



HAL
open science

Création de lignées haploïdes doublées de maïs par gynogenèse induite in situ : amélioration de la méthode et intégration dans les schémas de sélection

Jacques Bordes

► **To cite this version:**

Jacques Bordes. Création de lignées haploïdes doublées de maïs par gynogenèse induite in situ : amélioration de la méthode et intégration dans les schémas de sélection. Biologie végétale. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2006. Français. NNT : 2006CLF21646 . tel-00688812

HAL Id: tel-00688812

<https://theses.hal.science/tel-00688812>

Submitted on 18 Apr 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL

N° D. U. 1646

UNIVERSITÉ D'AUVERGNE

Année 2006

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

N° d'ordre 436

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

(Spécialité : Agronomie et Génétique quantitative)

soutenue le 13 avril 2006

Jacques BORDES

Création de lignées haploïdes doublées de maïs par
gynogenèse induite *in situ* : amélioration de la méthode et
intégration dans les schémas de sélection

Directeur de thèse : Robert DUMAS de VAULX

JURY

Président	Paul	NICOLAS	Professeur Université Blaise Pascal
Rapporteurs	Claire	DORÉ	Directeur de Recherche INRA Versailles
	Alain	CHARCOSSET	Directeur de Recherche INRA Le Moulon
Examineurs	Robert	DUMAS de VAULX	Directeur de Recherche INRA Clermont-Fd
	André	GALLAIS	Professeur émérite INA Paris-Grignon
	Antoine	LAMBERT	Directeur de Recherche Limagrain
Invité	Michel	BECKERT	Directeur de Recherche INRA Clermont-Fd

UMR 1095 INRA/UBP Amélioration et Santé des Plantes – INRA Clermont-Ferrand

Remerciements

Ce travail représente l'objectif que je m'étais fixé initialement, qui était de faire une synthèse des principaux résultats acquis depuis une dizaine d'années, par l'équipe de sélection du groupe "Biologie du développement du maïs".

Ce groupe, dont faisait partie Robert Dumas de Vaultx, Directeur de l'unité, était animé par Michel Beckert. Je les remercie très sincèrement tous les deux. Robert m'a permis d'engager ce travail de thèse et a accepté d'en être le Directeur. Michel m'a accordé sa confiance et a eu un rôle important d'encadrement.

L'équipe, placée sous la responsabilité de Maurice Pollacsek puis de Michel Beckert, était constituée d'Annie Lapiere, qui s'est beaucoup investie dans ce travail et a assuré en grande partie la gestion du matériel végétal et la logistique des opérations, Jean François Charmet, Bernard Coudert et Daniel Saint André, auxquels se sont joints momentanément, Laurent Falchetto et Delphine Boyer. Toutes ces personnes ont participé à l'ensemble des travaux évoqués au cours de cette étude et qui ont fait l'objet d'échanges fréquents avec la seconde équipe du groupe, Pierre Barret et Michèle Brinkmann. Je remercie particulièrement Pierre pour ses conseils et pour ses qualités relationnelles.

La réalisation des différentes opérations a fait appel à des collaborations, locales avec les équipes du Domaine, des Installations Expérimentales et d'Agri Obtentions, et extérieures avec les équipes du réseau expérimental de l'INRA.

Je remercie Robert Dumas de Vaultx, Michel Beckert et Gilles Charmet, responsables successifs de l'Unité, ainsi que Maurice Pollacsek, responsable de l'équipe jusqu'à son départ à la retraite en 2001, de m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions et de l'aide qu'ils m'ont apportée par la suite.

Je remercie Paul Nicolas d'avoir soutenu et présenté mon projet pour sa validation au conseil scientifique de l'école doctorale et d'avoir accepté de présider le jury.

Je remercie Alain Charcosset, responsable du "Groupe Maïs" de l'INRA, d'avoir toujours soutenu l'intégration de la technique "HD" dans les programmes du groupe, notamment dans le cadre du projet industriel et de PROMAÏS. C'est en grande partie cette source de financement qui a permis, depuis 1997, la poursuite des travaux sur l'intégration de la gynogenèse in situ dans les programmes de sélection. En plus des différentes charges qu'il doit assurer, il a su me consacrer du temps pour la définition de mon projet et a accepté d'en être rapporteur.

