pour 2.050 anthers) à 6,9% (369 plantes vertes pour 5.350 anthers).

La supériorité du milieu modifié peut s'expliquer par l'effet du charbon de bois activé sur le saccharose stérilisé à la chaleur, avec absorption du 5-hydroxyméthylfurfural, un inhibiteur de croissance produit par la dégradation du saccharose au cours de l'autoclavage. Le charbon activé pourrait également apporter certains éléments favorables au développement des explants, comme les monophénylamines.

Outre la culture au champ, les génotypes de blé donneurs d'anthers ont aussi été cultivés en serre, afin d'étudier les facteurs influençant l'induction des cals et la régénération des plantules à partir de ces anthers. Les résultats indiquent que la température de croissance des plantes donneuses d'anthers ne doit pas dépasser 20°-22°C, l'intensité lumineuse devant être au moins de 10.000 lux. Le stade de développement du pollen pour la mise en culture des anthers est optimum lorsque les microspores sont en phase uninucléée moyenne ou tardive. La figure 3 situe ce stade dans le processus de formation des gamètes mâles.

La régénération de plantules de blé à partir de cals a été obtenue sur un milieu MS additionné de micro-éléments en demi-concentration, de NAA, de kinétine et d'agar.

Les études cytologiques de 409 plantes vertes régénérées à partir d'anthers de blé ont révélé qu'elles étaient à 80% haploïdes.



**Figure 3.** Développement des grains de pollen et stade optimum de prélèvement pour la mise en culture d'anthers

### b. Embryogenèse

Via l'embryogenèse directe, la plantule régénérée a le plus souvent comme origine une seule cellule (Vasil *et al.*, 1981), ce qui réduit le risque de régénération de plantes chimériques.

L'orientation de l'androgenèse vers la voie de l'embryogenèse semble être essentiellement sous le contrôle de la séquence des milieux de culture utilisés. En optimisant ces milieux pour les anthers de blé tendre, nous avons montré que le remplacement du saccharose par du maltose à la concentration de 12% dans le milieu de Zhang (1987) augmente le nombre des proembryons formés. Ceci s'expliquerait par l'effet positif du maltose sur la régulation osmotique du milieu d'induction, ou par la suppression de l'effet toxique du glucose libéré dans le milieu à partir du saccharose au cours de l'autoclavage.

Les proembryons formés ne se développent pas ou peu s'ils sont placés directement sur un milieu de régénération. Le passage par un milieu liquide agité, entre l'induction et la régénération, confère une meilleure maturation au matériel embryonnaire en individualisant les embryons et en facilitant leur transfert sur le milieu de régénération.

Les études cytologiques réalisées sur les microspores au cours de la phase d'induction indiquent que durant la première semaine de culture, le(s) noyau(x) se divise(nt) à l'intérieur de la microspore. Après cette période, les microspores encore vivantes se développent en proembryons. Ce processus est plus rapide dans le cas du milieu à base de maltose que pour le milieu contenant du saccharose.

### 3.2.3. Variation gamétoclonale

Le terme de «variation gamétoclonale» est utilisé pour définir la variabilité observée au sein de plantes-filles régénérées à partir de tissus gamétiques d'une plante-mère donneuse. Lorsqu'elle concerne des caractères récessifs, la variation gamétoclonale a l'avantage que ces derniers sont directement observables chez les plantes haploïdes régénérées à partir d'anthers ou d'ovaires (qui ne contiennent qu'une seule copie de chaque gène), de sorte que en principe les gamétoclonones permettent de sélectionner directement des phénotypes intéressants. Le nombre de chromosomes peut ensuite être doublé par traitement à la colchicine pour obtenir des dihaploïdes.

Chez les céréales, on observe fréquemment la formation de plantes albinos lors de la mise en culture d'anthers; ces albinos sont moins fréquents pour les cultures d'ovaires. Des variations du nombre de chromosomes sont fréquentes chez les plantes androgénétiques, suite à des endomitoses spontanées conduisant à l'obtention de plantes  $2n$ ,  $3n$ ,  $4n$ . Les plantes d'origine gynogénétique possèdent le plus fréquemment  $n$  ou  $2n$  chromosomes. Les plantes diploïdes en cause peuvent résulter du doublement spontané du nombre de chromosome chez les plantes issues de cellules gamétiques, ou de la multiplication de cellules somatiques hétérozygotes de tissus extérieurs aux gamètes.

Par ailleurs, des mutations géniques, des amplifications ou réarrangement de gènes, ou des mutations cytoplasmiques peuvent également se produire.

La variation gamétoclonale concerne parfois de nouveaux caractères qu'il est difficile de sélectionner par les méthodes d'amélioration classiques; une telle source de variation peut donc revêtir un intérêt particulier dans le cas de génotypes possédant une base génétique étroite.

Notre étude de la variation gamétoclonale par la culture d'anthers chez la variété de blé Sabine a porté sur les deux modalités de régénération par organogénèse ou par embryogénèse. La toxicité saline a été utilisée pour évaluer l'ampleur de la variabilité induite par la culture d'anthers. Le rapport entre le nombre de cals (ou embryoides) survivants sur un milieu de régénération supplémenté en NaCl, et le nombre de cals (ou embryoides) mis en culture a été utilisé comme indice de variabilité.

Nos résultats indiquent que le nombre de plantules vertes régénérées ainsi que la proportion de cals survivants après sélection sur milieu de régénération supplémenté en NaCl sont plus élevés pour l'organogénèse que pour l'embryogénèse. Cette observation confirme les résultats obtenus par d'autres auteurs (Vasil *et al.*, 1981; Karp *et al.*, 1984).

Par ailleurs, ces variations apparaissent stables à travers l'autofécondation et donc exploitables dans le cadre d'un programme d'amélioration.

### 3.3. Sélection du blé vis-à-vis d'agents pathogènes

#### 3.3.1. Vitrosélection vis-à-vis de *Septoria nodorum*

*Septoria nodorum* provoque une « fonte de semis » chez le blé. La maladie progresse de bas en haut à partir de l'infection du coléoptile et se caractérise par une déformation de celui-ci; les différences parties de la plante sont ensuite successivement attaquées. Dans des conditions favorables à la maladie, on observe au champ des attaques sur feuilles et sur tiges, puis l'infection des épis.

Nous avons mis au point une méthode de pression sélective en milieu double-phase, par culture associée du champignon et du matériel végétal à sélectionner. Elle consiste à faire croître le champignon sur un milieu de culture en flacon, puis à le tuer en le couvrant à chaud d'un second milieu de culture. Les métabolites secrétés par le champignon tué diffusent dans le second milieu, sur lequel on sélectionne des cals provenant d'embryons matures de blé.

Nous avons régénéré une dizaine de plantules à partir de cals résistants à des métabolites produits par *S. nodorum* en culture associée.

#### 3.3.2. Sélection pour la résistance du blé vis-à-vis de *Fusarium culmorum*

Les fusarioses occasionnent chez le blé des dégâts de trois types: (1) manque de levée, associée parfois à une fonte de semis, (2) nécrose du pied et des noeuds, entraînant une moindre résistance des plantes à la verse, (3) dessèchement précoce de certains épillets, pouvant aller jusqu'à un échouage de l'épi tout entier.

Les dégâts de levée ou les nécroses de noeuds peuvent être combattus par la désinfection des semences. Il n'en est pas de même des dégâts sur épi, qui sont les plus redoutés. Outre les pertes quantitatives liées à la réduction du nombre de grains par

épi et du poids de 1.000 grains, il convient de prendre en compte l'action néfaste du *Fusarium* sur les qualités technologiques du grain, ainsi que la toxicité intrinsèque du champignon vis-à-vis de l'homme et des animaux.

Les épis de blé sont sensibles à l'inoculation du *Fusarium* durant la floraison. Les épillets affectés ont une apparence blanche, très contrastée lorsque l'épi est encore vert; ils deviennent progressivement roses lorsque le mycélium se développe. Dans les épillets malades, les grains sont absents ou difformes; si le rachis est envahi, la partie supérieure de l'épi sera échaudée.

La contamination par la maladie s'effectue via le transport des spores via l'eau ou l'air à partir de l'inoculum présent à la base des plantes. Le développement des symptômes est favorisé par un climat humide, spécialement au niveau des épis.

Aux Pays-Bas, les espèces de *Fusarium* isolées à partir d'épis de blé infectés sont principalement *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc. et *F. nivale* (Fr.) Ces. (Daamen et al., 1991). En France, Saur (1984) note que *F. graminearum* (Schwabe) est dominant dans le Sud et *F. culmorum* est prévalent dans le Nord. En Belgique, c'est *F. culmorum* qui est plus fréquemment isolé sur les grains de blé (Cavelier et al., 1990).

La fusariose de l'épi de blé n'est pas maîtrisée correctement par des applications fongicides. En France, en conditions d'inoculation artificielle, on a observé 60% d'efficacité avec le tebuconazol ou le mélange tebuconazol et carbendazime, appliqués au début de la floraison (Caron et al., 1990). Cette efficacité insuffisante de la lutte chimique confère une importance particulière à la connaissance du niveau de résistance des variétés vis-à-vis de la fusariose.

