

Etude de la variabilité génétique obtenue chez le maïs après callogenèse et régénération de plantes *in vitro*.

Michel BECKERT, Maurice POLLACSEK & Michel CAENEN

I.N.R.A., Station d'Amélioration des Plantes, F 63039 Clermont-Ferrand Cedex.

RÉSUMÉ

*Variabilité génétique,
Culture in vitro,
Régénération,
Maïs.*

Notre étude a été menée pour analyser les conséquences de la callogenèse et de la régénération de plantes *in vitro* sur la variabilité génétique de quelques lignées pures de maïs, elles-mêmes manipulables par cette technique.

Les techniques de culture *in vitro* ont été celles proposées par GREEN & PHILLIPS (1975) ; les génotypes utilisés ont été ceux déjà cités par BECKERT & POLLACSEK (1979) et sont principalement : A 34, A 188, A 641, CM 182, CO 158, F 1048, F 1110, ND 203, W 117, WD.

Les variations ont été étudiées pour des caractéristiques biométriques incluant des caractères morphologiques (hauteur de plante, hauteur d'insertion d'épis, nombre total de feuilles, surface foliaire...) et des caractères d'intérêt agronomique (précocité de floraison, rendement en grain et ses composantes...). Les analyses portent soit directement sur les descendances issues d'autofécondation de plantes régénérées (après deux générations de reproduction sexuée, pour tenter d'effacer les effets liés aux qualités des semences), soit sur des croisements incluant d'une part la lignée régénérée et d'autre part la lignée normale. Ces analyses devaient nous permettre de mesurer l'amplitude de variation et l'expression de la variabilité à un niveau relativement faible de vigueur hybride. Les analyses portent aussi, pour ces mêmes caractères, sur les croisements des descendances de plantes régénérées par une ou deux lignées d'origine génétique très différente. Le but était de mesurer l'expression de la variabilité à un bon niveau de vigueur hybride (fig. 1). Globalement, l'analyse des résultats montre que la variabilité génétique que nous avons pu révéler par notre technique de culture *in vitro* est de très faible amplitude et sans aucune mesure avec la variabilité communément utilisable chez le maïs (tabl. 1, 2, 3, 4, 5).

SUMMARY

*Genetic variability,
In vitro culture,
Regeneration,
Maize.*

Study of genetic variability in maize (Zea mays L.) after in vitro regeneration of plants from callus culture

An analysis of genetic variability after prolonged callus culture was carried out with strains (genotypes CO 158, A 188, A 641, CM 182, ND 203, W 117, WD, F 1048, F 1110, A 34) cultured and regenerated by the techniques of GREEN & PHILLIPS (1975).

The progenies of the regenerated plants were compared among themselves and with normal selfed progenies from the original genotypes.

The following traits were measured : leaf number for given growth stages, plant height and ear length, leaf area, flowering date, grain yield components. These were studied either by inbreeding with two generations of sexual reproduction, to try to remove effects connected with seed quality, or else by hybridization.

In a first experiment we compared 23 progenies from regenerated plants (inbred line CO 158) crossed with line F 1444 as male parent. The analysis of traits showed a varietal effect as far as the means were concerned. Comparison of the variances (within varieties) showed heterogeneity between themselves. An overall comparison for all traits for all versions of the same hybrid showed that two regenerated plants seemed to have an unusual behaviour. It should be noted that the amplitude of the variation was quite low.

In the study of genotype A 188, we carried out the full protocol of figure 1. The results are given in tables 4, 5 and 6. In the study of genotype A 641, we only made the comparison at the inbred level. The results are given in table 3. For all the progenies of regenerated plants the varietal effects were statistically significant, but the amplitude of variation remained low.

The genetical variation found after regeneration of fully fertile plants from callus culture was not as great as the normal genetical variability of maize.

I. INTRODUCTION

En 1958, la variété « I.N.R.A. 258 » occupait en France plus du quart des surfaces cultivées en maïs. Cette concrétisation du travail réalisé sur cette plante résultait, pour une partie, de l'exploitation d'une variabilité locale (populations cornées précoces) adaptée à nos conditions mais aussi, pour

une autre partie, de l'utilisation de matériel (lignées pures, hybrides...) en provenance du continent nord américain.

Aujourd'hui, la variabilité génétique réduite d'où sont issus les hybrides cultivés, conduit à diversifier les variétés ; pour cela les sélectionneurs doivent notamment introduire davantage de variabilité dans le matériel génétique de base lors d'un départ de sélection. Cette variabilité nouvelle

pourrait être collectée dans les diverses zones d'extension de l'espèce.

Bien que la variabilité existant chez le maïs soit très importante et sous-exploitée, nous avons voulu déterminer si des techniques de culture *in vitro* pourraient induire une variabilité génétique et/ou des « génotypes variants » chez des plantes régénérées après une phase d'intense multiplication cellulaire sous forme de cal. Nous nous sommes donc aussi intéressés à l'analyse de la transmissibilité, par la voie sexuée, de cette variabilité et à son éventuel intérêt pour la sélection.

La présente publication rend compte de l'ensemble du travail entrepris sur le maïs dans ce domaine à la Station d'Amélioration des Plantes de Clermont-Ferrand.