Je n'aurais jamais pu, sans l'aide d'André Gallais, aborder du point de vue de la génétique quantitative, l'intégration de l'HD en sélection. Depuis plus de deux ans, je suis devenu un de ses "étudiants". En effet, il est fréquent qu'à une question me paraissant anodine, la réponse soit un véritable cours, me démontrant que le point soulevé est en fait d'une grande importance. Je le remercie pour son aide précieuse et sa disponibilité.

Enfin, j'ai une pensée particulière pour Claire Doré qui depuis 1996 m'a fait profiter, de sa grande connaissance des différentes techniques liées à l'haploïdie et de sa maîtrise de la langue française. Quelles que soient les circonstances et quels que soient le jour et l'heure, Claire a répondu à mes nombreuses interrogations. Je la remercie chaleureusement pour toute l'aide qu'elle m'a apportée et d'avoir accepté, malgré ses "soucis" actuels, d'être rapporteur.

Ce travail, qui a bénéficié d'un partenariat avec l'association PROMAÏS, a toujours suscité un intérêt de la part de son président, Monsieur Jean Pierre Monod et de son secrétaire général, Philippe Carré. Je remercie Antoine Lambert (Limagrain Genetics), l'animateur du groupe "HD PROMAÏS" pendant toute la durée du partenariat, d'avoir accepté de faire partie du Jury.

Durant cette période, de nombreux échanges se sont noués avec les différentes firmes souhaitant intégrer l'haplométhode dans leur programme de sélection. Je remercie les principaux acteurs de cette collaboration : Mme De Volf, Mrs Brassard, Lambert et Vimont de Limagrain Genetics (Verneuil Semences); Mrs Baratin, Bizard et Moreau de Caussade Semences; Mrs Devaud, Gelez, Gaillard et Taillardat de Maïsadour Semences; Mme Bonnecuelle et Mr Lefèvre de R2n-RAGT; Mrs Fèvre et Bettinger de Euralis Semences.

Le partenariat, dans le cadre du projet industriel INRA-Agri Obtentions, a permis de développer des collaborations actives avec : d'une part Agri Obtentions et notamment Pierre Henry Auriel le responsable de l'équipe URAO 63, René Rougier, Freddy Lardière et récemment Thierry Seguin. Je remercie Louis Forêt son Directeur et Jean-Pierre Jaubertie son Directeur technique, d'avoir décidé avec Alain Charcosset, de poursuivre la production de lignées haploïdes doublées à Clermont-Ferrand; et d'autre part avec les collègues du groupe maïs de l'INRA et notamment Cyril Bauland, Jacques Laborde, Dominique Denoue et les différentes équipes de Mons, Le Moulon, Lusignan, Saint Martin-de-Hinx et Montpellier. Je voudrais aussi souligner les collaborations efficaces avec Denis Glochon pour les générations d'hiver au Chili.

Le travail d'une équipe, au sein d'une Unité de recherche, fait appel à différents services. Je voudrais remercier : Josiane Bonnemoy pour ses réponses rapides et pertinentes concernant la documentation, Monique Maronne, Patricia Tixier-Leyre et Valérie Béringer du secrétariat pour leur disponibilité malgré des périodes quelquefois "chargées" et leur bonne humeur, Isabelle Lhomme et Annie Rigaud du service comptabilité gestion pour leur prise en compte rapide des demandes et leur amabilité. Je remercie Amandine de son aide pour la reliure.

J'ai une pensée pour ma mère... J'associe mon père et ma famille. Je remercie mes jeunes partenaires de tennis de l'INRA, anciens thésards pour la plupart, pour leurs conseils avisés d'avant soutenance et mes partenaires plus anciens du Stade Clermontois d'avoir manifesté pendant cette période un certain intérêt pour la sélection du maïs. Je remercie mes amis Clermontois pour leurs conseils pour certains, leur soutien et leurs encouragements. J'ai une pensée particulière pour mes amis corréziens, notamment ceux de l'amicale "CANO".