En Belgique peu d'informations étaient disponibles à ce sujet et notre travail a dès lors porté sur les critères d'évaluation de la résistance variétale à la fusariose de l'épi, en vue de leur utilisation dans des sélections subséquentes. Plusieurs types de résistance ont été rapportés. Schroeder et Christensen (1963) suggèrent que le blé possède une résistance au niveau de l'établissement de l'infection initiale et une résistance à l'invasion de l'épi. Ces deux types de résistance peuvent être

présents ensemble ou séparément. Wang et Miller (1988) évoquent par ailleurs des différences de résistance des variétés vis-à-vis des mycotoxines produites par *Fusarium*.

#### a. Evaluation comparée de la résistance au champ de variétés de blé vis-à-vis de *Fusarium culmorum*

En collaboration avec la Station d'Amélioration des Plantes de Grandes Cultures de Gembloux, nous avons observé, depuis l'épiaison jusqu'à la récolte, des épis inoculés artificiellement par *F. culmorum*, afin de rechercher les paramètres de l'infection les mieux corrélés avec la perte de poids de mille grains (PMG). Nous avons par ailleurs comparé la résistance de variétés de blé cultivées en Belgique avec des variétés françaises de sensibilité connue.

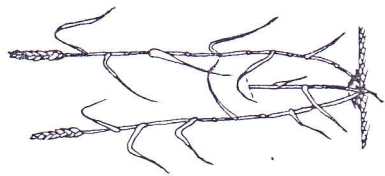
Quatre variétés (Copain, Réso, Bize et Capest), de résistance et de précocité connues, ont été comparées à 14 variétés dont la sensibilité était à préciser. Les variétés de référence présentent les caractéristiques suivantes:

|        |              |                 |
|--------|--------------|-----------------|
| Copain | semi-précoce | assez résistant |
| Réso   | semi-précoce | sensible        |
| Bize   | tardif       | assez résistant |
| Capest | tardif       | sensible        |

Le semis a été effectué en poquets avec 4 répétitions. L'inoculation artificielle des épis a été réalisée au moment de l'anthèse; toutes les variétés ont été inoculées endéans une période de 8 jours, en prenant en compte la précocité propre de chacune d'entre elles. L'inoculum était constitué d'une suspension contenant un mélange de spores de trois souches de *F. culmorum* isolées en Belgique et fournies par M. Cavelier (Station de Phytopathologie, Gembloux). Dans chaque poquet, nous avons inoculé 20 épis, qui ont été ensuite ensachés pendant 48 h pour maintenir une atmosphère humide. Les épis des poquets non inoculés ont été traités avec de l'eau.

Les observations au champ ont été effectuées à quatre dates différentes, chaque poquet recevant une cote d'infection comprise entre 1 et 9 (voir encadré 8). Les épis inoculés ont fait l'objet d'observations individuelles (voir encadré 9).

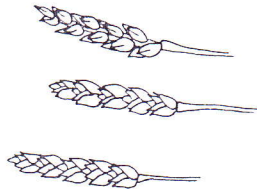
## Durant la végétation



Cote d'infection de la touffe

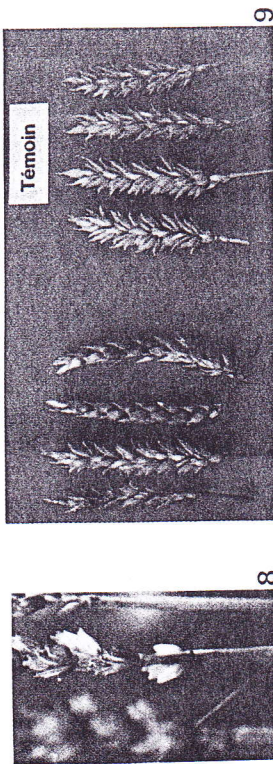
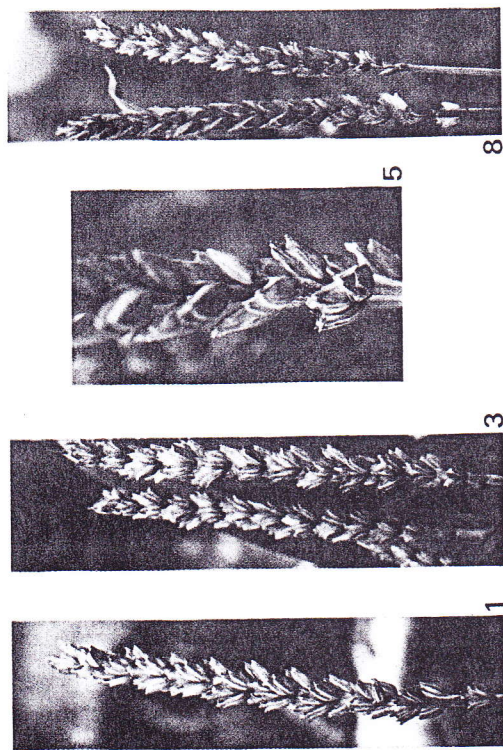
Pour 5 épis choisis au hasard:  
Nombre total d'épillets  
Nombre d'épillets fusariés

## A la récolte



Nombre total d'épillets  
Nombre total de grains  
PMG

**Encadré 9.** Les observations au champ ont été effectuées à 4 dates différentes, chaque poquet recevant une cote d'infection comprise entre 1 et 9. Chez 5 épis choisis au hasard dans chaque poquet, on a dénombré également le nombre d'épillets présentant des symptômes ainsi que le nombre total d'épillets. Après récolte, on a dénombré sur les épis le nombre total d'épillets, le nombre total de grains et le poids de mille grains (PMG). En vue de l'analyse statistique, nous avons considéré le résultat de chaque observation de façon indépendante.



**Encadré 8.** Echelle des symptômes de fusariose sur épis de blé tendre

- 1 = Aucun symptôme
- 2 = Apparition d'épillets blanchis dans le poquet
- 3 = Plus de 50% des épis avec un épillet blanchi
- 4 = Observation d'épillets blanchis à l'opposé des points d'infection
- 5 = Déplacement de l'infection vers d'autres épillets
- 6 = Plus de 50% des épis avec un déplacement de l'infection
- 7 = Coloration noire du rachis au sein de l'épi
- 8 = Coloration noire du rachis à la base de l'épi
- 9 = Plus de 50% des épis avec une coloration noire à la base de l'épi

Au cours du développement des symptômes au champ, nous avons déterminé à 4 dates différentes, le pourcentage du nombre moyen d'épillet fusariés par rapport au nombre total moyen d'épillets par épi. La figure 4 rapporte ces observations pour cinq variétés présentant des comportements différents. L'inoculation artificielle conduit toujours à une infestation totale de l'épi, mais on peut distinguer des différences dans la vitesse d'évolution des symptômes.

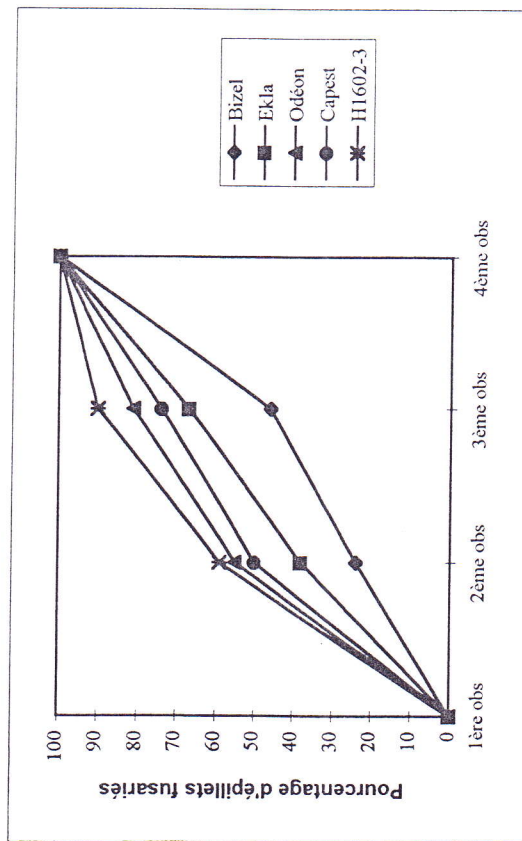


Figure 4. Evolution des symptômes de fusariose de blé en végétation au champ

Lors de la récolte, nous avons noté chez les épis inoculés une diminution du poids de mille grains (PMG) comprise entre 22 % chez la variété la moins affectée et 62 % chez la variété la plus sensible, par rapport au PMG des épis non inoculés. Nous avons observé que les symptômes en végétation n'étaient pas corrélés dans tous les cas avec la diminution du PMG. Ainsi la variété Bizel a présenté peu de symptômes et a montré une faible perte de PMG, tandis que les variétés Génial et Soisson montraient des symptômes marqués en cours de végétation avec une faible perte de PMG. A l'opposé, Rektor révèle une perte élevée du PMG à la récolte, malgré des symptômes peu marqués en cours de végétation.