II. LA CULTURE *IN VITRO* SOURCE DE VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La revue bibliographique qui est présentée ici n'est pas exhaustive ; elle ne souligne que quelques points intéressants de la littérature.

La culture *in vitro* de cellules, de tissus, d'organes de plantes supérieures a toujours révélé de grandes variations entre les unités cultivées : modification dans les constituants cellulaires, dans les types de croissance, dans la sensibilité à certaines substances minérales et organiques, dans l'exigence en régulateurs de croissance, dans les manifestations de l'organogenèse (voir revue bibliographique de SKIRVIN, 1978). Pour savoir si ces modifications d'expression phénotypique sont effectivement dues à des mutations et remaniements chromosomiques ou à des changements stables d'origine épigénétique il est indispensable, dans l'état actuel des techniques, de régénérer des plantes fertiles et de réaliser des études génétiques de transmission par la voie sexuée (BOURGIN, 1978).

Une variation tout aussi importante semble s'exprimer chez les plantes régénérées, après culture de tissus, et dans leur descendance. Ces variations peuvent être la conséquence de mutations dans le matériel nucléaire ou cytoplasmique. Elles pourraient aussi être la résultante phénotypique de modifications d'ordre épigénétique dans l'expression du patrimoine génétique.

C'est ainsi que SIBI (1976), sur laitue, montre que la culture de cal et la régénération de plantes ont permis de révéler une certaine variabilité. Pour certains caractères qualitatifs ou quantitatifs (coloration de feuilles ou poids frais de plantes...) elle n'a pas mis en évidence de disjonctions d'ordre nucléaire. Bien que l'on ne puisse aujourd'hui en aucune manière prouver l'identité des « messages génétiques » entre une plante régénérée après culture de tissus et une plante témoin supposée de même génotype, SIBI propose, comme hypothèse explicative, l'intervention de phénomènes épigénétiques et cytoplasmiques.

SECOR & SHEPARD (1981) obtiennent une variation très importante, pour une variété de pomme de terre, entre des clones obtenus par multiplication végétative de plantes régénérées à partir de protoplastes de feuilles. Pour 35 caractères biométriques analysés, certains se révèlent très variables, d'autres peu ou pas. Certaines de ces variations (poids des tubercules...) représentent une amélioration agronomique par rapport à la variété de départ. WENZEL *et al.* (1971) ne trouvent, eux, une variation entre les clones que si la phase de callogenèse dure un certain temps. Pour eux, ces variations sont la conséquence d'une modification dans le nombre chromosomique. La plante mère de départ

ainsi que l'origine tissulaire des protoplastes semblent jouer un grand rôle.

Chez l'orge (*Hordeum vulgare* et *Hordeum jubatum*), ORTON (1980) trouve lui aussi une variation importante du nombre chromosomique des tissus, cultivés *in vitro*, des hybrides interspécifiques entre ces deux *Hordeum* ainsi que dans ces deux *Hordeum* eux-mêmes. Les plantes régénérées à partir des tissus hybrides présentent elles aussi des nombres chromosomiques fluctuants.

Chez le maïs, après culture de tissus et régénération de plantes fertiles, EDALLO *et al.* (1981) trouvent dans les descendances issues d'autofécondation de 2 lignées bien fixées, « W 64 A » et « S 65 », une proportion non négligeable de mutations d'ordre nucléaire en disjonction concernant des caractères tels que des colorations de feuilles, des petites plantes (phénotypes « dwarf »), des colorations et des types d'albumen différents (moucheté, opaque). La fluctuation du nombre chromosomique des cellules du cal est toujours très importante ; les plantes régénérées présentent, elles, un caryotype le plus souvent normal.

GEGENBACH *et al.* (1981) travaillent avec des plantes de maïs dont le cytoplasme est de type Texas. Ce cytoplasme confère, outre la stérilité mâle, la sensibilité à la race T de l'agent pathogène *Helminthosporium maydis*. Les cultures de tissus sont traitées par diverses doses de toxine de ce champignon ; des plantes sont néoformées à partir des souches cellulaires résistantes obtenues. Une analyse des diagrammes électrophorétiques de fragments d'A.D.N. mitochondrial de certaines plantes à phénotype de sensibilité modifié suggère une sélection de cellules particulières après recombinaison ou délétion dans cet A.D.N. mitochondrial. Dans ce dernier cas, seul le message génétique du cytoplasme aurait été transformé.

Chez l'*Haworthia*, OGIHARA (1981) montre que si une grande variabilité pour des caractères morphologiques affecte les plantes régénérées, les accidents chromosomiques tels que translocations (réciproques ou non), délétions (micro et macro), polyploïdisations plus ou moins partielles sont aussi très fréquents chez les plantes de cette espèce.

Pour de nombreuses espèces, les variations entre individus régénérés à partir d'une même souche cellulaire peuvent être très importantes. Les causes génétiques de ces variations sont certainement liées, pour une grande part, à l'altération du « message génétique », elles pourraient aussi être liées pour une autre part à une modification de phénomènes épigénétiques (régulation, persistance d'état auto-entretenu...).