Enfin, si ce travail présente un intérêt, je le dédie à ceux pour lesquels je n'ai pas eu la disponibilité que l'on est en droit d'attendre d'un mari ou d'un père de famille, Françoise, Julie, Etienne, François, Baptiste, Clément.

Sommaire

INTRODUCTION	1
I - SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	5
A : L'amélioration du maïs	5
<u>1. Les variétés hybrides</u>	5
1.1 Les principaux groupes génétiques	7
1.2 L'aptitude à la combinaison entre ces groupes	7
1.3 La création des variétés hybrides	7
<u>2. La création de lignées pures</u>	8
2.1 Principe général de la production de lignées parentes de variétés	8
2.2 La création de populations de lignées recombinantes	9
<u>3. L'amélioration des populations par sélection récurrente</u>	9
<u>4. L'étude des déséquilibres de liaison et de l'épistasie</u>	10
<u>6. Conclusion</u>	11
B : L'haplodiploïdisation	12
<u>1. Définition</u>	12
<u>2. Techniques d'obtention d'haploïdes chez le maïs</u>	12
2.1 La culture <i>in vitro</i>	13
2.2 Les traitements physiques et chimiques	14
2.3 Les croisements interspécifiques	14
2.4 Les croisements intraspécifiques avec des génotypes particuliers	14
<u>3. Identification des plantes haploïdes</u>	15
3.1 Utilisation des caractéristiques morphologiques	16
3.2 Utilisation de transgènes	16
3.3 Utilisation de marqueurs génétiques dominants	17
3.4 Utilisation de marqueurs génétiques récessifs	18
<u>4. Doublement du stock chromosomique des plantes haploïdes</u>	19
4.1 La diploïdisation spontanée	20
4.2 Le doublement induit	20
<u>5. Obtention d'une descendance = lignée strictement homozygote</u>	20
<u>6. Avancées du laboratoire et points à améliorer</u>	21
C: Conclusions de la synthèse bibliographique et objectifs de l'étude	23
<u>1. Conclusions de la synthèse bibliographique</u>	23

<u>2. Objectifs de l'étude</u>	25
II - MISE AU POINT ET AMELIORATION DE LA GYNOGENESE INDUITE	28
<u>1. Induction de la gynogenèse</u>	28
1.1 Mise au point de WS14 pour une utilisation industrielle	28
1.2 Amélioration du taux d'induction	30
<u>2. Identification des individus haploïdes</u>	32
2.1 Les allèles récessifs des gènes <i>glossy</i>	33
2.2 Les allèles dominants des gènes de coloration	35
<u>3. Doublement chromosomique pour restaurer la fertilité</u>	35
3.1 Doublement spontané	35
3.2 Doublement induit par la colchicine	36
3.3 Expérimentation de protocoles de doublement	37
3.4 Conclusion	37
<u>4. Obtention d'une descendance: au moins un grain par plante haploïde</u>	38
4.1 Périodes de végétation	38
4.2 Conditions de cultures	38
<u>5 Conclusion</u>	39
III - GENETIQUE QUANTITATIVE ET HAPLO METHODE	40
<u>1. Les lignées HD</u>	40
<u>2. Les lignées HD et la sélection</u>	40
<u>3. Modélisation de la variation génétique</u>	41
<u>4. L'épistasie</u>	41
<u>5. Linkage et épistasie dans les populations F_2 ou F_2-dérivées</u>	42
5.1 Effets du linkage	43
5.2 Sens de variation de la moyenne sous l'effet du linkage en présence d'épistasie	44
5.3 Evolution de la variance sous l'effet du linkage	47
<u>6. Effet du linkage sur les descendances dans une population à base large</u>	48
6.1 Structure génétique de la population et des descendances HD et SSD	49
6.2 Effets du déséquilibre de liaison	49
6.3 Estimation du DL à partir de S_1 et HD	52
6.4 Conclusions	52
<u>7. Estimation de l'épistasie avec plusieurs lignées HD par plante S_0</u>	52
<u>8. Sélection récurrente sur lignées HD versus sur familles S_1</u>	53