Une analyse de groupe de toutes les variables a été réalisée par M. In (Centre de Biométrie, I.R.S.I.A., Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux), afin d'identifier les variables caractérisant le mieux les différences observées et de préciser le nombre de classes de variétés pouvant être mises en évidence à partir de ces variables.

Cette analyse nous a conduit à retenir 6 variables discriminantes permettant de définir 4 classes de variétés de comportement différent. Ces variables sont les suivantes:

|          |   |
|----------|---|
| MFU21    | nombre moyen d'épillets fusariés sur les épis inoculés, lors de la 2ème observation   |
| MFU31    | nombre moyen d'épillets fusariés sur les épis inoculés, lors de la 3ème observation   |
| MTN41    | nombre moyen de rachis noirs sur les épis inoculés, lors de la 4ème observation   |
| MFEC1    | fécondité moyenne des épis inoculés (rapport moyen entre le nombre de grains et le nombre d'épillets sur les épis inoculés) |
| MPDMILI  | poids de mille grains des épis inoculés   |
| MPDMILNI | poids de mille grains des épis non inoculés   |

Le tableau 3 présente les moyennes de ces six variables par variété et par classe. La classe n° 1 groupe des variétés (Camp Rémy, Capitaine, Castell, H1602-3, Sleipner, Soisson, Thésée) présentant une résistance hétérogène en végétation, mais dont le PMG est fortement affecté en cas de fusariose.

La classe n° 2 groupe des variétés (Apollo, Capest, Escorial, Estica, Odéon, Rektor, Réso, Token) ayant un comportement hétérogène vis-à-vis de la fusariose en végétation, mais dont le PMG, élevé chez les plantes non inoculées, est peu affecté par l'inoculation.

La classe n°3 est constituée par les variétés Ekla, Génial et Copain, cette dernière étant connue pour être assez fréquemment résistante à la fusariose. Ces variétés ont un comportement global similaire à Bizel, mais avec une résistance moins prononcée. Ekla et Génial, qui sont des obtentions de la Station d'Amélioration des Plantes de Gembloux, semblent donc présenter un comportement intéressant vis-à-vis de la fusariose de l'épi.

La classe n°4 comprend la seule variété Bizel, connue pour sa résistance à la fusariose. Chez cette variété, l'infection des épis était peu développée, tandis que la fécondité et le PMG des épis inoculés n'étaient guère affectés. Bizel présente donc un comportement global de résistance, tant en cours de végétation qu'à la récolte.

En considérant 6 variables (tableau 3), on peut identifier 2 sous-classes au sein de la classe n° 2. L'une regroupe Apollo, Capest, Escorial et Estica qui ont un meilleur comportement pour ce qui concerne l'infection de l'épi que les variétés Odéon, Rektor, Réso et Token formant la deuxième sous-classe.

#### b. Recherche de critères précoces d'évaluation

Nous avons recherché des critères précoces permettant de déterminer le niveau de sensibilité des variétés de blé à la fusariose, notamment en vue de prévoir les pertes du PMG à la récolte sur base d'observations réalisées sur les épis en végétation.

En tenant compte du nombre des épillets fusariés et de son accroissement entre deux observations, on peut établir des équations de corrélation qui expliquent entre 81% et 92% de la répartition des variétés dans les 4 classes décrites ci-dessus.

**Tableau 3.** Valeurs moyennes par variété et par classe des six principales variables utilisées dans l'analyse par groupe (Essai fusariose du blé 1991)

| Variétés | MFU2I     | MFU3I | MTN4I  | MFECI  | MPD MILI | MPDM ILNI |       |
|----------|-----------|-------|--------|--------|----------|-----------|-------|
| 1        | Cp Rémy   | 76,69 | 99,52  | 62,89  | 117,05   | 17,70     | 33,17 |
|          | Capitaine | 91,74 | 100,00 | 74,70  | 109,21   | 15,79     | 32,90 |
|          | Castell   | 92,54 | 95,32  | 69,95  | 66,40    | 15,74     | 34,50 |
|          | H1602-3   | 95,01 | 99,74  | 83,75  | 77,10    | 16,05     | 34,07 |
|          | Sleipner  | 77,51 | 96,90  | 77,24  | 73,97    | 16,80     | 31,70 |
|          | Soisson   | 88,96 | 99,72  | 77,88  | 162,71   | 18,89     | 29,55 |
| Thésée   | 91,01     | 99,23 | 73,06  | 105,68 | 16,69    | 33,31     |       |
| Moyenne  | 87,64     | 98,63 | 74,21  | 101,73 | 16,81    | 32,74     |       |
| 2        | Apollo    | 77,25 | 86,09  | 73,49  | 95,00    | 20,26     | 39,74 |
|          | Capest    | 73,05 | 91,76  | 56,27  | 123,82   | 17,74     | 38,06 |
|          | Escorial  | 78,46 | 93,31  | 77,43  | 90,05    | 20,60     | 38,86 |
|          | Estica    | 57,29 | 90,55  | 57,50  | 122,89   | 23,12     | 39,71 |
|          | Odéon     | 85,57 | 100,00 | 88,75  | 128,21   | 20,53     | 36,05 |
|          | Rektor    | 83,68 | 97,84  | 83,87  | 142,94   | 15,40     | 39,02 |
| Réso     | 88,80     | 99,46 | 91,25  | 80,27  | 21,37    | 39,05     |       |
| Token    | 88,56     | 99,46 | 91,25  | 80,27  | 21,37    | 39,05     |       |
| Moyenne  | 79,08     | 94,76 | 77,50  | 110,50 | 19,70    | 38,88     |       |
| 3        | Copain    | 75,47 | 94,34  | 23,08  | 142,69   | 21,40     | 34,40 |
|          | Ekla      | 69,24 | 93,12  | 27,50  | 158,42   | 25,51     | 33,27 |
|          | Génial    | 82,21 | 95,16  | 49,28  | 166,02   | 26,98     | 34,46 |
| Moyenne  | 75,64     | 94,21 | 33,28  | 155,71 | 24,63    | 34,04     |       |
| 4        | Bizel     | 38,87 | 63,07  | 23,13  | 203,71   | 24,88     | 31,72 |
|          | Moyenne   | 38,87 | 63,07  | 23,13  | 203,71   | 24,88     | 31,72 |

Il faut noter que l'évolution des symptômes de fusariose de l'épi chez le blé est fonction des conditions climatiques. Les dates auxquelles doivent être réalisées les comptages d'épillettes fusariées varieront donc d'une année à l'autre et devront se situer durant la phase exponentielle de développement de la maladie, observée dans notre expérimentation entre la 2ème et la 3ème observation.

Nos travaux sur la fusariose de l'épi ont permis d'identifier 4 classes de variétés ayant une sensibilité différente vis-à-vis de cette maladie sur base de la combinaison de 6 observations au champ effectuées entre l'inoculation artificielle des épis jusqu'à la récolte des grains. Les deux classes les moins sensibles correspondent aux modalités de résistance décrites par Schroeder et Christensen (1963), à savoir la résistance à l'infection et à la colonisation de l'épi, ainsi que la résistance à l'échaudage (Saur, 1984). Les deux classes regroupant les variétés les plus sensibles se distinguent par des pertes élevées du PMG à la récolte.

Selon certains auteurs, il serait intéressant de pouvoir déceler la résistance à la fusariose à des stades précoces de l'infection, en se basant notamment sur le développement systématique du champignon (Snijders, 1987) ou sur la résistance aux phytotoxines produites par le *F. culmorum* (Miller et Wang, 1988). L'application de ces deux critères ne semble cependant pas généralisable à l'ensemble des variétés.

## CHAPITRE 4. LE POIRIER ET LE POMMIER

A partir du début des années 1980, le feu bactérien causé par *Erwinia amylovora* a attaqué les variants sensibles de poirier et de pommier en Belgique, la poire « Durondeau » étant particulièrement menacée.