Si l'accès à une variabilité génétique de ce dernier type peut être spécifiquement permis par les techniques de la culture *in vitro*, il peut paraître séduisant de les utiliser ; il est à redouter cependant qu'une modification apportée par une perturbation (multiplication cellulaire intense sous forme de cal...), à un instant particulier, sur un équilibre de régulation donné, se révèle instable, tout du moins chez les espèces à reproduction sexuée. Elles seraient alors inutilisables pour la sélection.

III. MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'ensemble de notre protocole est résumé en figure 1.

A. Culture de tissus et régénération de plantes

Des cultures de cal ont été initiées à partir de jeunes scutellums de maïs selon les techniques précédemment décrites (GREEN & PHILLIPS, 1975 ; BECKERT & POLLAC-

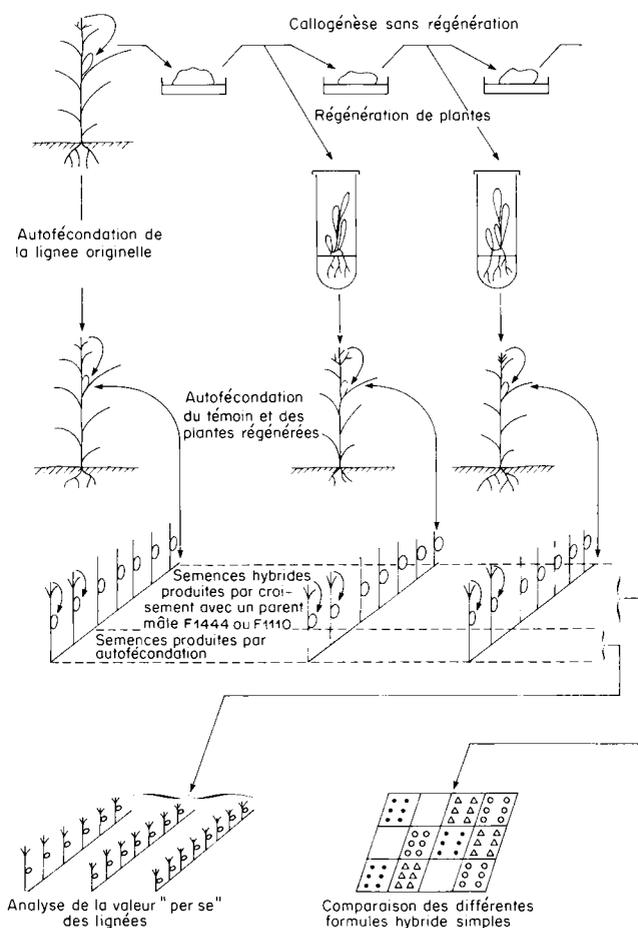


Figure 1
 Protocole général d'étude des conséquences génétiques d'une technique de culture *in vitro*.
 General scheme for genetic analysis of the consequences of *in vitro* culture.

SEK, 1979 ; BECKERT, 1982). Ceci a été réalisé principalement pour 3 lignées homozygotes considérées comme bien fixées, CO 158, A 188 et A 641, maintenues à Clermont-Ferrand par sélection conservatrice généalogique.

Les mises en culture d'embryons ayant lieu durant le mois de mai, les régénérations sont échelonnées du mois de juillet au mois de septembre de la même année. Les plantes régénérées sont transférées en serre.

B. Observation des plantes régénérées (Génération G₀)

Nous avons pu nous livrer à des observations sur ces plantes concernant leur développement depuis la sortie des tubes jusqu'à leur autofécondation et maturation. Nous avons aussi contrôlé, à ce stade, la conformité du nombre chromosomique de ces plantes.

C. Observation des descendance et plan de croisements (Génération G₁)

L'année suivant le travail de culture *in vitro*, nous avons semé au champ une descendance de chaque plante régénérée qui avait pu être autofécondée.

Nous avons réalisé, à ce stade, des notations d'ordre qualitatif sur ces descendance permettant de repérer des caractères phénotypiques en disjonctions (coloration de feuilles, nanisme...).

Une partie des plantes (4 à 8) de chaque descendance est autofécondée pour maintenir « le type » ; la descendance issue de l'autofécondation de la lignée originelle fait partie de ces comparaisons. Une autre partie des plantes (4 à 8) est croisée, dans les deux sens, avec la lignée originelle (sens normal : lignée originelle prise comme parent femelle ; sens réciproque : lignée originelle prise comme parent mâle) pour analyser l'importance du sens du croisement et éventuellement isoler un quelconque effet d'hétérosis à un fort niveau de consanguinité.

Une 3^e partie des plantes (4 à 8) de chaque ligne est aussi prise comme parent mâle, le pollen étant porté sur les épis de 2 autres lignées d'origine génétique très différente (F 1110, F 1444) pour évaluer l'expression, à un bon niveau de vigueur hybride, d'éventuelles variations.

C'est toujours le mélange de ces 4 à 8 autofécondations ou croisements qui a constitué dans chaque cas le lot de semences pour l'expérimentation de l'année suivante.

Ce plan de croisement nous permet de comparer un nombre relativement grand de descendance de plantes régénérées avec une assez bonne information.