<u>9. Conclusions</u>	55
IV: ETUDE EXPERIMENTALE	56
Impact de l'haplométhode sur la méthodologie de la sélection du maïs	56
<u>1. Matériels et méthodes</u>	56
1.1 Matériel génétique	56
1.2 Méthode expérimentale	57
<u>2. Réponse à la gynogenèse</u>	58
2.1 Résultats et discussion	58
2.2 Conclusions	60
<u>3 Comparaison entre lignées HD et SSD pour la valeur propre</u>	61
3.1 Caractères mesurés	61
3.2 Résultats et discussions	61
3.3 Conclusions	62
<u>4 Analyse de la variation de lignées HD, SSD et de familles S₁ pour la valeur hybride</u>	
Article 1	63
Doubled-haploid versus single-seed descent and S ₁ -families variation for test cross performance in a maize population	
<u>5 Sélection récurrente sur HD versus sur S₁</u>	
Article 2	78
Doubled-haploid versus S ₁ -family recurrent selection for testcross performance in a maize population	
<u>6. Coût des méthodes</u>	98
6.1 Production de lignées	98
6.2 Sélection récurrente	99
6.3 Conclusion	99
V- CONCLUSION GÉNÉRALE	100
VI- PERSPECTIVES	104
Références bibliographiques	109
Annexe 1	118
Annexe 2	120

INTRODUCTION

Avec le riz (*Oriza sativa* L.) et le blé tendre (*Triticum aestivum* L.), le maïs (*Zea mays* L.) est l'une des trois céréales les plus cultivées au monde. Plus de 650 millions de tonnes de grains ont été produites en 2004 dont 35 millions pour l'Union européenne et 16 millions pour la France. La surface cultivée en France est d'environ 3 millions d'hectares. Une moitié est récoltée sous forme de grains mûrs ("maïs grain"), l'autre moitié sous forme de plante entière avant la maturité complète des grains (stade pâteux) et destinée à l'ensilage ("maïs fourrage"). Environ la moitié de la production de grains est exportée vers les pays membres de l'Union européenne. Le secteur des semences de maïs (40 000 hectares) occupe le second rang mondial des exportations derrière les Etats-Unis. La filière maïs constitue donc une activité majeure pour l'économie française.

Le maintien au niveau mondial d'une certaine compétitivité, nécessite en permanence la création de variétés nouvelles, améliorées pour différents caractères. Ces variétés sont des hybrides composés de lignées complémentaires très fortement homozygotes, issues de cycles de sélection et manifestant une bonne "aptitude à la combinaison". La fixation des principaux caractères sélectionnés nécessite 6 à 8 générations d'autofécondations amenant à plus de 10 ans le temps nécessaire à l'obtention d'une variété. Malgré le recours aux générations de contre-saison, maintenant bien ancré dans la logistique des sélectionneurs, cette durée est encore de 6 à 8 ans. Elle peut être ramenée à 3 ou 4 ans avec l'utilisation de l'haplodiploïdisation qui permet l'obtention de lignées haploïdes doublées (HD), strictement homozygotes, en une génération de culture.

C'est l'utilisation de cette méthode originale de production de lignées pures dans les schémas de création variétale du maïs qui constitue le fil conducteur de ce mémoire.

Depuis une vingtaine d'années, à partir des différents travaux initiés par Chase (1949) sur la gynogenèse spontanée et Coe (1959) sur la gynogenèse induite *in situ*, Kermicle (1969) sur l'androgenèse induite *in situ*, Miao *et al.* (1978) sur l'androgenèse *in vitro*, de nombreuses investigations sur les différentes techniques ont été réalisées et des progrès importants ont été obtenus.

Le groupe "biologie du développement du maïs" de la Station d'Amélioration et Santé des Plantes de l'INRA à Clermont-Ferrand (Puy-de-Dôme) a consacré une grande partie de ses recherches à cette thématique, principalement à l'étude de l'androgenèse *in vitro* et de la gynogenèse *in situ* (Beckert, 1994). La chronologie des avancées du groupe dans ce domaine peut être résumée en quelques étapes clés importantes.