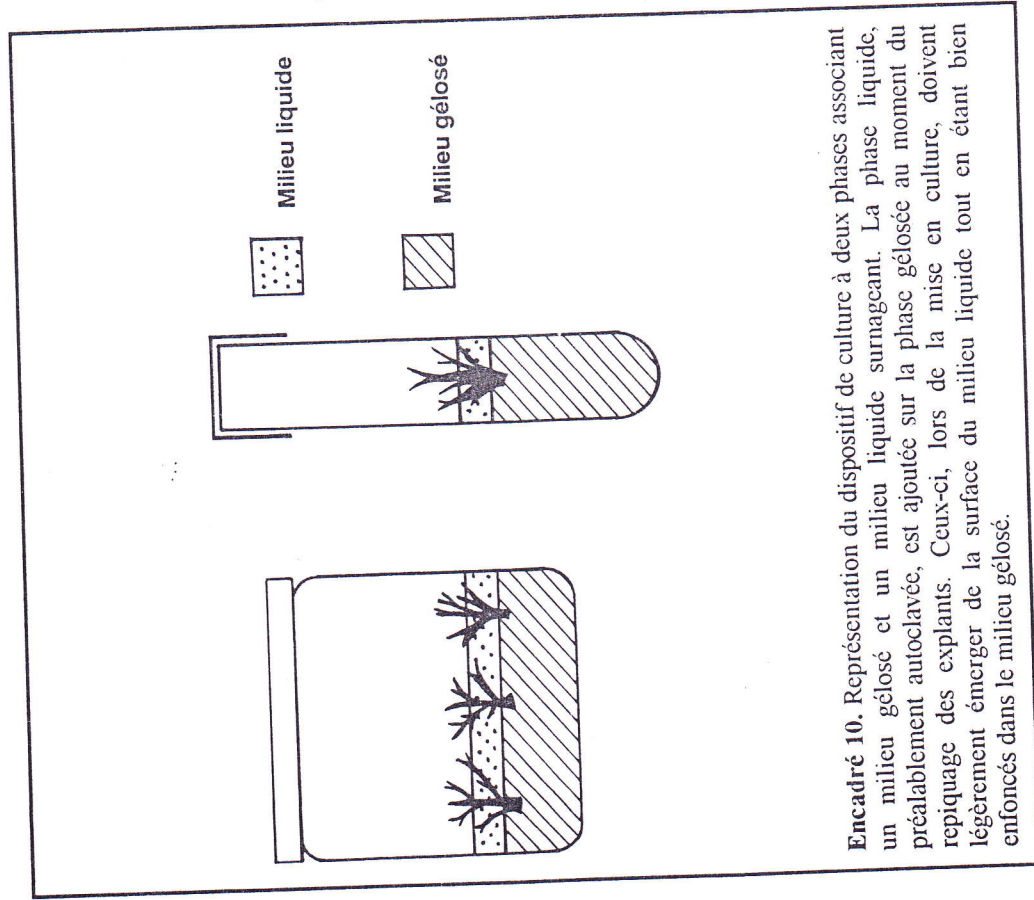
Cette situation nous a amenés à considérer l'utilisation de la vitroculture en vue d'obtenir des variants somaclonaux des deux espèces concernées et à évaluer les potentialités d'utilisation d'une technique d'inoculation axénique *in vitro* par la bactérie en cause, en vue d'identifier des individus résistants.

### 4.1. Vitroculture du poirier et du pommier

Les techniques de multiplication *in vitro* appliquées aux espèces ligneuses ont ouvert, depuis une dizaine d'années, des perspectives très prometteuses pour la reproduction, à l'échelle industrielle, de plantes saines identiques et autoracinées. Toutefois, certains dérèglements physiologiques tels que les phénomènes de « vitrification », de nécrose d'apex, de jaunissement et d'arrêt de croissance, entravent encore fortement la multiplication *in vitro* de nombreuses espèces ligneuses.

Nous avons mis au point un procédé original permettant de remédier partiellement à ces troubles de croissance, en utilisant un milieu à deux phases qui associe une couche gélosée et une couche liquide surnageante. Nous avons analysé les avantages du dispositif à deux phases par rapport aux améliorations proposées par différents auteurs pour l'utilisation du milieu monophasé.

A l'époque, la micropropagation du poirier et du pommier n'avait fait l'objet que de travaux préliminaires. Chez le poirier, nous avons appliqué à 13 variétés une méthode de culture de méristème avec formation de rosettes feuillées. Une technique originale (Viseur, 1987) basée sur l'utilisation d'un milieu de culture à 2 phases (voir encadré 10) a permis de micropropager



**Encadré 10.** Représentation du dispositif de culture à deux phases associant un milieu gélosé et un milieu liquide suragçant. La phase liquide, préalablement autoclavée, est ajoutée sur la phase gélosée au moment du repiquage des explants. Ceux-ci, lors de la mise en culture, doivent légèrement émerger de la surface du milieu liquide tout en étant bien enfoncés dans le milieu gélosé.

16 variétés de poires et 7 variétés de pommes, avec développement de tiges susceptibles de former des racines sur milieu d'enracinement. Les résultats favorables obtenus avec le milieu à 2 phases pourraient résulter d'une meilleure disponibilité en éléments nutritifs, d'une dilution de substances toxiques ou d'une promotion des échanges gazeux au sein du récipient de culture.

Un autre avantage de la culture en milieu biphasique résulte de ce que le développement des axillaires et l'allongement des tiges se déroulent en une seule étape, sans changement de milieu.

La micropropagation en milieu à deux phases ouvre, par ailleurs, des perspectives intéressantes en vue de l'automatisation des méthodes de micropropagation, actuellement recherchée par les entreprises spécialisées dans la multiplication des plantes *in vitro*.

Les régénérations de plantules de poirier et de pommier ont été obtenues à partir de racines primaires, de tiges ou de feuilles. Les facteurs les plus significatifs identifiés comme favorables à la micropropagation du poirier et du pommier furent l'utilisation d'auxines spécifiques comme l'IBA (acide indol-butérique) ou le NAA (acide naphthalène acétique) dans le milieu d'enracinement, le séjour des explants à l'obscurité avant la phase d'organogénèse, l'utilisation de lumière rouge stimulant le développement des bourgeons, la blessure chez les explants mis en vitroculture.

Nos résultats ont montré qu'il était possible d'obtenir, de façon reproductible, la régénération *in vitro* de plantules de poirier et de pommier à partir de différents tissus mis en culture (tableau 4).

Nous avons également étudié l'origine des pousses néoformées. Les méristèmes ont été obtenus soit directement à partir de cellules épidermiques et subépidermiques, soit par formation de bourgeons sur des cals, avec des pourcentages moyens de régénération de 30 % pour l'ensemble des variétés de pommes et de poires analysées. La technique que nous avons mise au point apporte dès lors une amélioration valorisable dans les programmes d'amélioration génétique de ces deux espèces.

**Tableau 4.** Comparaison des résultats obtenus par les différentes techniques de régénération mises au point chez le poirier et le pommier.

|         | Technique de régénération       | % de régénération | Nombre moyen de régénérats par cal | Temps de régénération | Observation de variations somaclonales |
|---------|---------------------------------|-------------------|------------------------------------|-----------------------|--|
| Poirier | cals de racines                 | ± 1               | 3 - 5                              | 3 à 6 mois            | oui                                    |
|         | cals cicatriciels d'entre-nœuds | 5 - 10            | 1 - 2                              | 1 à 2 mois            | oui                                    |
|         | explants foliaires              | 30 - 50           | 2 - 4                              | 2 à 4 mois            | oui                                    |
| Pommier | explants foliaires              | 60 - 100          | 2 - 4                              | 2 à 4 mois            | oui                                    |

#### 4.2. Technique de criblage pour la résistance du poirier et du pommier vis-à-vis de l'agent du feu bactérien

Les techniques traditionnelles de criblage pour l'évaluation de la résistance des poiriers et des pommiers au feu bactérien, par inoculation de semis âgés de un ou deux ans, sont lentes, laborieuses et requièrent de grandes surfaces en chambres conditionnées ou en serre. Les essais ne sont possibles que pendant une courte période de l'année (1 à 2 mois), lorsque les pousses sont en croissance active et lorsque les conditions de température et d'humidité sont favorables au développement de la maladie. Nous avons donc essayé de transposer la sélection au niveau de la vitroculture.

Notre technique d'évaluation visait à rechercher des individus résistants parmi des nouveaux génotypes (variants somaclonaux) induits au départ d'un clone initial par culture de tissus.

Nous avons développé un test précoce permettant d'analyser *in vitro* la résistance des variétés de poirier et de pommier à *E. amylovora*. Il est basé sur l'inoculation *in vitro* de microplantules de poirier et de pommier, d'une longueur de 2 à 3 cm, obtenues après micropropagation sur un milieu double-phase (voir encadré II).

Les symptômes qui se développent sur les plantes inocuées *in vitro* par *E. amylovora* sont semblables à ceux observés en conditions naturelles: nécroses, brûlures, gouttelettes d'exsudats, flétrissement. Les conditions expérimentales prévalant avant et après l'infection (stade de développement des plantules, milieu de culture, lumière, température, inoculum) affectent l'homogénéité des résultats et le taux moyen de nécrose.

Nous avons défini les paramètres permettant de distinguer les niveaux de sensibilité de variétés de poirier et de pommier sur base de leur réaction à l'inoculation *in vitro* avec une souche virulente d'*E. amylovora*. Cette technique a été appliquée à des plantules appartenant à 15 clones de poirier et à 8 clones de pommier. La mesure du développement des symptômes sur les tiges après une période déterminée, a permis d'établir une distinction claire entre les variétés très résistantes et les très sensibles, corrélée à celle observée sur base de la sensibilité au feu bactérien évaluée en verger. Toutefois, dans les cas de sensibilité intermédiaire vis-à-vis de *E. amylovora*, les résultats de l'inoculation de plantules *in vitro* ne sont pas corrélés à ceux obtenus en verger.