D Analyse des descendance obtenues après le plan de croisement (Génération G₂)

L'année suivant la réalisation du plan de croisement, nous avons donc comparé :

— d'une part la valeur « *per se* » d'un ensemble de descendance issues d'autofécondations de plantes régénérées de même génotype (ainsi que les croisements normaux et réciproques avec la lignée originelle).

— d'autre part les structures hybrides simples réalisées sur testeur.

1. Conditions agronomiques d'implantation des essais

Les essais sont réalisés en terre profonde noire de Limagne, les semis se déroulant fin avril-début mai en parcelles de 2 lignes (10 m²). La densité de culture est ajustée manuellement par éclaircissage au début de la végétation. Elle est de l'ordre de 65 000 plantes par ha pour les parcelles hybrides et de 50 000 plantes par ha pour la partie lignée.

2. Type d'expérimentation réalisée

Les essais sont de type blocs de FISHER de 3 à 6 répétitions pour les essais hybrides suivant les quantités disponibles de semences. Ils sont de type factoriel à 3 répétitions pour les essais au niveau lignée où nous avons comparé simultanément les autofécondations, les croisements normaux et réciproques sur la lignée standard.

3. Caractères analysés et types de mesures

Sur l'ensemble des parcelles nous avons effectué les observations suivantes :

- 1 — Nombre de feuilles dégainées à différents stades
- 2 — Nombre total de feuilles
- 3 — Ordre de la feuille de l'épi (la feuille n° 1 correspond à la feuille cotylédonaire)
- 4 — Hauteur de plante
- 5 — Hauteur d'insertion de l'épi
- 6 — Surface de certains niveaux foliaires
- 7 — Notation de précocité de floraison mâle
- 8 — Rendement en matière sèche de grain
- 9 — Poids de 1 000 grains.

Pour les 6 premiers caractères, les mesures sont réalisées sur plusieurs plantes observées individuellement dans la parcelle. Les plantes des extrémités de chaque ligne sont éliminées systématiquement.

Pour les autres caractères, une notation globale au niveau de la parcelle est donnée.

4. Modèles statistiques utilisés et calculs généraux

a) *Essais de type blocs* (essai niveau de vigueur hybride) :

dans le cas de caractères mesurés individuellement le modèle statistique utilisé est :

$$Y_{ijk} = m + a_i + b_j + (ab)_{ij} + e_{ijk}$$

où m est la moyenne générale de l'essai.

a_i l'effet de la formule i .

b_j l'effet lié au bloc j .

$(ab)_{ij}$ est un terme qui correspond à un effet de la variation intraparcelle ; il englobe aussi bien les effets de compétition entre plantes que des microvariations de milieu ou que des différences d'ordre génétique entre plantes d'une même parcelle. Il est estimé comme un terme d'interaction.

Y_{ijk} est le résultat enregistré sur la $k^{\text{ème}}$ plante de la formule hybride i du bloc j .

e_{ijk} est le terme résiduel de la décomposition.

Dans le cas d'un caractère mesuré au niveau de la parcelle le modèle statistique utilisé est :

$$Y_{ij} = m + a_i + b_j + e_{ij}$$

où par exemple, Y_{ij} est le rendement matière sèche, de la formule hybride i , dans la parcelle j , m étant la moyenne générale de l'essai et e_{ij} le terme résiduel.

b) *Essais de type factoriel* (essai niveau de vigueur lignée) :

le modèle utilisé est :

$$Y_{ijk} = m + a_i + b_j + (ab)_{ij} + r_k + e_{ijk}$$

où m est la moyenne générale de l'essai.

a_i est l'effet lié à la plante régénérée i ; effet mesuré au travers de la descendance obtenue par autofécondation et des descendances obtenues par les croisements normaux et réciproques sur la lignée originelle.

b_j est l'effet général sens de croisement.

$(ab)_{ij}$ est un terme d'interaction ; il correspond à une mesure d'une distorsion pour une variété donnée par rapport aux autres.

r_k est l'effet lié aux répétitions.

e_{ijk} est le terme résiduel.

c) *Calculs généraux*

Pour chaque caractère analysé, nous avons vérifié la normalité de la distribution des données pour le calcul des coefficients β_1 et β_2 de PEARSON. Si nos données se révélaient être très éloignées de la distribution normale, nous avons utilisé une transformation de celles-ci par la fonction logarithmique.

Avec le test de BARLETT (SNEDECOR & COCHRAN, 1971) nous avons aussi comparé entre elles l'ensemble des variances intravariété des descendances de chaque plante régénérée, ceci pour les caractères mesurés individuellement.

Enfin nous avons effectué une comparaison des moyennes par rapport à la moyenne des 2 témoins (lignées

normales autofécondées dans les essais à base lignée, hybride simple avec la lignée normale comme parent mâle dans le cas des essais à base hybride). Ces comparaisons de moyennes sont réalisées par la procédure de DUNETT.