Pour l'androgenèse *in vitro*, la technique utilisée étant la culture d'anthères :

- du point de vue de l'application pratique, le nombre moyen de lignées haploïdes doublées (HD) obtenues par androgenèse *in vitro* est intéressant, mais il devra être amélioré pour assurer au moins une descendance par plante mère, quel que soit le génotype utilisé (Barloy et Beckert, 1993).

- l'utilisation de l'androgenèse *in vitro* en sélection, passe par le transfert de l'aptitude à l'androgenèse, existant chez quelques rares génotypes, dans des contextes génétiques plus proches du matériel élite (Murigneux *et al.* 1994).

- le taux de réponse à l'androgenèse *in vitro* d'une population peut être augmenté sans en altérer sa valeur agronomique et réciproquement, la valeur agronomique d'une population peut être accrue tout en conservant son aptitude à l'androgenèse *in vitro* (Marhic *et al.* 1998).

Pour la gynogenèse *in situ*, la technique utilisée étant le croisement intraspécifique avec un génotype inducteur :

- l'amélioration du pourcentage d'induction des individus haploïdes d'origine maternelle par la sélection de la lignée WS14, fait que le seul obstacle important à l'utilisation de l'haplodiploïdisation par gynogenèse induite *in situ*, est désormais l'identification des plantes haploïdes (Lashermes et Beckert, 1988).

- une large variabilité élite sur le plan agronomique, possédant un système fiable d'identification des haploïdes à l'échelle industrielle a été décrite (Bordes *et al.* 1997).

Au plan mondial, les travaux réalisés ces dernières années, notamment sur la gynogenèse *in situ* (Sarkar *et al.* 1994; Shatskaya *et al.* 1994; Deimling *et al.* 1997), n'ont pas apporté d'améliorations fondamentales pour l'optimisation du système de production de plantes haploïdes.

En conclusion sur l'utilisation de ces différents systèmes, les perfectionnements apportés aux principaux paramètres qui régissent la production de lignées HD à partir du phénomène de gynogenèse induite *in situ*, notamment "l'induction" et "l'identification" des individus haploïdes, permettent maintenant une production de lignées en grand nombre. L'utilisation industrielle dans les programmes d'amélioration génétique du maïs peut être envisagée, mais la généralisation est encore conditionnée par une aptitude à produire sans biais de sélection défavorable, des lignées HD à partir de n'importe quel génotype utilisé (Beckert, 1994). De plus, cette technique de production de lignées pouvant modifier de façon importante la méthodologie actuelle de la sélection (Gallais, 1988), une analyse de l'impact de son utilisation par rapport à la voie habituelle de la fécondation est nécessaire.

Au niveau génétique, la différence importante entre la production de lignées par

autofécondations répétées et l'haplodiploïdisation est le nombre d'étapes de recombinaisons réalisé avant l'homozygotie complète. Un individu haploïde se développe par parthénogenèse à partir d'un gamète femelle donc après une seule méiose contre 8 à 10 pour les lignées obtenues par autofécondations successives. Ceci peut avoir, selon la structure génétique des populations, un effet sur la variation des caractères. En fonction du sens de la variation, cet effet peut être un avantage ou un inconvénient par rapport à des lignées obtenues par autofécondation en filiation monograine ou (*Single Seed Descent*) (SSD) (Snape et Simpson, 1981). En revanche, cette particularité constitue une source de variation maîtrisable qui peut être un "outil" d'aide à l'étude génétique de caractères quantitatifs. Plusieurs études théoriques montrent l'intérêt de l'haplodiploïdisation pour l'étude génétique des caractères quantitatifs et dans les schémas de sélection (Choo, 1981; Gallais, 1990a, 1993; Bouchez et Gallais, 2000).

Depuis une dizaine d'années, le travail conduit à l'INRA de Clermont-Ferrand concernant la méthode d'obtention de lignées HD basée sur le croisement intraspécifique avec un génotype induisant la gynogenèse *in situ*, a bénéficié d'une action spécifique de l'INRA dans le cadre d'un projet industriel (INRA-Agri Obtentions) et d'un partenariat avec plusieurs firmes de sélection de l'association PROMAÏS (groupe de travail constitué de l'INRA et de la plupart des firmes de sélection du maïs). L'objectif étant i) d'assurer la diffusion de ce système aux sélectionneurs et de poursuivre un travail d'amélioration et ii) d'évaluer son impact par rapport aux méthodes classiques dans un programme expérimental de sélection.