Nos résultats sont concordants avec ceux de Duron *et al.* (1987); ils confirment l'intérêt d'envisager des tests de criblage de plantules cultivées *in vitro* pour comparer des niveaux marqués de sensibilité au feu bactérien de clones de poirier et de pommier obtenus dans des programmes d'amélioration génétique.

Toutefois, il faut préciser que cette technique de sélection *in vitro* ne constitue pas une alternative, mais plutôt un complément utile, vis-à-vis des procédés classiques d'évaluation de la résistance réalisés en serre ou au verger.

#### 4.3. Sélection de variants somaclonaux de poiriers et de pommiers résistants au feu bactérien

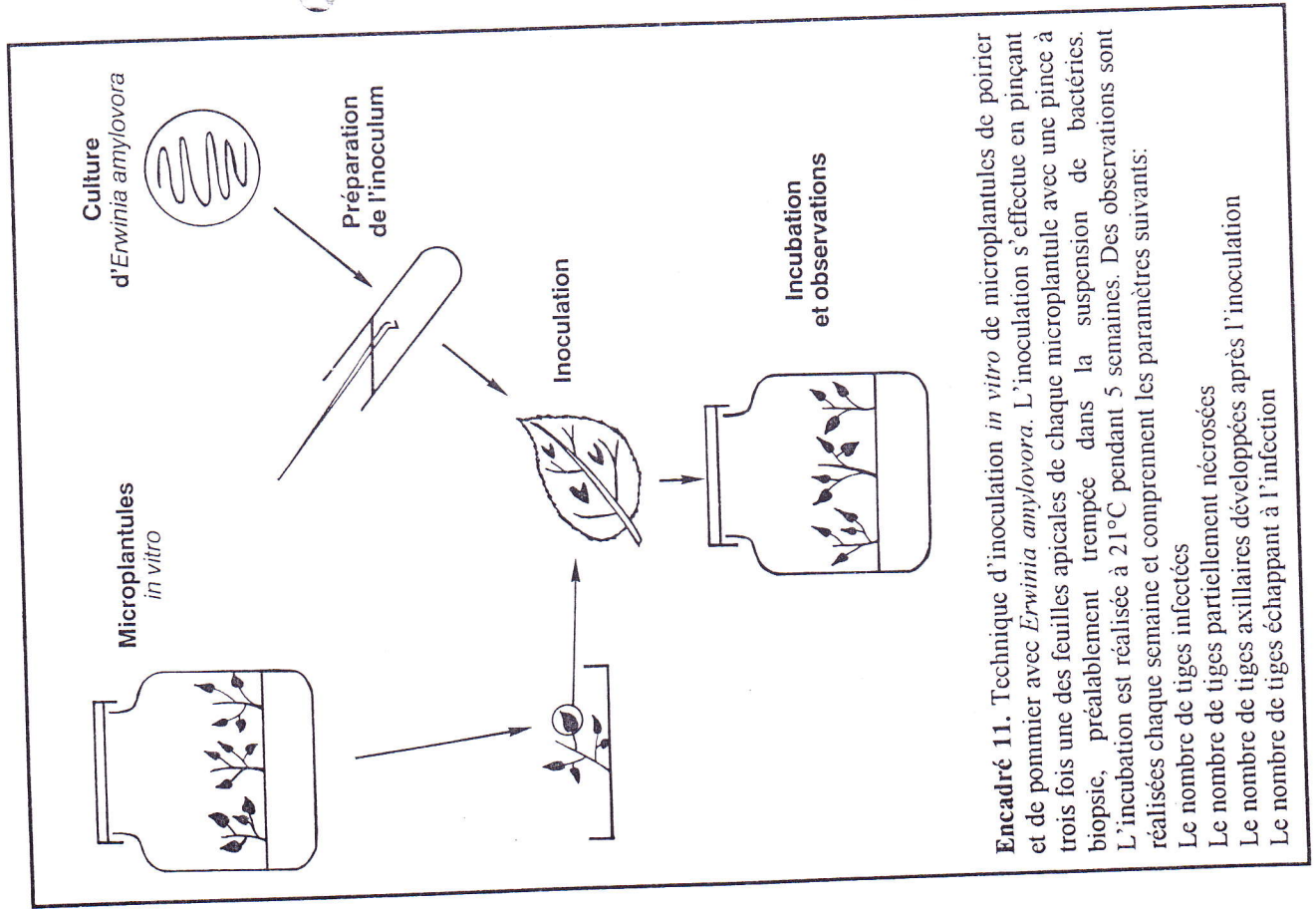
La technique d'inoculation *in vitro* a été appliquée pour la caractérisation de la sensibilité à *E. amylovora* de variants somaclonaux de poiriers et de pommiers.

A partir de la variété de poirier « Durondeau », nous avons obtenu trois clones présentant, *in vitro*, une résistance accrue au feu bactérien par rapport à la variété de départ. Les clones variants et les témoins « Durondeau » se distinguent nettement par le taux de pousses axillaires se développant après l'inoculation par la bactérie. Cette caractéristique s'est maintenue, après acclimatation, lors des tests d'infections réalisés sur plantes en serre (photos 4 et 5).

Deux variants, (numéros RB87 et R4P9) ont été caractérisés comme étant tétraploïdes. Leur résistance est vraisemblablement liée à des modifications de la physiologie du développement chez les plantes tétraploïdes, lesquelles possèdent des entre-noeuds plus courts et ont une croissance moins forte que la variété de départ.

La méthode de sélection que nous avons mise au point peut être appliquée sur différents clones de poirier et de pommier. Elle présente toutefois certaines limitations. Le niveau de la résistance d'une variété s'exprime par la proportion d'individus développant des symptômes au sein d'un échantillon représentatif d'une population donnée, dans des conditions expérimentales définies. Dans le cas de tests réalisés *in vitro*, l'imprécision de la mesure de l'extension des symptômes sur plantules, et les facteurs de variabilité qui affectent l'expression de ces symptômes, nécessitent d'inoculer de 30 à 70 individus par clone.

La sélection d'individus résistants au sein d'une population donnée est sujette à deux risques d'erreur: l'erreur de première espèce qui consiste à rejeter des individus, alors qu'ils sont plus résistants que la variété d'origine, et l'erreur de seconde espèce qui conduit à retenir des clones aussi sensibles que le témoin.



**Encadré 11.** Technique d'inoculation *in vitro* de microplantules de poirier et de pommier avec *Erwinia amylovora*. L'inoculation s'effectue en piquant trois fois une des feuilles apicales de chaque microplantule avec une pince à biopsie, préalablement trempée dans la suspension de bactéries. L'incubation est réalisée à 21°C pendant 5 semaines. Des observations sont réalisées chaque semaine et comprennent les paramètres suivants:  
 Le nombre de tiges infectées  
 Le nombre de tiges partiellement nécrosées  
 Le nombre de tiges axillaires développées après l'inoculation  
 Le nombre de tiges échappant à l'infection

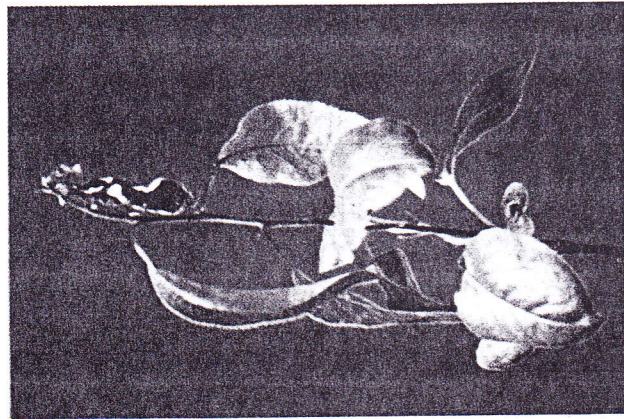


Photo 4.

**Photo 4.** Développement des symptômes de feu bactérien sur une plante de la variété de poirier « Durondeau » inoculée au niveau de la dernière feuille; la bactérie progresse rapidement dans la tige jusqu'à la base de la plante et provoque sa mort.

**Photo 5.** Reprise de croissance d'une plante du somaclone RB87 de la variété « Durondeau », après inoculation avec *E. amylovora*. Des tiges saines se développent à partir des bourgeons axillaires situés en-dessous de la partie apicale nécrosée.

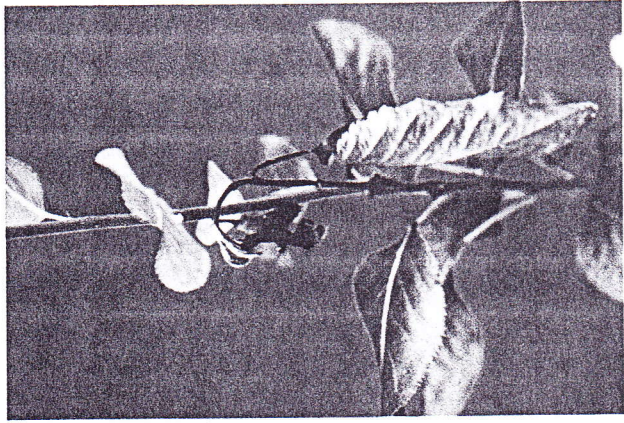


Photo 5.

