EVOLUTION DES TECHNIQUES, OUTILS ET METHODES EN AMELIORATION DES PLANTES

Fabrice VAROQUAUX et Georges PELLETIER
INRA
Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes
Route de Saint-Cyr
78026 Versailles Cedex, France

1 - INTRODUCTION

Les premières traces de sédentarisation de l'Homme remontent à plus de 10 000 ans. On peut dès lors parler d'agriculture au sens où nous la connaissons, mais il semblerait que les premières domestications de plantes sauvages aient précédé cette sédentarisation, et qu'elles aient pu la favoriser (BENZ, 2001).

La domestication est le résultat d'une succession de choix, conscients ou non, de mutations spontanées améliorant la culture, la récolte, ainsi que les qualités de consommation et de conservation du produit récolté. L'exemple du maïs est particulièrement caractéristique. A partir de la téosinte, il a suffi de changements au niveau d'un nombre très limité de gènes majeurs pour aboutir à l'espèce cultivée (BEADLE, 1980), caractérisée essentiellement par un épi à plusieurs rangs, une attache solide du grain sur le rachis, une panicule plus complexe et l'absence de ramification de la tige. Cette domestication n'a pas provoqué chez les autres céréales de changements aussi radicaux dans les performances. Le blé (amidonnier) rendait seulement 3 grains pour 1 sous l'Empire romain et le froment 6 au Moyen Âge.

Il a fallu attendre la fin du 17ième siècle et les travaux de CAMERARIUS pour que la sexualité des végétaux soit reconnue. Le siècle suivant sera celui des premières expériences d'hybridation interspécifique systématique avec VON LINNE et KÖLREUTER. Malgré la stérilité de la plupart de ces hybrides, l'idée vint naturellement de créer de nouvelles combinaisons, finalement de nouvelles espèces. Les premiers hybrideurs au début du 19ième siècle (KNIGHT, HERBERT, SAGERET) vont ébaucher les bases de ce que sera le mendélisme. Le véritable progrès génétique a commencé au 19ième siècle grâce à des précurseurs comme Louis de VILMORIN et a précédé la compréhension des lois de l'hérédité qui ne viendra qu'au début du 20ième siècle avec la « redécouverte » des travaux de MENDEL et les résultats de MORGAN.

Deux grandes stratégies d'amélioration des plantes ont été et sont suivies depuis deux siècles. Elles se sont appuyées sur des progrès apportés par les connaissances et les techniques biologiques ou par les outils de mesure. Il ne s'est finalement pas s'agi d'autre chose que d'utiliser les sources classiques de la variation biologique qui constitue le matériau de l'évolution, à savoir la mutation et la recombinaison.

La première stratégie consiste à sélectionner des variations, qu'elles soient spontanées ou qu'on sache les provoquer, et à les multiplier autant que possible à l'identique : ce sont successivement la sélection massale et la sélection généalogique, l'exploitation des agents mutagènes, des techniques permettant de modifier (augmentation ou réduction) le niveau de ploïdie, les méthodes de propagation végétative et de sélection sanitaire.

La seconde stratégie consiste, dans une perspective de construction de génotypes, à combiner des caractères, par la production d'hybrides, par des croisements plus ou moins éloignés, par des fusions somatiques, par des transferts de gènes ou, avec l'aide des outils moléculaires issus de la génomique, par une sélection assistée par marqueurs.

2 – VARIATION ET SELECTION

2.1 - Sélection massale puis généalogique

Le soin à apporter à la production de semences, le choix des meilleurs individus comme porte graines (et parfois leur isolement), à condition qu'ils aient été produits dans les bonnes conditions, a sans doute été jusqu'au milieu du 19ième siècle, la seule traduction d'une volonté d'amélioration des variétés. L'idée de dégénérescence des races était en effet banale et devait être essentiellement combattue par le changement de terrain. La croyance, y compris chez DARWIN, voulait que le milieu soit le facteur essentiel responsable de la variation héréditaire. On retrouve cette idée encore au 20ième siècle, dans des conseils prodigués aux paysans, chez Mitchourine et Lyssenko (l'incidence catastrophique du lyssenkisme sur l'amélioration des plantes a contribué à un effondrement de l'agriculture provoquant des famines dans des pays tels que la Chine ou la Russie), et à la base de pratiques de l'agriculture biologique.

En fait, à cette époque, les espèces de grande culture (et évidemment les espèces allogames) étaient constituées de mélanges de génotypes. La sélection massale simple, qui consiste à retenir la descendance des meilleurs individus sans intervenir sur leur mode de reproduction, a permis de faire évoluer les populations de plantes autogames. Cette méthode de sélection a eu beaucoup moins de succès dans le cas des plantes allogames.

La première révolution, la sélection généalogique, fut mise en place avant de connaître les lois de l'hérédité. La séparation et l'appréciation des différentes plantes mères a conduit à sélectionner les meilleurs génotypes dans des populations de blé, d'orge (plantes autogames) ou de betterave à sucre (plante allogame) (L. de VILMORIN, LE COUTEUR). Le jugement des performances agronomiques va très tôt s'appuyer sur des mesures objectives : par exemple, le saccharimètre est utilisé dès 1853 pour l'amélioration du taux de saccharose de la racine de betterave. Un postulat est à la base des travaux de L. de VILMORIN, qui à l'époque est un acte de foi :

« l'hérédité est sans aucun doute le fait sur lequel est fondée la création de toutes les races » (J. de VILMORIN, 1923).