IV. RÉSULTATS

A. Générations G_0 et G_1

Comme il a déjà été noté antérieurement (GREEN & PHILLIPS, 1975 ; BECKERT & POLLACSEK, 1979), la variation entre plantes régénérées est très forte à la génération G_0 . Dans sa plus grande partie, cette variation correspond à une fluctuation due au milieu (conditions de développement des bourgeons en tube et/ou d'enracinement des petites plantes régénérées...). Le contrôle chromosomique réalisé à ce stade sur une partie des plantes régénérées n'a pas révélé de nombres chromosomiques aberrants. Une faible proportion des plantes régénérées (0,5 à 1 p. 100) présente le syndrome « Abphyll » (feuilles opposées décussées).

À la génération G_1 , nous avons pu repérer un certain nombre de descendances qui présentaient des caractères phénotypiques aisément repérables en disjonction :

— plantes de petite taille de phénotype identique aux plantes présentant le caractère dwarf (lignée CO 158).

— plantes à feuilles panachées (lignée CO 158).

— plantes à feuilles de type albinos (lignées A 188, CO 158).

— plantes à feuilles de type Xantha (lignées A 188, A 641).

L'analyse du déterminisme génétique de ces caractères pour des nombres de plantes relativement très faibles (40) est compatible avec l'hypothèse de la disjonction d'un seul facteur génique.

Le syndrome « Abphyll » n'a pas été transmis par voie d'autofécondation. Il doit correspondre probablement à une perturbation du fonctionnement du méristème terminal lors du développement des plantes régénérées.

B. Etude des variations biométriques (Génération G_2)

1. Remarques générales sur les caractères analysés

Il nous semblait intéressant d'analyser la variabilité à la fois pour des caractères dont l'expression est précoce dans le développement des plantes (nombre relatif de feuilles dégainées à différents stades), pour des caractères observables en période de végétation plus avancée (surface foliaire, longueur de feuilles...) et pour des caractères de fin de végétation dont l'expression a intégré tout le fonctionnement de la plante. Certains de ces caractères sont naturellement assez variables (hauteur de plante, rendement...); d'autres sont beaucoup moins fluctuants (nombre de feuilles...).

Ne connaissant pas a priori les conséquences de la culture *in vitro*, il nous incombait donc d'analyser une large gamme de caractères dont les contrôles génétiques sont différents.

2. Remarques générales sur les génotypes et descendances utilisés

Outre l'aptitude de quelques génotypes à être manipulés par les techniques de la culture *in vitro* (BECKERT & POLLACSEK, 1979), il nous importait de quantifier l'amplitude d'éventuelles variations biométriques en fonction du génotype d'origine et de son contexte génétique propre.

Nous n'avons pas choisi d'une quelconque manière, dans l'ensemble des descendance que nous avons pu obtenir après culture *in vitro*, les descendance que nous avons testées selon le protocole représenté à la figure 1.

3. La lignée CO 158

Nous avons comparé 23 descendance de plantes régénérées croisées par le génotype F 1444. Les résultats sont donnés au tableau 1.

Pour la plupart des caractères analysés, une différence significative entre les différentes formes du « même » hybride a été mise en évidence. Il faut cependant remarquer que, pour ces mêmes caractères, l'amplitude de variation (exprimée en pourcentage de la moyenne générale de l'essai) est relativement faible. Nous pouvons remarquer une assez forte hétérogénéité des variances intra-descendance pour l'ensemble des caractères analysés. Il faut

remarquer que, de par une certaine position médiane des témoins, le test de DUNETT ne détecte pas de différence significative.

Pour l'ensemble des descendance issues de plantes régénérées de ce génotype, une comparaison multivariante réalisée sur les caractères mesurés a été réalisée par un test non paramétrique portant sur les classements des moyennes et des variances intra-descendance. Cette comparaison révèle que 2 descendance semblent avoir un comportement particulier pour les caractères analysés (fig. 2).

4. La lignée A 641

Pour ce génotype, nous avons comparé 36 descendance de plantes régénérées autofécondées ou croisées par la lignée normale, dans les deux sens. Les résultats sont donnés au tableau 2.

TABLEAU 1

Comparaison de quelques caractères morphologiques pour les croisements de plantes régénérées de la lignée CO 158 avec la lignée F 1444.
Comparison of some morphological traits for the crosses of regenerated plants of strain CO 158 with inbred genotype F 1444.

Caractère analysé	F Variété	Nombre de variétés du témoin	Amplitude de variation de la moyenne de l'essai	Moyenne	Coefficient de variation de l'essai	Comparaison des variances de BARTLETT)	Nombre de mesures par parcelle
% de feuilles dégainées au 4/07	3,23***	0	0,7	56 %	1	N S	10
Ordre de la feuille de l'épi	3,20***	2	8,9	10,88	6	52**	10
Nombre de feuilles total	10,33***	7	4,6	16,06	3	86***	10
Hauteur totale de plante	3,05***	0	4,0	194,6 cm	6	62***	10
Hauteur d'insertion de l'épi	4,12	2	8,5	87,3 cm	10	47*	10
Surface foliaire totale	4,75***	1	8,7	2 566 cm ²	1	38*	10
Surface de la feuille n° 10	8,57***	3	8,6	481 cm ²	4	33*	10
Surface de la feuille n° 11	1,97**	3	6,0	531 cm ²	6	34*	10
Surface de la feuille n° 12	N.S.	0	5,0	537 cm ²	2	47*	10
Surface de la feuille n° 13	5,19***	2	1,2	526 cm ²	2	37*	10
Surface de la feuille n° 14	9,54***	6	8,1	491 cm ²	5	50*	10
Longueur de la feuille de l'épi	4,94***	1	4,4	75,7 cm	4	56**	10
Rendement M.S. grain	1,73*	0	9,5	5,88 kg	6	—	1
Poids de 1 000 grains	5,95***	2	7,6	270 g	3	—	1

N.B. Le test de DUNETT est réalisé au seuil de 5 % de risque.