Les conditions pour lesquelles la variabilité des réponses à l'infection est la plus faible (plantules en phase de croissance, faible lumière, concentration élevée en inoculum), correspondent à des symptômes bien marqués. Ce sont aussi les conditions pour lesquelles le risque d'erreur de première espèce est le plus élevé.

Par ailleurs, on peut réduire l'intensité des symptômes en diminuant la concentration de l'inoculum ou en plaçant les plantes inoculées sous une intensité lumineuse élevée et à des températures basses. Lors de la mise au point du test de criblage et pour l'évaluation des paramètres de mesure, il convenait de réduire au maximum la variance de la mesure de résistance. Toutefois, dans la pratique du criblage de variants résistants, on peut tolérer une marge d'erreur de seconde espèce plus grande que celle de première espèce, car les clones sensibles pourront être éliminés lors de l'évaluation au verger. Les critères de sélection peuvent donc être élargis, de façon à conserver un nombre suffisant de plantes à tester au champ.

On peut également réaliser le criblage en plusieurs étapes: effectuer d'abord, sur une douzaine de plantules par clone, une première inoculation dans des conditions peu favorables à l'extension des symptômes (souche peu virulente, inoculum dilué) ce qui permet d'éliminer les individus les plus sensibles, puis soumettre le matériel à des conditions de sélection plus sévères, en retenant les clones qui ont échappé à la première inoculation.

Cependant, les protocoles de sélection *in vitro* ne permettent pas de rendre compte de certains facteurs de la résistances des variétés: effet du porte-greffe, sensibilité des fleurs, date de floraison, aptitude à former des fleurs secondaires, quantité d'inoculum. Seule l'évaluation du comportement en verger permet d'évaluer ces différents paramètres.

L'analyse cytologique a mis en évidence des modifications chromosomiques chez nos poiriers variants, mais les variations situées au niveau des gènes échappent à la révélation par le comptage des chromosomes. Dès lors, la caractérisation des variants devra également se faire sur base de tests biochimiques, enzymologiques ou moléculaires.

Les possibilités de régénération de plantules de poirier et de pommier à partir de culture de tissus ouvrent la voie à l'intégration de la vitroculture dans les programmes de sélection pour la résistance aux maladies. Cependant, le nombre de clones que nous avons régénérés, au sein de chaque variété testée, par les différentes techniques de régénération mises au point, est trop limité pour pouvoir conclure définitivement quant au choix de la méthode la plus efficace pour obtenir des variants somaclonaux.

En ce qui concerne la valeur pomologique et la conformité des plantes que nous avons produites par micropropagation, il sera nécessaire d'attendre les résultats d'observations en verger portant sur plusieurs années.

Les clones de poirier que nous avons sélectionnés sont actuellement en cours d'évaluation dans des vergers de la Koninklijk Opzoekingsstation van Gorsem, quant à leurs caractères pomologiques et à leur résistance au feu bactérien.

Pour ce qui concerne les pommiers, des observations réalisées en verger sur le cv. « Golden Delicious » ont montré que des mutants tétraploïdes présentaient une meilleure résistance vis-à-vis du feu bactérien, par rapport à la variété diploïde d'origine (Thibault, communication personnelle). Les variétés tétraploïdes produisent des fruits plus gros que les variétés diploïdes, tandis que leur croissance et leur production sont plus faibles, ce qui peut présenter un intérêt dans le cadre de la diversification du marché des fruits à pépins.

Par ailleurs, le doublement chromosomique permet de rendre autocompatibles des diploïdes autoincompatibles. C'est le cas notamment chez un mutant tétraploïde de la variété de poirier « Fertility ». Les variants tétraploïdes de la variété « Durondeau » que nous avons obtenus pourraient dès lors être utilisés comme géniteurs dans des programmes de création de cultivars triploïdes.

## CHAPITRE 5. CONCLUSIONS GÉNÉRALES DES RECHERCHES

La lutte intégrée contre les agents de maladie chez les végétaux cultivés postule la mise en oeuvre d'une diversité de moyens préventifs et curatifs, parmi lesquels l'expression du génome de la plante joue un rôle primordial, dans la mesure où le choix de la variété constitue le point de départ de la chaîne événementielle conduisant à la récolte du produit. Cependant, dans le domaine phytopathologique, le problème de la résistance des génotypes végétaux se complique à cause de l'instabilité génétique des agents pathogènes, ce qui provoque des « écroulements » de la résistance au champ, indépendamment de la stabilité génétique des plantes hôte.

Au début des années 1980, nous avons orienté nos recherches vers l'étude des potentialités des techniques basées sur la vitroculture d'explantants végétaux en vue d'aider à la sélection, chez les plantes cultivées, de types résistants ou tolérants vis-à-vis de divers agents phytopathogènes.

Notre programme a pris en compte le rôle potentiel de la vitroculture dans les étapes suivantes:

- obtention de nouveaux génotypes différents, homogènes, et stables, présentant des caractéristiques améliorées par rapport à une plante-mère sur le plan de la résistance ou de la tolérance vis-à-vis d'une maladie,
- sélection précoce de tels génotypes permettant de traiter un grand nombre d'individus au moindre coût et sur une surface minimale,
- multiplication conforme et rapide des nouveaux génotypes obtenus, en vue de leur expérimentation au champ à grande échelle.

La pomme de terre a été choisie comme modèle, eu égard à la complexité de son génome tétraploïde (rendant particulièrement intéressante l'obtention éventuelle de variants) et à sa très

Désirée et les variants qui en sont issus, ce qui est essentiel à la valorisation de ces derniers.

Chez le blé, des variants somaclonaux originaires de culture d'embryons matures ou immatures, ainsi que des variants gamétoclonaux issus d'anthers, ont présenté également des descendance dotées de propriétés DHS, ce qui situe favorablement les techniques de vitroculture d'anthers dans le processus d'amélioration de cette espèce.

Pour ce qui concerne les poiriers et les pommiers, le manque de recul ne permet pas de nous prononcer actuellement quant à l'homogénéité et la stabilité des nouveaux caractères observés.

## 5.2. Techniques de sélection

Nos résultats ont mis en évidence les potentialités mais aussi les limites d'utilisation de la vitroculture en vue de la sélection de génotypes de plantes résistantes vis-à-vis des agents pathogènes.

Pour ce qui concerne le mildiou de la pomme de terre, seule l'expérimentation au champ a permis d'identifier les clones présentant une résistance stable dans le feuillage.

De même, pour la gale commune de la pomme de terre, l'inoculation *in vitro* de l'agent causal ne s'est pas révélée adéquate. Par contre les tests en serre et au champ ont permis de sélectionner des types résistants.

Pour ce qui est de la résistance à la fusariose du blé, une technique associant l'inoculation des épis au champ et l'observation de la vitesse d'évolution des symptômes en cours de saison de culture, a montré une bonne corrélation avec les comportements de résistance au champ connus pour certaines variétés.

Par ailleurs, la sélection après inoculation et développement des symptômes *in vitro*, s'est révélée adéquate pour tester la résistance vis-à-vis de deux bactérioses: l'agent de la jambe noire *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* chez la pomme de

grande plasticité en culture *in vitro*, illustrée par nombre de travaux la concernant.

L'objectif était de tester les possibilités d'obtention, à partir de variétés de pomme de terre très prisées, de variants présentant l'une ou l'autre amélioration par rapport à un phénotype de départ, tout en conservant au mieux ses caractéristiques agronomiques.

Outre la pomme de terre, nous avons expérimenté deux autres espèces pour lesquelles peu de données existaient au début de notre recherche en matière de vitroculture: d'une part le blé tendre *Triticum aestivum* (espèce diploïde propagée par la graine) et d'autre part le poirier et le pommier, espèces ligneuses à génome complexe propagées par voie végétative.

## 5.1. Obtention des variants

Chez la pomme de terre, nous avons obtenu des variants dont la descendance présentait les caractéristiques requises par les schémas de sélection végétale, à savoir répondre aux critères DHS (différence, homogénéité et stabilité).

Ce fut le cas pour les variants 227 et 228 issus du cv. Bintje, et présentant une résistance au mildiou dans la partie supérieure du feuillage, associée à des caractères morphologiques et agronomiques particuliers qui se sont maintenus au champ pendant plusieurs saisons de culture.

Il en fut de même pour des variants issus du cv. Désirée: le variant 60B1 résistant à la gale commune et des variants résistants au niveau de la tige vis-à-vis de *E. carotovora ssp. atroseptica*. Les variants obtenus possèdent des tubercules dont la morphologie est proche de celle de la variété dont ils sont originaires. Sur le plan biochimique, les tubercules variants n'ont pu être distingués de ceux de la variété d'origine par électrofocalisation des protéines ou par analyse des isoenzymes. Par contre, les études comparatives au niveau des DNA répétitifs, utilisés comme marqueurs, montrent des empreintes génétiques différentes et reproductibles différenciant la variété

terre et l'agent du feu bactérien *Erwinia amylovora* chez le poirier et le pommier.