2. 2 - Exploitation et création de mutants

Les variétés locales de multiples espèces, et en particulier les plantes ornementales et les arbres fruitiers, ont essentiellement pour origine des mutations spontanées. Quarante pour cent des variétés de fruits à pépins résultent d'un simple événement de mutation (GAUTIER, 2001). Dès l'Antiquité, des variants d'espèces cultivées sont sélectionnés. Par exemple, les raisins de Corinthe servant à la réalisation de raisins secs sont consommés depuis l'Egypte ancienne (MÜLLER-THURGAU, 1898). Les mutants nains de blé découverts au Japon à la fin du 19ième siècle à l'origine des blés courts actuels, les mutants monogermes découverts chez la betterave par SAVITSKY en 1948 ou encore la mutation *afila* du pois ont considérablement révolutionné la culture de ces plantes. Dans le domaine des plantes ornementales, les mutations spontanées sont à la base de la création variétale : la couleur orange des roses est due à une mutation conduisant à la synthèse d'un pigment nouveau pour cette plante : la pelargonidine.

Ces mutations spontanées peuvent correspondre à des mutations ponctuelles mais aussi à l'insertion de transposons ou de rétrotransposons. Ces derniers ont probablement joué un rôle important dans la variation génétique naturelle. Ils peuvent être activés dans les cellules somatiques sous l'effet de *stimuli* extérieurs, comme cela a été récemment démontré chez le riz, par la culture *in vitro*. Ils ont offert à MENDEL les variétés de pois à graines ridées de ses premières expériences.

Bien qu'extrêmement intéressants, ces mutants spontanés présentent le défaut majeur d'être trop rares pour le sélectionneur. Des systèmes de mutagenèse basés essentiellement sur l'utilisation de radiations ionisantes, et dans une moindre mesure les agents chimiques mutagènes, ont été développés depuis environ 70 ans. Au plan mondial, cette méthode a été utilisée avec succès chez près de 180 espèces et il n'est donc pas étonnant de trouver une multitude de variétés porteuses d'allèles obtenus de cette façon. Une étude de la FAO/IAEA (MALUSZYNSKI *et al.,* 2000) a recensé 2252 variétés issues de mutagenèse. En réalité, ce chiffre est très sous-évalué, car dans la plupart des cas, seule la variété directement issue de mutagenèse est indiquée, omettant les variétés issues des croisements ultérieurs. Il est aussi fort probable que toutes les variétés directement mutagenéisées n'aient pas toutes été déclarées à la FAO/IAEA.

Certaines variétés ont connu un vif succès (Tableau 1). Par ailleurs, des mutations induites se sont propagées par croisement dans de nombreuses variétés. Par exemple, la mutation *denso* provoquant un phénotype de semi-nanisme chez l'orge est probablement présente dans plus de 150 variétés d'orge pour brasserie cultivées dans tous les continents.

Tableau 1. Quelques exemples marquants de variétés contenant des caractères provenant d'expériences de mutagenèse induite.

Espèce améliorée	Caractère introduit	Date de création et nom de la variété
Pamplemousse	Couleur rouge de la pulpe	1984, Ruby Red
	Aspermie	1970, Star Ruby
Cerisier	Autofertilité	1985, Stella
Riz	Qualité du grain	1970, Delta
Forsythia	Port compact	1985, « Courtalyn », Weekend ®
Weigela	Feuillage panaché	1979« Courtatom », Couleur d'automne ®

De même, la teneur élevée en acide oléique du tournesol a été obtenue en 1976 par SOLDANOV et est maintenant présente dans la plupart des variétés modernes cultivées en Europe et aux Etats-Unis. Enfin, la variété d'œillet William Sim, obtenue par mutagenèse en 1938, se caractérisant par une excellente qualité de fleur et une haute productivité, est à l'origine des variétés qui dominent le marché actuellement.

La moitié des variétés issues de mutagenèse actuellement recensées ont été obtenues durant les quinze dernières années, ce qui indique que cette méthode est encore activement pratiquée.

2.3 - Exploitation et création de plantes polyploïdes

La polyploïdie peut se définir comme une multiplication de l'équipement chromosomique. Elle peut se produire naturellement du fait d'endomitoses ou, plus généralement par la rencontre de gamètes non réduits, résultant de méioses anormales. Ce phénomène n'est pas rare : le dactyle, la luzerne, le poireau et la pomme de terre sont des exemples parmi d'autres d'espèces naturellement tétraploïdes. Les plantes polyploïdes possèdent des caractéristiques qui peuvent intéresser le sélectionneur comme une augmentation de la taille et de la vigueur. Par contre, une augmentation du niveau de ploïdie entraîne une baisse de fertilité.

La découverte de l'action de la colchicine par BLAKESLEE en 1937 ainsi que celle d'autres agents mitoclasiques a rendu possible l'induction de doublements du stock chromosomique. Des polyploïdisations ont donc été essayées chez de nombreuses espèces. La betterave a sans doute été une des premières espèces à bénéficier de cette technique. Il est maintenant reconnu que l'état optimal de cette espèce est le niveau triploïde. La polyploïdisation a été utilisée abondamment dans le cas des plantes fourragères comme les ray-grass et le trèfle violet. Elle leur confère une meilleure appétence et digestibilité et, dans le cas du trèfle violet, une meilleure résistance à la sclérotiniose. Parmi les variations possibles du niveau de ploïdie, l'état triploïde est utilisé pour supprimer les graines dans certains fruits (apyrénie). C'est ainsi que KIHARA en 1951 a mis en place, chez la pastèque, un système où des individus triploïdes, obtenus par croisements entre un parent tétraploïde et un autre diploïde, sont cultivés en mélange avec des plantes diploïdes (pour assurer la pollinisation) de manière à obtenir des fruits sans pépins. La banane, certains agrumes et quelques pommes sont d'autres exemples de fruits triploïdes.