L'évaluation de l'impact doit permettre de répondre aux principales questions qui se posent pour l'utilisation de cette méthode :

- quelle est l'efficacité de la gynogenèse dans la variabilité génétique élite utilisée par les sélectionneurs ?
- y a-t-il présence de biais défavorables de sélection pour les principaux caractères agronomiques par rapport à la voie de la fécondation ?
- quelle est l'importance de la fréquence des recombinaisons sur la variation génétique des caractères ?
- quel est le progrès génétique escompté par sélection récurrente, par rapport aux méthodes conventionnelles ?
- quelle est l'efficacité de ce système pour l'étude de la structure génétique d'une population ?

Les résultats obtenus permettront de mieux définir le mode d'utilisation de l'haplométhode pour l'amélioration génétique du maïs.

Chez différentes espèces riz, orge, blé tendre, blé dur, cotonnier, piment, asperge, aubergine, ... l'intégration de l'haplodiploïdisation dans les programmes de sélection semble acquise. Actuellement chez le maïs, le système commence à être utilisé par de plus en plus de sélectionneurs pour fixer rapidement les lignées, mais à notre connaissance, aucune étude méthodologique à l'échelle d'un programme de sélection n'a été décrite.

Après une introduction générale du sujet, ce mémoire est constitué de quatre parties et d'une conclusion.

La première partie bibliographique situe le sujet dans son ensemble, tant du point de vue de l'intérêt pour l'amélioration des plantes que de celui de l'évolution de la méthode.

La deuxième partie concerne la mise au point de la méthode pour sa diffusion et son étude dans un programme de sélection. Pour les quatre étapes clés qui conditionnent sa réussite : induction de la gynogenèse, identification des individus haploïdes, doublement chromosomique et obtention d'une descendance, les travaux réalisés et leur validation sont décrits. Le point est fait sur les améliorations récentes de chaque étape.

La troisième partie est une étude théorique de génétique quantitative avec haplo-méthode.

La quatrième partie est une étude expérimentale à partir d'une population à base génétique large pour :

- juger de l'efficacité de la gynogenèse dans une large variabilité génétique "élite" d'un point de vue agronomique,
- comparer des lignées HD à des lignées SSD et des familles S_1 ,
- évaluer le progrès génétique escompté par sélection sur lignées HD versus sur familles S_1 ,
- estimer le coût de l'haplométhode par rapport aux méthodes classiques.

Cette quatrième partie intègre deux articles :

Variation among Doubled-Haploid versus variation among Single-Seed-Descent lines and S_1 -families for testcross performance in a maize population, qui a été soumis à la revue *Euphytica* (18/05/06).

Doubled-haploid versus S_1 -family recurrent selection for testcross performance in a maize population, accepté le 28/12/05 dans la revue *Theoretical and Applied Genetics* (TAG).

Et enfin la conclusion qui définit, après une synthèse des améliorations apportées et des résultats obtenus, un mode optimisé possible d'utilisation de l'haplométhode. Les perspectives qui pourraient être envisagées pour ce travail y sont évoquées.

I - SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

A : L'amélioration du maïs

L'amélioration des plantes peut être définie comme l'art et la science de la création de variétés répondant de mieux en mieux aux besoins de l'homme (Gallais, 1990c). Dans le cas du maïs, ces variétés sont des hybrides qui, par le phénomène d'hétérosis, manifestent une certaine "*vigueur hybride*" (Figure I.1). A la suite de différents travaux conduits dès la fin du XVIII^e siècle, l'hétérosis a été définie comme un effet de stimulation dû aux unions gamétiques d'éléments différents (Shull, 1914 et 1948). La genèse de ce concept et son intégration dans les programmes de sélection des variétés de maïs, aux Etats-Unis puis en France, est développée par Charcosset (2002).