Des observations occasionnelles portant sur d'autres paramètres que la résistance vis-à-vis de maladies suggèrent la possibilité d'obtention de variants somaclonaux tolérants au froid ou hyperproductifs chez la pomme de terre et de variants gamétoclonaux tolérants à la salinité chez le blé.

### 5.3. Caractérisation moléculaire des variants

La méthodologie mise au point dans le laboratoire du Dr. Patrick du Jardin a permis l'obtention de sondes moléculaires capables d'identifier par empreintes génétiques les variants de pomme de terre obtenus à partir de la variété Désirée.

Ces résultats sont d'importance sur le plan théorique en identifiant nos variants comme étant des mutants possédant des DNA modifiés. Sur le plan pratique, il s'agit en l'occurrence du franchissement d'une étape fondamentale dans la valorisation économique des variants somaclonaux.

### 5.4. Valorisation des résultats

L'exploitation de nos résultats peut être envisagée selon deux approches différentes: la valorisation des méthodes et la valorisation des génotypes sélectionnés.

- Valorisation des méthodes

Pour ce qui est des méthodologies, nous avons démontré leurs potentialités significatives dans l'obtention et la sélection de caractères DHS de résistance vis-à-vis d'agents pathogènes, pour autant qu'elles soient correctement appropriées à chaque problème posé.

Pour ce qui concerne le mildiou de la pomme de terre, alors que la résistance verticale basée sur l'hypermensibilité, peut être sélectionnée *in vitro*, il n'en va pas de même de la résistance de

type horizontal, et seule l'infection au champ s'est révélée capable d'identifier nos variants résistants.

S'agissant de la gale commune de la pomme de terre, la culture en serre sur substrat infecté a permis de sélectionner des variants résistants parmi les somaclones du cv. Désirée.

Pour la fusariose du blé, nous avons mis au point une technique d'inoculation artificielle au champ qui permet d'identifier et de caractériser les génotypes résistants en cours de culture et d'accélérer ainsi leur repérage.

Enfin, dans le cas des deux bactéries *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* et *Erwinia amylovora*, la sélection après inoculation *in vitro* a permis d'identifier des génotypes variants résistants.

On notera que les techniques de sélection que nous avons mises au point peuvent s'appliquer également à d'autres méthodes d'obtention de génotypes que la variation somaclonale, notamment via l'hybridation ou la transgénèse.

- Valorisation des génotypes

Pour ce qui est des nouveaux génotypes obtenus, c'est l'expérimentation à grande échelle dans les conditions pratiques du champ, du verger ou de la serre, qui constitue le facteur déterminant de l'évaluation. Il convient par ailleurs d'identifier des marqueurs moléculaires susceptibles de fournir des empreintes génétiques fiables et spécifiques.

Nos recherches ont réussi à rencontrer l'ensemble de ces exigences pour ce qui concerne le variant 60D issu de Désirée et résistant à la gale commune. Pour les autres modèles hôte-parasite, nous avons sélectionné des génotypes possédant des caractéristiques nouvelles intéressantes, mais généralement associées à certains caractères inadéquats.

### 5.5. Perspectives d'avenir

La principale faiblesse actuelle dans l'exploitation des variants se situe au niveau du rendement, qui a constitué jusqu'à présent

## VITROCULTURE AND PLANT PATHOLOGY

C. ANCEAU, P. LEPOIVRE and J. SEMAL

(Summary)

The results of experiments carried out at the « Faculté des Sciences Agronomiques », Gembloux, Belgium, by the « Centre de Lutte Intégrée en Phytopathologie » during the period 1982-1992, are presented and discussed.

The research programmes, dealing with the use of vitroculture, received the financial support of the « Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture - I.R.S.I.A. », Brussels, Belgium.

These researches aimed at evaluating, in the field of plant pathology, the potentials and limitations of the variants generated through vitroculture and of the selection methods based on vitrotechniques.

The following host-pathogen couples were studied: potato late blight caused by *Phytophthora infestans*, potato scab caused by *Streptomyces scabies*, potato black leg and tuber rot caused by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, wheat leaf and glume blotch caused by *Septoria nodorum*, wheat head blight caused by *Fusarium culmorum*, and fireblight of pear and apple caused by *Erwinia amylovora*.

Vitroculture was used for rapid clonal propagation, for obtaining variants from existing varieties, and for early selection of resistant types within such variants.

Resistance to all disease agents tested was obtained within potato vitrovariants. Selection methods, however, required to be specifically adapted to each host-pathogen couple: field selection for late blight, selection in the greenhouse followed by field selection for scab, and vitroselection followed by greenhouse selection for the black leg bacterium.

un paramètre essentiel des schémas de sélection classique chez les plantes cultivées. La prise en compte de ce défaut pourra s'opérer soit par une sélection précoce *in vitro*, sur la base de critères phénotypiques, ou encore en utilisant le matériel sélectionné comme géniteur dans des programmes de croisement en vue d'obtenir des génotypes fins de qualité. Une telle procédure devra être envisagée également lorsque le caractère favorable nouveau est associé à l'une ou l'autre caractéristique négative

Au début des années 80, dans le cadre de l'engouement soulevé par les différentes approches biotechnologiques (variation somaclonale ou gamétoclonale, vitroselection, transformation génétique...) en matière d'amélioration génétique des plantes, on envisageait que les génotypes produits par ces nouvelles technologies allaient pouvoir être valorisés directement en tant que variété en court-circuitant les protocoles d'amélioration classique. Or, les desiderata des utilisateurs (industriels, sélectionneurs, consommateurs privés) sont tels qu'un variant (somaclonal ou gamétoclonal), de même qu'une plante transgénique, réunissent rarement toutes les exigences requises (propriétés qualitatives du produit récolté, rendement, comportement phytotechnique ou technologique). Dès lors, avec le recul, les génotypes obtenus par variation somaclonale ou gamétoclonale apparaissent dans la plupart des cas comme des produits à finaliser dans un programme d'amélioration classique, par un nombre limité d'opérations permettant de compenser les défauts observés chez les variants, tout en préservant les qualités de la variété de départ. Dans cette optique, la variation somaclonale apparaît surtout comme un maillon du processus d'amélioration, susceptible d'accélérer les techniques classiques et de les compléter en révélant des caractères nouveaux par rapport à ceux des génotypes existant.

With wheat, vitrovariants were obtained from mature embryos, immature embryos, or anthers. An improved technique of measuring field resistance to head blight was developed.

With pear and apple, improved methods of vitropagation and of vitroselection for resistance to fireblight were set up.

A scab-resistant variant derived from the potato cv. « Désirée » was found to be field-resistant in 3 successive cropping seasons, while keeping the other characteristics of the variety. The variant could be distinguished from cv. « Désirée » by a molecular hybridization technique.

The other variants selected so far have still to prove field resistance, or had defects preventing their direct use as a variety. They could serve as parents in further breeding programmes, in order to obtain improved products suitable for practical use.

## BIBLIOGRAPHIE

- BAJAJ Y.P.S. (1987). Potato Biotechnology in Agriculture and Forestry 3. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New-York, London, Paris, Tokyo. 509 p.
- BECKMANN J.S., SOLLER M. (1983). Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and cost. *Theor. Appl. Genet.*, 67, 35-43.
- BEEEMSTER A.B.R., DE BOKX J.A. (1987). Survey of properties and symptoms. In: J.A. DE BOKX and J.P.H. VAN DER WANT (Eds). Viruses of potatoes and seed-potato production, 84-113
- BEHNKE M. (1979). Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of *Phytophthora infestans* and regeneration of resistant plants. *Theor. Appl. Genet.*, 56, 151-152.
- BHOJWANI S.S. (1990). Plant tissue culture: Applications and limitations. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 461 p.
- BJOR T., ROER L. (1980). Testing the resistance of potato varieties to common scab. *Potato Res.*, 426, 13-18.
- CARON D., GROSSELEIL T., JUGNET M.P. (ITCF) (1990). La fusariose des épis. *Perspect. Agric.*, 153, 38-40.
- CAVELIER M., ISTASSE A., SIMON X. (1990). Inventaire de l'état sanitaire des céréales en 1990. *Parasitica*, 46, 55-67.
- CHUANG C.C., OUYANG T.W., CHIA H., CHOU S.M., CHING C.K. (1978). A set of potato media for wheat anther culture. In: Proc. Symp. Plant Tissue Culture. Science press, Beijing, 51-56.