Le doublement du stock chromosomique est nécessaire pour rétablir la fertilité des hybrides interspécifiques ou pour associer des niveaux de ploïdie qui permettent de rendre compatibles certains croisements. Cette technique a donc eu aussi une importance non négligeable dans la réussite de croisements interspécifiques.

2.4 - Utilisation de l'haplodiploïdisation

En 1963, KIMBER et RILEY ont montré la présence de plantes haploïdes dans des descendances sexuées d'un certain nombre d'espèces. Cependant, leur faible fréquence d'apparition constituait un sérieux handicap pour leur utilisation en sélection. L'androgénèse *in vitro* par culture d'anthères, a d'abord été obtenue chez le Datura (GUHA et MAHESHWARI, 1964), puis confirmée chez le tabac (BOURGIN et NITSCH, 1967). Le

maïs (CHASE, 1969), la pomme de terre (HOUGAS *et al.,* 1964) et l'asperge ont ensuite été l'objet d'une production intensive et systématique d'individus haploïdes par certaines équipes, qui avaient investi dans cette voie malgré leur difficulté d'obtention. Au début des années 70, un effort important de recherche fut entrepris, souvent avec succès, pour étendre au plus grand nombre possible d'espèces les méthodes de culture d'anthères ou de microspores, et pour développer d'autres méthodes faisant ou non intervenir les cultures *in vitro* (irradiation de pollen, croisements interspécifiques, sauvetage d'embryons, etc...). L'utilisation directe de plantes haploïdes avec propagation par multiplication végétative est rare : *Thuja gigantea* var *gracilis* est monohaploïde et *Pelargonium* var Kleiner Liebling, variété cultivée dès 1925 est haploïde.

Généralement le doublement du stock chromosomique est nécessaire pour obtenir une plante homozygote et sa descendance sexuée. Ce doublement peut se réaliser spontanément au début du processus de développement (cas de l'androgenèse chez le colza ou l'orge), ou être induit ultérieurement grâce à l'utilisation d'agents mitoclasiques.

La fixation rapide du matériel génétique est une des utilisations les plus fréquentes de l'haplométhode : alors qu'il faut de 5 à 10 générations d'autofécondation selon les espèces pour atteindre une certaine homozygotie, une seule étape d'haplodiploïdisation suffit pour obtenir une homozygotie complète. Le gain de temps est variable suivant le nombre de générations qu'il est possible de réaliser chaque année mais il est de toute façon précieux.

En ne retenant que les combinaisons viables d'allèles, l'haplodiploïdisation permet aussi de contourner les difficultés liées à l'augmentation de la consanguinité que l'on rencontre chez les plantes allogames lors de la fixation des lignées par autofécondation.

L'haplodiploïdisation est maintenant utilisée en routine pour l'amélioration de nombreuses espèces comme l'asperge, l'aubergine, le blé, le chou, le colza, le maïs, l'orge le piment, le riz et le tabac (PELLETIER, 1998). Des variétés ont été inscrites au catalogue (tableau 2).

Tableau 2: Quelques exemples de variétés obtenues par haplodiploïdisation

Espèce améliorée	Date et nom de variété inscrite	Remarques
Maïs	1950, DEKALB 640	(3 parents HD)
Colza	Année 70, Maris Haplona	
Tabac	1974, F211	
Riz	1978, Lunghua 1	Variété chinoise
Orge	1980, Mingo	
Blé	1987, Florin	
Asperge	1990, Andréas	Variété hybride F1 100% mâles
Poivron	1995, Osir	

2.5 - Apport de la micropropagation

La régénération d'individus entiers par culture *in vitro* est possible par des méthodes qui peuvent être considérées comme des extensions des techniques horticoles de bouturage et de greffage. La culture de méristèmes isolés a été rendue possible par la connaissance, largement empirique, de l'action des substances de croissance sur la prolifération des cellules végétales, et sur les phénomènes de morphogenèse.

Dans le cas des espèces forestières, la micropropagation à l'aide de matériel juvénile ou rajeuni est possible chez de nombreuses espèces comme *Sequoia sempervirens*, *Pinus radiata*, et *Pinus taeda* pour les résineux ; le teck, l'eucalyptus, les peupliers, le merisier, le bouleau pour les feuillus. Le coût de production et la conformité du matériel sont les facteurs limitants. De nombreux pins, les mélèzes, divers épicéas, le douglas et le palmier à huile ont été produits pour plantation par embryogenèse somatique *in vitro* et création de cultures embryogènes.

Dans le domaine de l'horticulture, le micro bouturage est largement utilisé (fraisier, framboisier, vigne, gerbera, chrysanthème, rosier, porte-greffes de fruitiers, etc…) essentiellement dans les premières phases de la multiplication, le plus souvent associée à une amélioration et un contrôle de l'état sanitaire.