* F significatif au seuil de 5 %.

** F significatif au seuil de 1 %.

*** F significatif au seuil de 1 %.

Variance intra descen- dance	<	= Témoïn	>
	Moyennes		
<			
= témoïn	V 07	Ensemble des descendances équivalentes au témoïn	
>		V 23	

Figure 2

Analyse multivariable des descendances de plantes régénérées du génotype CO 158. Comparaison des moyennes et variances intra-descendance.

Multivariate analysis of the progenies of regenerated plants from genotype CO 158. Comparison of the means and variances between progenies.

De nouveau pour cette lignée, les différences sont presque toujours significatives pour les caractères pris en compte ; il faut remarquer toutefois qu'aucune descendance de plantes régénérées ne se différencie nettement du témoin (test de DUNETT). L'amplitude de variation est très faible.

Le sens du croisement semble, lui, être important pour quelques caractères, mais le classement des différents croisements est toujours identique (interaction non significative) sauf pour un seul caractère (longueur de la feuille n° 14). Le classement des croisements (réalisé par le test t de STUDENT) montre toujours une nette supériorité des croisements normaux où la lignée originelle rentre comme parent femelle. Contrairement au génotype CO 158, l'hétérogénéité dans les descendances est beaucoup moins marquée (test de BARTLETT rarement significatif).

5. La lignée A 188

Nous avons pu, pour ce génotype, réaliser le protocole complet proposé à la figure 1 et analyser ainsi 56 descendances de plantes régénérées.

Au tableau 3 nous présentons les caractères analysés pour l'expérimentation réalisée à un fort niveau de consanguinité. Malgré des nombres élevés de mesures individuelles (30 plantes par descendance), nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence d'ordre statistique. Ici pourtant, l'amplitude de variation exprimée en pourcentage de la moyenne générale de l'essai est assez élevée. On peut remarquer que les différences liées au sens du croisement

TABLEAU 2

Comparaison, pour la lignée A 641, de quelques caractères morphologiques pour les descendances issues d'autofécondations (A), de croisements normaux (N) et réciproques (R), avec la lignée standard.

Comparison, for strain A 641, of some morphological traits after selfing (A), normal crossing with the standard strain (N) and reciprocal crossing with the standard strain (R), of the regenerated plants.

Caractères analysés	F Variétés	Nombre de variétés différentes des témoins	Amplitude de variation en % moyenne générale	Moyenne générale de l'essai	Coefficient de variation	Comparaison des variances intra (test de BARTLETT)	F Sens de croisement	Classement des croisements	F interaction	Nombre de mesures par parcelle
Nombre relatif de feuilles dégainées au 27/06	NS	0	1,99	8,9	1,17	NS	5,83*	N > R > A	NS	10
Nombre relatif de feuilles dégainées au 03/07	1,92*	0	1,77	11,2	1,03	NS	NS	—	NS	10
Nombre de feuilles total	2,76**	0	0,39	20,3	1,26	42*	NS	—	NS	10
Largeur de la 9 ^e feuille	NS	0	1,52	5,6 cm	1,10	NS	NS	—	NS	10
Longueur de la 9 ^e feuille	1,83*	0	1,85	43,7 cm	1,04	NS	8,45*	N > R > A	NS	10
Longueur de la 10 ^e feuille	1,79*	0	1,72	58,2 cm	1,00	NS	NS	—	NS	10
Longueur de la 12 ^e feuille	NS	0	1,11	64,4 cm	0,75	NS	3,37*	N > R > A	NS	10
Longueur de la 14 ^e feuille	1,85*	0	1,13	57,9 cm	0,58	NS	4,44*	N > R > A	4,13*	10
Longueur de la 16 ^e feuille	NS	0	1,18	48,8 cm	1,00	NS	NS	—	NS	10
Ordre de la feuille de l'épi	2,37*	0	1,40	15,1	0,63	NS	NS	—	NS	10
Hauteur d'insertion de l'épi	2,17*	0	2,60	53,2 cm	1,58	NS	NS	—	NS	10
Hauteur totale de la plante	1,78*	0	2,40	85,7 cm	1,48	46*	NS	—	NS	10

TABLEAU 3

Comparaison de descendance de plantes régénérées du génotype A 188 (autofécondations A, croisements normaux N, croisements réciproques R).

Comparison of progenies of regenerated plants of the genotype A 188 (selfing A, normal cross N, reciprocal cross R).