- MEULEMANS M., DUCHENE D., TEGERA P., FOUARGE G. (1986a). Selection of variants by dual cultures of potato and *Phytophthora infestans*. In: SEMAL, J. (Ed). Somaclonal Variations and Crop Improvement. Advances in Agricultural Biotechnology, Martinus Nijhoff, Dordrecht, 219-223.
- MEULEMANS M., DUMONT J., ANCEAU C., FOUARGE G. (1986b). *In vitro* tuberization of potato. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent*, 51, 527-532.
- MEULEMANS M., FOUARGE G. (1986c). Regeneration of potato somaclones and *in vitro* selection for resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent*, 51, 533-546.
- MEULEMANS M., DUCHENE D., FOUARGE G. (1987). Selection of variants by dual culture of potato and *Phytophthora infestans*. In: BAJAJ Y.P.S. (Ed). Potato Biotechnology in Agriculture and Forestry 3. Springer, Berlin, Heidelberg, New-York, 318-331.
- MEULEMANS M., ANCEAU C., LEPOIVRE P., SEMAL J., FOUARGE G., KÜMMERT J. (1989). Culture *in vitro* et production de plants de pomme de terre. *L'agriculteur*, 12, 8.
- NYS L. (1973). « Roxane », nouvelle variété belge de pomme de terre. Etude culinaire et technologique. *Rev. Agric.*, 1, 63-88.
- PICARD E. (1988). Sélection du blé: l'intégration des biotechnologies. *Biofutur*, 68, 48-58.
- PIRI Kh., ANCEAU C. (1989a). Embryogenesis from cultures of *Triticum aestivum* cv. Sabine in liquid medium. Abstracts of the International Conference - Amiens - July 10-12, 1989: The impact of biotechnology in agriculture. Po.SE.4.

- CLARK C.F., STEVENSON F.J., SCHAAL L.A. (1938). The inheritance of scab resistance in certain crosses and selfed lines of potatoes. *Phytopathology*, 28, 878-890.
- DAAMEN R.A., LABNGERAK C.J., STOL W. (1991). Surveys of cereal diseases and pests in the Netherlands. 3. *Monographella nivalis* and *Fusarium* spp. in winter wheat fields and seed lots. *Neth. J. Plant Pathol.*, 97, 105-114.
- DURON M., PAULIN J.P., BRISSET M.N. (1987). Use of *in vitro* propagated plant material for rating fire blight susceptibility. *Acta Hortic.*, 217, 317-324.
- KARP A.R., JONES M.G.K., BRIGHT S.W.J. (1984). Chromosome doubling in monohaploid and dihaploid potatoes by regeneration from cultured leaf explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 3, 363-373.
- LARKIN P.J., SCOWCROFT W.R. (1981). Somaclonal variation. A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 60, 197-214.
- LEPOIVRE P., VISEUR J., DUHEM K., CARELS N. (1986). Double-layer culture technique as a tool for the selection of calluses resistant to toxic material from plant pathogenic fungi. In: SEMAL, J. (Ed.). Somaclonal Variations and Crop Improvement. Advances in Agricultural Biotechnology, Martinus Nijhoff, Dordrecht, 45-52.
- MARX J.L. (1984). Instability in plants and ghost of Lamarck. *Science*, 224, 1415-1416.
- Mc CLINTOCK B. (1950). The origin and behaviour of mutable loci in maize. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 36, 344-355.
- MELARD V. (1971). La nouvelle variété belge de pomme de terre: Roxane. *Rev. Agric.*, 6-7, 765-770.
- MEULEMANS M. (1984). Extension de la variabilité chez les plantes cultivées par exploitation de la variation somaclonale. *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, 19, 61-80.

- PIRI Kh., ANCEAU C., SEILLEUR P. (1989b). Amélioration des techniques androgénétiques par modification des conditions de croissance des plantes donneuses d'anthers, chez *Triticum aestivum* L. em. *Theil. Bull. Rech. Agron. Gembloux*, 24, 213-217.
- RAJAPAKSE D.P., IMAI T., ISHIGE T. (1991). Analysis of potato microtuber proteins by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Potato Res.*, 34, 285-293.
- RIETVELD R.C., HASEGAWA P.M., BRESSAN R.A. (1991). Somaclonal variation in tuber disc-derived populations of potato. I. Evidence of genetic stability across tuber generations and diverse locations. *Theor. Appl. Genet.*, 82, 430-440.
- SAUR L. (1984). Comportement de quatre variétés de blé tendre vis-à-vis de la fusariose de l'épi causée par *Fusarium roseum* var. *culmorum* (Schwabe) Sn. et H. *Agronomie*, 4, 939-943.
- SCHROEDER H.W., CHRISTENSEN J.J. (1963). Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 53, 831-838.
- SEMAL J. (1985). Variants somaclonaux et amélioration des plantes. *Nouvelles de la science et des technologies*, 49-59.
- SEMAL J. (1986). Somaclonal Variations and Crop Improvement. *Advances in Agricultural Biotechnology*, Martinus Nijhoff, Dordrecht. 277 p.
- SEMAL J., LEPOIVRE P., MEULEMANS M., VISEUR J. (1984). Cultures de tissus et nouvelles techniques d'amélioration des végétaux. *Parasitica*, 40, 77-88.
- SEMAL J., LEPOIVRE P., KUMMERT J., ANCEAU C., VISEUR J. (1987). Culture *in vitro* de tissus végétaux et protection de l'environnement. *Agricontract*, 190, X1-X4.

- SEMAL J., KUMMERT J., LEPOIVRE P., MEULEMANS M., VISEUR J. (1988). *In vitro* cultures for producing pathogen free plants and selecting disease resistant genotypes. *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, 23, 261-269.
- SEMAL J., LEPOIVRE P. (1990). Application of tissue culture variability to crop improvement. *In: BHOJWANI S.S. (Ed.). Plant tissue culture: Applications and limitations*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 301-315.
- SEMAL J., LEPOIVRE P. (1992). Biotechnologies et agriculture: impact et perspectives. *Cah. Agric.*, 1, 153-162.
- SNIJDERS C.H.A. (1987). Interaction between winter wheat genotypes and isolates of *Fusarium culmorum*. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksunivers. Gent*, 52.
- VASIL V., VASIL I.K. (1981). Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum* and *P. americanum* x *P. purpureum*. *Ann. J. Bot.*, 68, 864-872.
- VISEUR J. (1987a). Use of *in vitro* cultures to obtain, select and propagate new genotypes of disease resistant trees., *Swiss Biotech.*, 6, 12-14.
- VISEUR J. (1987b). La lutte génétique contre le feu bactérien des rosacées. *Le Fruit Belge*, 420, 315-323.
- VISEUR J. (1987c). Micropropagation of pear *Pyrus communis* L. in double phase culture medium. Symposium on *in vitro* problems related to mass propagation of horticultural plants. *Acta Hortic.*, 212, 117-124.
- VISEUR J. (1988). Toepassing van *in vitro* - kulturentechnieken voor het selektieren van appel- en perevarianten resistent tegen het bacterievuur. *Fruiteelt*, 3, 10-12.

WISEUR J. (1989a). New technique for continuous regeneration of pear and apple trees using meristematic proliferation nodules by *Agrobacterium tumefaciens*. Abstracts de la conférence Moët Hennessy Louis Vuitton: Maîtrise de la morphogénèse, Aix-les-Bains, 18-20 septembre 1989, 33.

WISEUR J. (1989b). Evaluation of fire blight resistance of somaclonal variants induced from the pear cultivar « Durondeau ». Abstracts of Fifth I.S.H.S. International Workshop on Fire Blight, June 19-22, 1989. Diepenbeek-Belgium, 37.

WISEUR J., TAPIA Y FIGUEROA L. (1987). *In vitro* co-culture as a tool for the evaluation of fire blight resistance in pears and apples. Fourth International Workshop on Fire Blight. Ithaca (New-York). *Acta Hort.*, 217, 273-282.

WISEUR J., DRUART P. (1988). Utilisation de la culture *in vitro* pour l'amélioration génétique des arbres fruitiers. *Le Fruit Belge*, 422, 156-164.

WANG Y.Z., MILLER J.D. (1988). Effects of *Fusarium graminearum* metabolites on wheat tissue in relation to fusarium head blight resistance. *J. Phytopathol.*, 122, 118-125.

ZHANG L.J., SEILLEUR P. (1986). *In vitro* regeneration of plants from calluses of *Triticum aestivum* cultivars. In: SEMAL, J. (Ed.). Somaclonal Variations and Crop Improvement. Advances in Agricultural Biotechnology. Martinus Nijhoff, Dordrecht, 182-187.

ZHANG L.J., ANCEAU C., LEPOIVRE P., SEILLEUR P., SEMAL J. (1987a). An efficient method for the regeneration of wheat (*Triticum aestivum*) from anther culture. *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, 22, 301-314.

ZHANG L.J., SEILLEUR P. (1987b). A simple fast method to obtain high frequency of plant regeneration from mature and immature wheat embryos. *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, 22, 187-197.

ZHANG L.J., ANCEAU C., LEPOIVRE P., SEILLEUR P., SEMAL J. (1988). An efficient method for the regeneration of wheat from anther culture. *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, 96, B70(Abtract).