La culture d'embryons immatures, qui consiste à prélever des embryons quelques jours après la fécondation et à les placer *in vitro,* permet d'éviter les problèmes liés à la maturation et à la dormance de la graine et à accélérer le temps entre deux générations. Chez le tournesol, par exemple, il est possible de produire 4 à 5 générations par un an, ce qui permet une fixation du matériel génétique aussi rapide que dans le cas de l'haplodiploïdisation.

La micropropagation permet de produire en quantité suffisante et à coût raisonnable des parents d'hybrides de clones ou d'hybrides F1 chez des espèces à sexes séparés, comme par exemple dans le cas de l'asperge. Par contre, l'idée d'utiliser les capacités de l'embryogenèse somatique *in vitro* pour la production de semences artificielles, sans doute émise prématurément, n'a pas pu être concrétisée malgré le déploiement de moyens importants.

La protection des cultures est un des objectifs majeurs de l'amélioration des plantes. Le problème du phylloxera radicole a été résolu dès 1880 grâce à la création par sélection de porte-greffes de vigne résistants. Depuis, l'amélioration des résistances géniques n'a fait que progresser et cela grâce au progrès dans la connaissance et la détection des agents pathogènes. Dès le début des années 50, grâce aux travaux de MOREL et MARTIN, s'est développée la culture *in vitro* de méristèmes. Cette méthode a permis d'assainir d'abord des variétés de pomme de terre qui, par les méthodes de multiplication par tubercules avaient accumulé des virus. Elle a ensuite été appliquée à bien d'autres espèces à multiplication végétative (la vigne, le dahlia, le fraisier, ou l'artichaut) qui présentaient donc, que ce soit apparent ou non, les mêmes problèmes. Dans le cas des agrumes, l'assainissement est réalisé en utilisant conjointement la thermothérapie et le microgreffage. Chez l'ail, qui est aussi une espèce à multiplication végétative, l'assainissement par culture de méristème isolé a permis la création de nouvelles variétés dès les années 60. Cette sélection sanitaire est un apport remarquable à l'amélioration des plantes.

3 – RECOMBINAISON ET SELECTION

3.1 - Hybridation et sélection généalogique

La sélection généalogique mise en œuvre pour extraire les meilleures lignées de populations a trouvé naturellement son prolongement dans la sélection sur la descendance des croisements systématiques entrepris pour combiner des caractères. C'est la première synthèse

entre les hybrideurs, jusqu'alors surtout intéressés par l'hybridation entre espèces, et les sélectionneurs. On connaît l'importance de cette première méthode qui va pouvoir s'appuyer également sur les principes du mendélisme, dans l'amélioration des espèces autogames et dans la production des lignées parentales des variétés synthétiques et des hybrides F1.

L'amélioration des variétés de blé est caractéristique de l'efficacité de cette méthode conduisant, en synergie avec l'évolution des techniques de culture, à un accroissement considérable des rendements moyens qui passeront au cours du 20ième siècle de 12 à 70 quintaux (LE BUANEC, 1999).

3.2 - Production d'hybrides F1

L'intérêt des hybrides F1 de maïs a été suggéré par SHULL aux Etats-Unis dès 1909. Indépendamment, en 1933, ALABOUVETTE démontrait un effet d'hétérosis important chez les hybrides F1 de tomate. Il a fallu attendre une trentaine d'années pour que les premières variétés hybrides F1 soient créées par l'INRA chez le maïs (INRA 200 en 1957) et chez la tomate (Montfavet H63-5 en 1963). Ces variétés se sont avérées être plus productives, vigoureuses et homogènes que les variétés populations ou les lignées pures. Les hybrides F1 présentent aussi l'avantage de réaliser le cumul rapide de caractères dominants favorables tels que des résistances aux maladies. La production des mêmes types variétaux s'est étendue assez rapidement aux espèces pour lesquelles la castration manuelle est facile (piment, aubergine…).

Dans beaucoup d'autres cas, la production d'hybrides F1 a nécessité la mise en œuvre de systèmes assurant la maîtrise de la fécondation croisée entre les lignées parentales.

- La découverte d'une stérilité mâle nucléaire a été à la base de la création de la première variété de tournesol hybride F1 (INRA 6501 en 1969).
- L'incompatibilité a permis de produire des variétés de chou-fleur (Jakez en 1975).
- L'utilisation de gamétocide a conduit à la production d'une première variété de blé hybride (Courtel en 1985).
- La compétition pollinique a été à la base de la production d'hybrides F1 chez l'endive (Zoom en 1989).
- La stérilité mâle cytoplasmique a été découverte pour la première fois chez l'oignon (1937) et a été utilisée chez le maïs, la betterave, le tournesol, le sorgho, le riz , le colza, le chou, etc… Elle résulte en général de l'activation de l'expression de gènes mitochondriaux surnuméraires, présents dans certains cytoplasmes, quand ils sont confrontés à des génomes nucléaires provenant de génotypes éloignés.

3.3 - Création et exploitation d'hybrides interspécifiques ou intergénériques

Des croisements interspécifiques spontanés (tableau 3) ont donné naissance à de nouvelles plantes qui sont maintenant cultivées. On connaît les cas classiques des blés issus d'additions par croisement de génomes à 7 chromosomes de diverses espèces sauvages. Le colza résulte de l'hybridation naturelle entre la navette et le chou tandis que la moutarde brune est un hybride entre la moutarde noire et la navette. Il est certain que des additions plus anciennes et pour lesquelles les espèces parentales n'existent plus, sont à l'origine de nombre d'espèces considérées comme diploïdes.