Caractères analysés	F Variétés	Nombre de variétés différentes des témoins	Amplitude de variation en % moyenne générale	Moyenne générale	Coefficient de variation en %	Comparaison des variances intra (test de BARTLETT)	F Sens de croisement	Classement des croisements	F interaction	Nombre de mesures par parcelle
Ordre de la feuille de l'épi	N S	0	6,2	12,5	3	33*	N S	—	N S	10
Nombre total de feuilles	N S	0	4,9	17,6	2	35*	3,79*	<u>R > A > N</u>	N S	10
Surface de la feuille	N S	0	10,5	378,4 cm ²	5	42**	16,21***	<u>N > R > A</u>	N S	10
Hauteur d'insertion de l'épi	N S	0	10,1	52,5 cm	7	N S	33,80***	<u>N > R > A</u>	N S	10
Hauteur totale de la plante	N S	0	9,2	127,5 cm	5	N S	60,01***	<u>N > R > A</u>	N S	10
Rendement en M. S. grain	N S	0	12,3	2,1 kg	9	—	32,30***	<u>N > R > A</u>	N S	1

TABLEAU 4

Comparaison des descendance de plantes régénérées du génotype A 188 croisées par la lignée F 1444 pris comme parent mâle.

Comparison of the progenies of regenerated plants of genotype A 188 crossed with the inbred F 1444 as male parent.

	F Variété	Nombre de variétés différentes des témoins	Amplitude de variation en % de la moyenne générale	Moyenne générale de l'essai	Coefficient de variation	Comparaison des variances intra descendance (test BARTLETT)	Nombre de mesures intra parcelles
Ordre de la feuille de l'épi	N S	0	5,4	13,6	2,00	N S	10
Nombre total de feuilles	1,92***	0	6,3	19,9	2,00	N S	10
Surface de la feuille de l'épi	N S	0	10,9	609,5 cm ²	4,00	N S	10
Hauteur d'insertion de l'épi	N S	0	10,6	94,5 cm	4,04	N S	10
Hauteur totale de la plante	N S	0	6,5	218,9 cm	2,21	N S	10
Rendement M. S. du grain	N S	0	14,8	78,6 q/ha	5,72	—	1

TABLEAU 5

Comparaison des descendance de plantes régénérées du génotype A 188 croisées par la lignée F 1110 pris comme parent mâle.
Comparison of the progenies of regenerated plants of genotype A 188 crossed with the inbred F 1110 as male parent.

Caractères analysés	F Variété	Nombre de variétés différentes des témoins	Amplitude de variation en % de la moyenne générale	Moyenne générale de l'essai	Coefficient de variation	Comparaison des variances intra descendance (test BARTLETT)	Nombre de mesures intra parcelles
Ordre de la feuille de l'épi	1,59*	0	9,4	13,6	2,06	N S	10
Nombre total de feuilles	N S	0	6,0	19,3	2,08	N S	10
Surface de la feuille de l'épi	2,18***	0	11,1	567,4 cm ²	5,90	N S	10
Hauteur d'insertion de l'épi	3,30***	0	12,0	96,1 cm	5,04	N S	10
Hauteur totale de la plante	2,88***	1	9,8	209,1 cm	2,54	N S	10
Rendement M. S. grain	N S	0	16,4	71,2 q/ha	7,46	—	1

sont importantes ; en effet le test de FISHER est presque toujours significatif. La valeur de l'autofécondation est presque toujours la plus faible, sauf pour le caractère nombre total de feuilles où la valeur est intermédiaire. On ne remarque aucune distorsion entre les valeurs en autofécondation, croisement normal ou réciproque d'une même plante régénérée (interaction non significative).

L'examen de ces valeurs nous donne à penser que, malgré les deux générations de reproduction sexuée, un arrière-effet lié aux qualités des semences subsiste dans ces descendance de plantes régénérées.

Aux tableaux 4 et 5, nous comparons ces mêmes descendance de plantes régénérées mais à un niveau hybride simple où le parent femelle est, d'une part, la lignée F 1444 et, d'autre part, la lignée F 1110. Si, pour ces essais, on peut mettre en évidence un effet lié aux variétés pour les caractères analysés, il faut noter que le nombre de variétés différentes du témoin (test de DUNETT au seuil 5 p. 100 de risques) est seulement égal à 1 pour le caractère hauteur totale de la plante. Les effets liés aux différentes formes du même hybride semblent plus significatifs dans le cas du testeur F 1110 que dans celui du testeur F 1444. Ceci laisserait penser qu'un testeur de faible aptitude à la combinaison serait plus apte à la révélation d'une variabilité. Il est quand même nécessaire de noter l'homogénéité de ces essais et la faible amplitude de variation entre les différentes formules.

6. Autres comparaisons

Nous avons pu, pour les autres génotypes, lignées A 34, CM 182, F 1110, F 1048, ND 203, W 117, WD, obtenir des descendance d'autofécondations de plantes régénérées en nombres non négligeables (tabl. 6).

Nous avons comparé l'ensemble de ces descendance ainsi que les descendance des lignées A 188, A 641, CO 158 pour des caractères simples tels que la précocité de floraison mâle par rapport aux témoins respectifs.