Tableau 3. Quelques exemples des réalisations de l'hybridation interspécifique

Quelques exemples de création spontanée d'espèces par croisements interspécifiques		
Nom de l'espèce	**Espèces impliquées dans le croisement**	**Date d'apparition**
Blé tendre	*Triticum urartu + x + T tauchii*	Apparu autour de – 6000 ans avant JC
Colza	*Brassica oleracea + Brassica campestris*	Apparu avant le moyen age
Coton	*Gossypium arboreum + Gossypium thurberi*	Apparu avant – 5500ans avant JC
Fraisier	*Fragaria chiloensis + Fragaria virginiana*	1750, date d'apparition approximative.
Porte-greffes Pêcher /amandier	*Prunus dulcis + Prunus persica*	1967 GF677, largement diffusé dans le monde pendant 30 ans
Quelques exemples de création d'espèces par croisements interspécifiques dirigés par l'Homme		
Nom de l'espèce	**Espèces impliquées dans le croisement**	**Dates marquantes**
Triticale	Blé x *Secale cereale*	1983 Clercal, 1er triticale commercial français
Arabusta	*Coffea arabica x Coffea canephora*	1980 Création au CIRAD
Ray-grass hybride	*Lolium perenne x Lolium multiflorum*	1978 Augusta, première variété inscrite au catalogue français
Peuplier	*Populus deltoïde x Populus nigra*	1920 CV I 214 peupliers sélectionnés en Italie qui ont été très cultivés en France.
Porte-greffes abricotier	*Prunus domestica x Prunus spinosa*	1989 Avivel Torinel ® pentaploïde
Porte-greffes de vigne	*Vitis vinifera x Vitis berlandieri*	1978, Fercal 6ème porte-greffes français et résistant au calcaire
Quelques exemples de variétés portant des caractères apportés à l'espèce cultivée par croisements interspécifiques		
Espèce améliorée	**Espèce donneuse**	**Date et nom d'une variété. Caractère obtenu**
Fraisier	*Fragaria moselata*	1994, CF2024 résistance aux maladies et arôme du fruit
Blé tendre	*Aegilops ventricosa*	1976, Roazon Pch1 résistance au pietin-verse et Yr17, Lr37 et Sr 38 résistances aux rouilles jaune, brune et noire
	Secale cereal	1974, Clément Pm8 résistance à l'oïdium
	Triticum timopheevi	1973, Maris Hunstman Pm6 résistance à l'oïdium
Laitue	*Lactuca serriola*	1978, Capitan première variété possédant Dm11 résistance au Bremia
	Lactuca saligna	1990, Ninja première variété possédant Dm16 résistance au Bremia
Poivron	*Capsicum baccatum*	1991, Osir Résistance au virus CMV
Tournesol	*H petiolaris*	1974, Relax stérilité mâle cytoplasmique
	H tuberosus	1998, Inedi résistance au mildiou
Fétuque élevée	*Lolium multiflorum*	1977, Kenhy appétence satisfaisante

Le premier croisement interspécifique réalisé et recensé par l'homme, a été obtenu en 1717 par Fairchilde entre l'œillet des fleuristes et l'œillet des poètes. Un peu plus tard, le fraisier moderne (*Fragaria ananassa*) est apparu en Bretagne où des fraisiers du Chili (mâle-

stériles) étaient cultivés en mélange avec ceux de Virginie. De la même façon, l'introduction de *Populus deltoïdes* en France a conduit spontanément à des hybrides avec *P. nigra* qui ont été sélectionnés. Actuellement, 95% des cultivars de peupliers sont des hybrides interspécifiques. Une nouvelle céréale, le triticale, a été créée à partir de croisements entre le blé et le seigle, après un long cheminement qui a abouti avec la maîtrise des procédés de polyploïdisation. Des ray-grass hybrides entre *Lolium perenne* et *L. multiflorum* produisent des fourrages cumulant les avantages des deux parents. Ils ont été introduits en France depuis la fin des années 70. L'arabusta, hybride entre *Coffea arabica* et *C. canephora,* a été réalisé pour améliorer la qualité des caféiers cultivés en Afrique. Les rosiers cultivés résultent d'hybridations complexes. Des porte-greffes de vigne proviennent d'hybridation entre *Vitis vinifera* et *V. berlandieri.*

Un grand nombre de croisements interspécifiques ont été réalisés afin d'améliorer, par introgression, des espèces cultivées aussi différentes que le blé, la tomate, la pomme de terre, le tournesol, le colza, la betterave, le melon, le haricot, le piment, la laitue (tableau 3). Par exemple, dès 1930 le croisement avec *Triticum tauschii* a permis de transférer la résistance à la rouille des tiges à *Triticum aestivum,* ce qui a contribué très largement à la disparition de cette maladie durant une longue période aux Etats-Unis. Le blé a été croisé avec des espèces sauvages des genres *Aegilops* et *Agropyron* pour introduire des gènes de résistance au piétin-verse ou aux rouilles. Un tiers des variétés modernes françaises contiennent un fragment chromosomique d'*A. ventricosa* conférant la résistance aux rouilles.

D'autre part, un certain nombre de plantes cultivées peuvent s'hybrider de manière spontanée avec des espèces sauvages et ainsi échanger des gènes. Le maïs s'hybride donc facilement avec la téosinte, la betterave avec les betteraves sauvages et le colza avec la navette. Cependant, dans la plupart des cas, la séparation entre espèces est bien réelle et représente un grand défi pour le sélectionneur. Des barrières de types mécaniques, génétiques, cytoplasmiques ou chromosomiques peuvent être de sévères handicaps à la réalisation d'hybrides interspécifiques.