Aucune différence notable n'a pu être décelée.

TABLEAU 6

Nombre de descendance issues d'autofécondations de plantes régénérées pour les génotypes étudiés en culture *in vitro*.
Number of progenies after selfing plants regenerated from callus cultures of each genotype.

Génotypes	Nombre de descendance obtenues
CO 158	43
A 641	120
A 188	216
CM 182	13
F 1048	14
W 117	6
ND 203	3
WD	7
A 34	3

V. DISCUSSION ET CONCLUSION

Par l'étude des conséquences d'une des techniques de la culture *in vitro* sur certains caractères biométriques, nous avons montré, sur une base génétique relativement grande, la faible variabilité génétique induite chez le maïs. En effet, ce que nous avons décrit est sans aucune mesure avec la variabilité génétique courante qui existe chez cette espèce.

Si la culture *in vitro* peut, par ailleurs, être source de variabilité importante comme nous l'avons largement rapporté dans notre revue bibliographique, les raisons éventuelles de la faible variabilité que nous avons pu observer sont peut-être à rechercher soit dans des limitations techniques liées à la culture *in vitro* même, soit à une constante biologique du maïs.

En effet, il ne nous a pas été possible d'obtenir des descendance issues d'autofécondation de plantes régénérées après un délai supérieur à 100 jours de callogenèse (les

plantes régénérées tardivement se sont montrées toujours trop protandres pour permettre de réaliser une quelconque autofécondation). De plus, d'après KING *et al.* (1978), le phénomène de régénération chez le maïs, lié au scutellum de jeunes embryons, pourrait être un phénomène d'embryogenèse secondaire à partir de cellules spécialisées de cet organe. On n'aurait donc pas, dans ce cas, un véritable passage sous forme de cals de la part de ces cellules. Ce long passage sous forme de cals est nécessaire à la révélation de génotypes dit variants selon DEMARLY (1976). Cependant, une telle hypothèse de cellules « pré-programmées pour la néoformation » est difficile à démontrer. Il en est de même pour connaître précisément le

nombre de mitoses qu'ont pu subir des cellules indifférenciées avant de néoformer une plante.

Il faut aussi mentionner la difficulté, due au type de protocole et d'expérimentation choisi, de démontrer l'invariance du « message génétique » lié à une quelconque modification de son expression. D'un point de vue pratique, les analyses de type biométrique portant sur des variations continues de faible amplitude ne sont certainement pas les plus appropriées à de telles démonstrations.

Reçu le 22 février 1982.

Accepté le 6 août 1982.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Beckert M., Pollacsek M., 1979. Expression de la variabilité génétique du maïs (*Zea mays* L.) en différentes conditions de cultures de tissus. *Ann. Amélior. Plantes*, **29** (5), 563-581.
- Beckert M., 1982. Rôle du scutellum dans l'obtention de plantes néoformées *in vitro* chez le maïs. *Agronomie*, **2** (7), 612-615.
- Bourgin S. P., 1978. Isolement de mutants à partir de cellules végétales en culture *in vitro*. *Physiol. vég.*, **16** (3), 339-351.
- Demarly Y., 1976. La notion de programme génétique chez les végétaux supérieurs I. Aspects théoriques. *Ann. Amélior. Plantes*, **26** (2), 117-138.
- Edallo S., Zucchini C., Perenzin M., Salamini F., 1981. Chromosomal variation and frequency of spontaneous mutation associated with the *in vitro* culture and plant regeneration in maize. *Maydica XXVI*, 39-56.
- Gegenbach B. G., Conelly J. A., Pring D. R., Conde M. F., 1981. Mitochondrial DNA variation in maize plants regenerated during tissue culture selection. *Theor. appl. Genet.*, **59**, 161-167.
- Green G. E., Phillips R. L., 1975. Plant regeneration from tissue culture of maize. *Crop Sci.*, **15**, 417-421.
- King P. J., Potrykus I., Thomas E., 1978. *In vitro* genetics of cereals: problems and perspectives. *Physiol. veg.*, **16**, 381-399.
- Ogihara Y., 1981. Tissue culture in *Haworthia*. *Theor. appl. Genet.*, **60**, 353-363.
- Orton T. J., 1980. Chromosomal variability in tissue cultures and regenerated plants of *Hordeum*. *Theor. appl. Genet.*, **56**, 101-112.
- Secor G. A., Shepard J. F., 1981. Variability of protoplast derived potato clones. *Crop Sci.*, **21**, 102-105.
- Skirvin R. M., 1978. Natural and induced variation in tissue culture. *Euphytica*, 241-266.
- Sibi M., 1976. La notion de programme génétique chez les végétaux supérieurs. *Ann. Amélior. Plantes*, **26** (4), 523-547.
- Snedecor W. S., Cochran W. G., 1971. *Méthodes statistiques*. Association de coordination technique agricole — 149, rue de Bercy, 75012 Paris.
- Wenzel G., Schieder O., Przeworzny T., Sopory S. K., Melchers G., 1979. Comparison of single cell culture derived *Solanum tuberosum* L. plants and a model for their application in breeding programs. *Theor. appl. Genet.*, **55**, 49-55.