Des biotechnologies comme le sauvetage d'embryon ou l'hybridation somatique ont permis d'étendre le nombre de caractères introgressés par croisement interspécifique. Le sauvetage d'embryons a largement concouru à l'introduction des caractères de résistances à l'oïdium, aux virus de la mosaïque du concombre et aux virus de la mosaïque de pastèque dans la courgette (*Cucurbita pepo*) à partir des espèces sauvages *Cucurbita okechobeenis* et *Cucurbita ecuadorensis*. De même, des résistances au Brémia ont été introduites dans la laitue (*Lactuca sativa*) par croisement interspécifique avec *Lactuca saligna* et sauvetage d'embryons. Un autre grand bénéficiaire de cette technique a été le tournesol, des variétés résistantes au mildiou et au Sclérotinia ayant pu être obtenues dès 1985. Cependant, l'espèce qui a peut-être le plus bénéficié d'introgressions par hybridation interspécifique est la tomate. En effet, les croisements avec des espèces sauvages (*L. hirsutum*, *L. peruvianum*, *L. chilense*, *L. pimpinellifolium*, etc ...) ont été largement utilisées et il a fallu assez souvent avoir recours aux techniques de culture d'embryons *in vitro*. Ils ont permis de conférer des caractères de résistance à des bactéries, des virus, des champignons, des parasites, des ravageurs et des caractères agronomiques et d'amélioration de la qualité. On peut considérer qu'environ 10 % du génome des variétés actuelles de tomate provient de ces espèces sauvages (CAUSSE *et al.*, 2000).

3.4 - Hybridations somatiques

L'hybridation somatique est une méthode de combinaison d'informations génétiques qui nécessite plusieurs étapes réalisées en laboratoire : (1) la digestion des parois pecto-cellulosiques des cellules grâce à des enzymes extraites de champignons ou de bactéries qui permet d'isoler des protoplastes ; (2) la fusion de protoplastes d'origines différentes (génotype, espèce) grâce à des traitements chimiques (poly-éthylène glycol) ou des décharges électriques ; (3) la culture *in vitro* des produits de fusion jusqu'à la régénération de plantes entières.

C'est avec l'idée de créer de nouvelles espèces que l'on a tenté de réaliser ces hybridations en évitant les barrières classiques aux croisements interspécifiques qui se situent au niveau de la pollinisation, de la fécondation et/ou du développement de l'albumen et de l'embryon. Le premier succès, tout relatif, fut l'obtention, par fusion de protoplastes, de « pomates » (MELCHERS *et al.,* 1978), hybrides plus ou moins complets et aux garnitures chromosomiques variables, entre la pomme de terre et la tomate. Dans la famille des Brassicacées, des hybridations systématiques ont été réalisées pour évaluer l'intérêt des fusions de protoplastes dans le but de créer des nouvelles combinaisons d'espèces par rapport à ce qui avait déjà été obtenu par croisement. Ces études montrent que, mis à part le cas des hybrides colza/Arabidopsis, tous les hybrides somatiques obtenus par fusion somatique peuvent être reproduits par croisement et sauvetage d'embryons.

On peut aussi transférer une partie seulement du génome de l'un des deux parents à l'autre parent (hybride asymétrique). Pour cela, les protoplastes de l'espèce donneuse sont irradiés avant fusion. De cette façon, par exemple, la résistance au virus de l'enroulement a été introduite dans la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) à partir de *Solanum brevidens*.

L'hybridation somatique est particulièrement intéressante car elle réunie dans la même cellule les informations génétiques contenues non seulement dans le noyau, mais aussi dans le cytoplasme des deux parents. En conséquence, l'hybridation somatique est un outil de choix pour manipuler les caractères portés par le cytoplasme. La production de cybrides, plantes dont l'information génétique cytoplasmique provient d'une substitution (généralement le cas des plastes) ou d'une recombinaison (généralement le cas des mitochondries), a trouvé des applications pratiques. Par exemple, des cytoplasmes inducteurs de stérilité mâle ont été crées chez les *Brassica* (PELLETIER *et al.,* 1983), le riz et la chicorée. Ces cytoplasmes sont maintenant à l'origine de la création de nombreuses variétés de type hybride F1.

3.5 - La transgenèse

Dès le milieu des années 60, les chercheurs ont essayé de trouver des méthodes de transfert d'ADN chez les plantes. Cette recherche n'a débouché qu'au début des années 80, avec les progrès dans la connaissance des Agrobactéries. Presque simultanément, les techniques physiques d'électroporation et de biolistique permettaient, elles aussi, de transformer des cellules végétales. Outre les méthodes de transfert, et compte tenu de leur faible efficacité relative, il a fallu découvrir des gènes permettant la sélection des cellules effectivement transformées. La régénération, consistant à produire une plante entière transgénique à partir d'une cellule transformée généralement par culture *in vitro*, a été une étape difficile à maîtriser.

Il est actuellement possible, sinon facile, d'obtenir des plantes transformées chez toutes les espèces de grande culture. Après seulement 6 ans de commercialisation des OGM, 52 millions d'hectares étaient cultivés en 2001, principalement aux USA, au Canada, en Argentine et en Chine. Les quatre espèces principales, cultivées sous la forme de variétés transgéniques, sont le soja, le coton, le maïs et le colza. Les résistances aux herbicides ou aux insectes sont des caractères très fréquemment rencontrés dans ce type de variétés. Bien que la première autorisation de culture en Europe date de 1997, une opposition où se mêlent idéologie (ATTAC, Greenpeace etc…) et intérêts commerciaux (campagne publicitaire des Supermarchés Carrefour) et qui profite largement de l'ignorance soigneusement entretenue du public, conduit à une impossibilité de fait de culture d'OGM en Europe et à un affaiblissement sans précédent de la génétique végétale appliquée en particulier dans notre pays.

De nombreux programmes se développent ailleurs avec des cibles très variées : résistances aux maladies et aux insectes, amélioration des qualités gustatives et nutritionnelles, adaptation aux conditions de milieu défavorables (sel, sécheresse, froid), production de substances diverses, qu'il s'agisse d'améliorer la production de métabolites végétaux ou de protéines thérapeutiques (produits sanguins, protéines humaines, vaccins).

Si les cibles des programmes évoluent, il en va de même des méthodes de production de plantes transgéniques. Des promoteurs à domaine d'expression plus restreint sont souvent préférés à l'utilisation des promoteurs constitutifs traditionnels du type 35S. Les gènes marqueurs ne sont plus des gènes codant des protéines conférant des résistances aux antibiotiques. La transformation des plastes, plutôt que du génome nucléaire, est maintenant faisable sur des espèces comme la tomate (RUF *et al.,* 2001). Ce mode de transformation est particulièrement intéressant du fait que 1) de très hauts niveaux de production de protéines recombinantes peuvent être obtenus (protéines recombinantes représentant plus de 40% des protéines solubles), que 2) les effets épigéniques conduisant à un « silencing » soient absents et que 3) le risque de la dissémination du transgène par le pollen soit sérieusement limité. Dans un avenir plus lointain, certains travaux (HOHN et PUCHTA, 1999) font espérer qu'il sera possible de réaliser des mutations dirigées en utilisant la recombinaison homologue. Les plantes SAGE (Sans Addition de Gènes Extérieurs) ainsi obtenues ne seraient pas soumises aux limitations imposées par les contraintes réglementaires affectant les OGM.

3.6 - La sélection assistée par marqueurs

3.6.1. - Les marqueurs moléculaires et la connaissance des génotypes

La première carte génétique partielle du maïs fut publiée vers 1935 et n'était constituée que de loci correspondant à des caractères morphologiques. Des marqueurs enzymatiques (iso-enzymes), puis des marqueurs moléculaires, basés sur l'hybridation (RFLP) ou la PCR (RAPD, microsatellites, CAPS, AFLP) se sont développés en particulier depuis les années 80. Des cartes de liaisons génétiques saturées ont été réalisées chez de nombreuses espèces végétales : riz, haricot, tomate, colza, soja, maïs, blé, pin maritime. La cartographie comparée, en mettant en évidence des conservations de synténie entre espèces au sein des Solanacées (tomate, pomme de terre et piment), des Triticées (blé, orge, seigle) ou des Andropogonées (maïs, sorgho, canne à sucre) a décloisonné les programmes de recherches : un résultat obtenu sur une espèce peut alors avoir des répercussions sur un ensemble d'autres espèces.

Ces cartes et les marqueurs associés permettent un certain nombre d'applications directes comme l'identification variétale, la prédiction de l'hétérosis et d'évaluer des distances génétiques entre individus et de les classer au sein d'un germplasme.

Une des premières applications des marqueurs moléculaires est la localisation de gènes d'intérêt. La méthode de l'analyse de ségrégation en mélange (BSA – Bulk Segregant Analysis) est couramment utilisée et permet de localiser un gène d'intérêt, en l'encadrant par des marqueurs distants de quelques centimorgans. Quand le déterminisme génétique est plus complexe, les gènes d'intérêt correspondants peuvent être localisés simultanément sur les cartes génétiques par une approche statistique comme dans le cas de l'identification des QTL (Quantative Trait Loci).

De plus en plus, on cherche à identifier les gènes eux-mêmes. Ces recherches s'appuient sur la conservation de synténie et les homologies de séquence entre espèces, la formulation d'hypothèses sur des gènes candidats, l'établissement de banques génomiques et de cartes physiques, la production de populations recombinantes de grande taille. Cette démarche est activement entreprise au sein du programme national Génoplante. Cette connaissance débouche sur un marquage direct, et donc plus fiable des caractères, la recherche de nouveaux allèles, et ouvre des perspectives de transgenèse.

3.6.2. - Les marqueurs moléculaires et la sélection

La connaissance de la variabilité allélique des gènes responsables des caractères permet d'entrevoir la possibilité de construction de génotypes cumulant les allèles favorables en utilisant le marquage moléculaire pour définir les meilleurs plans de croisements et sélectionner ces combinaisons.

L'exemple le plus simple est celui de la conversion par rétrocroisements assistée par marqueurs. Lors de l'introgression d'un caractère dans une variété élite, il est nécessaire, après avoir réalisé le croisement, de faire une série de rétrocroisements. Si l'on dispose de marqueurs moléculaires répartis sur le génome de la variété élite, il est possible de choisir, à chaque génération, les descendants se rapprochant le plus de celle-ci, tout en s'assurant de la présence du caractère introgressé. En contrôlant de cette manière chaque étape du processus, on bénéficie d'un gain de temps très appréciable.

Bien que l'invention des techniques de biologie moléculaire nécessaires à l'élaboration de marqueurs comme la PCR soit récente, le marquage moléculaire est activement utilisé dans l'amélioration des plantes. Quelques variétés, obtenues par sélection assistée par marqueurs, ont déjà été inscrites (ou sont en voie d'inscription) au catalogue français. Le marquage moléculaire sera très probablement un outil largement utilisé pour la création variétale dans les prochaines années.

3 – CONCLUSION

Dans ce rapide survol, largement incomplet, des méthodes qui ont été successivement élaborées, on constate que l'objectif du sélectionneur, ou de celui qui œuvre en amont, est de remplacer l'aléatoire de la sélection par des procédés qui permettent d'atteindre l'objectif de manière prévisible. Ainsi, l'utilisation de marqueurs moléculaires permet de mieux connaître la variabilité génétique et de guider la sélection. La transgenèse, quant à elle, permet de

contrôler précisément le caractère introduit. Cependant beaucoup de résultats marquants tiennent également à des opportunités ou à d'heureux hasards...

L'amélioration des plantes a été une source incontestable de progrès. Toutes les espèces n'ont pas été traitées de la même manière. La génomique et les biotechnologies demandent des investissements importants et accentuent la tendance à concentrer les efforts sur des espèces économiquement rentables.

Une meilleure connaissance de la biodiversité des espèces importantes pour l'agriculture devrait « logiquement » être la conséquence des progrès sur le marquage moléculaire. Cet outil et la découverte de la fonction des 25 000 gènes de l'espèce modèle Arabidopsis, promise pour 2010 et facilement transposable aux espèces cultivées offriront « logiquement » à l'améliorateur des possibilités sans précédents pour la construction de nouveaux génotypes. Les besoins quantitatifs en forte augmentation au niveau planétaire ainsi que la recherche d'une diversification des produits devraient tout aussi « logiquement » offrir de nombreuses « niches » qui pourront être exploitées par les sélectionneurs.

Jamais les moyens de la gestion génétique de la production agricole ne seront aussi puissants et précis.

Qui en profitera ?

Journée de l'A.S.F. du 7 février 2002.

BIBLIOGRAPHIE

BEADLE, G.W. -1980- The ancestry of corn. *Scien. Amer.* 242 : 112-119.

BENZ, B.-2001- La domestication du maïs. La recherche 348 : 24-29.

BLAKESLEE, A. -1937- Dédoublement du nombre de chromosomes chez les plantes par traitement chimique. *C. R. Acad. Sci*. Paris 205 : 476-479.

BOURGIN, J.P. et NITSCH, J.P. -1967- Obtention de *Nicotiana* haploïdes à partir d'étamines cultivées *in vitro*. *Ann. Physiol. Veg.* 9 : 377-382.

CAUSSE, M., CARANTA, C., SALIBA-COLOMBANI, V., MORETTI, A., DAMIDAUX, R. et ROUSSELLE, P. -2000- Valorisation des ressources génétiques de la tomate par l'utilisation de marqueurs moléculaires. *Cahiers Agricultures* 9 : 197-210.

CHASE, S.S. -1969- Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L) *Bot. Rev*. 35 : 117-167.

GAUTIER, M. -2001- La création de variétés fruitières. *Jardin de France*. 8-13.

GUHA, S. et MAHESHWARI, S.C. -1964- *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204 : 497.

HOHN, B. et PUCHTA, H. -1999- Gene therapy in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 96 : 8321-8323.

HOUGAS, R.W., PELOQUIN, S.J. et GAVERT, A.C. -1964- Effect of seed-parent and pollinator on frequency of haploids in *Solanum tuberosum*. *Crop Science* 4 : 593-595.

KIHARA, H. -1951- Triploid water melons. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 58 : 217-230.

KIMBER, G. et RILEY, R. -1963- Haploid angiosperms. *Bot. Rev.* : 480-531.

LE BUANEC, B. -1999- Diversité génétique des variétés de blé tendre cultivées en France au cours du vingtième siècle. Evolution variétale, données techniques et économiques. *C. R. Acad. Sci*. Paris 85 : 37-53.

MALUSZYNSKI, M., NICHTERLEIN, K., VAN ZANTEN, L. et AHLOOWALIA, S. -2000- Officially released mutant varieties – The FAO/IAEA database. *Mut. Breed. Rev*. 12 : 1-84.

MELCHERS, G., SACRISTAN, M.D. et HOLDER, AA. -1978- Somatic hybrids of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlberg Res. Comm*. 43 : 203-218.

MÜLLER-THURGAU, H. -1898- Abhangigkeit der traubenbeeren und einiger andered fruchte von der ebtwicklung der samen. *Landw. Jahr. Schweiz.* 12, 135-203.

PELLETIER, G., PRIMARD, C., VEDEL, F., CHETRIT, P., REMY, R., ROUSSELLE, P. et RENARD, M. -1983- Intergeneric cytoplasmic hybridization in cruciferae by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet*. 191 : 244-250.

PELLETIER, G. -1998- Use of haplo-diploisation for plant breeding. In Chupeau Y, Caboche M, Henry Y eds. *Androgenesis and Haploid Plants*. Versailles : Springer/Inra Editions.

RUF, S., HERMANN, M., BERGER, I.J., CARRER, H. et BOCK, R. -2001- Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nature Biotechnol*., 19 :870-827.

VILMORIN, J.L. -1923- L'hérédité chez la betterave cultivée. Gauthier-Villars et Cie, éditeurs. Paris : 153 p.