L'amélioration d'une espèce doit être conçue pour obtenir des progrès génétiques significatifs à court terme tout en préparant des progrès plus importants à long terme. L'axe central d'une stratégie "intégrée" de la sélection à long terme et de la création de variétés doit être formée par l'amélioration du matériel de base par sélection récurrente (Figure I.2) (Gallais, 1990c).

Chez le maïs, un cycle de sélection est généralement réalisé à partir de populations en ségrégation F₂, de rétrocroisements (ou *back-cross*) ou de populations synthétiques issues de croisements plus ou moins complexes entre lignées élites. La base génétique du matériel de départ de sélection peut varier d'une population composée de deux parents (biparentale) à une population composée d'un grand nombre de parents (synthétique).

L'estimation de la valeur variétale d'un croisement de départ et la connaissance de la structure génétique d'une population sont importantes pour définir un schéma de sélection approprié. Pour les facteurs à hérédité quantitative, une population peut être caractérisée par sa moyenne et sa variance. A partir de plans de croisements appropriés, l'étude de la variation de ces paramètres permet la décomposition de la variance génétique et apporte des informations sur l'origine des effets génétiques. Pour la valeur hybride, ce sont : l'additivité et l'épistasie qui représentent les effets d'interaction entre allèles déterminant le caractère. La prise en compte de l'ensemble de ces paramètres doit permettre une meilleure efficacité des schémas de sélection.

1. Les variétés hybrides

Aux Etats-Unis, jusqu'aux années 1930 et en France jusqu'aux années 1950, les variétés de maïs cultivées étaient des populations sélectionnées par les agriculteurs. Ces

derniers constituaient leur lot de semence pour la culture suivante par le choix des plus "beaux épis" lors de la récolte. A partir de la "redécouverte" des lois de Mendel et des travaux de Shull (1908), est apparu au début du XX^e siècle le concept de variété hybride simple, qui est le résultat du croisement contrôlé de deux lignées pures et correspond à la reproduction à grande échelle du meilleur individu d'une population ou d'un hybride de populations. C'est dans les années 1930-1940 qu'est apparu le concept d'aptitude à la combinaison ou valeur hybride, comme critère de sélection des parents d'un hybride. En France, c'est dans les années 1950 que les premières variétés hybrides de maïs ont été créées par l'INRA. Ces hybrides sont le résultat de croisements entre des lignées sélectionnées dans les variétés populations d'origine européenne et des lignées d'origine nord-américaine. Ces deux origines, européenne et nord-américaine qui engendrent une forte valeur hybride (effet d'hétérosis élevé) constituent deux groupes complémentaires dits "hétérotiques". L'observation au cours du temps de bonnes "aptitudes à la combinaison" entre populations de diverses origines, a permis la définition de plusieurs groupes hétérotiques.

Trois types de variétés ont été créés :

- i) l'hybride simple = croisement entre 2 lignées de 2 groupes complémentaires,
- ii) l'hybride 3 voies = croisement entre un hybride simple composé de deux lignées d'un même groupe hétérotique et une lignée d'un groupe complémentaire. Cet hybride, dit "faux trois voies", permet une bonne productivité pour la production de semences. En effet, bien que composé de deux lignées proches, l'hybride simple parental manifeste une certaine vigueur hybride qui permet de bons rendements pour la production de semences.
- iii) l'hybride double qui est le croisement entre deux hybrides simples de deux groupes complémentaires. Ces derniers ne sont plus cultivés actuellement en France.

L'intérêt des variétés hybrides par rapport aux variétés populations ou lignées porte sur (Charcosset, 2002) :

- leur supériorité agronomique qui se traduit par une vigueur importante favorisant les rendements élevés et une bonne résistance aux parasites,
- leur homogénéité qui facilite les opérations culturales,
- leur homéostasie qui facilite d'adaptation à des milieux divers,
- la possibilité d'association, dans une variété, de caractères complémentaires apportés par les parents. Par exemple, un hybride est composé d'une lignée très précoce mais sensible à la verse, et d'une lignée tardive mais résistante à la verse et à fort potentiel de rendement.

L'impact des hybrides par rapport aux variétés populations sur l'évolution des rendements aux Etats-Unis est indiqué à la Figure I.3 (Troyer, 1996).

1.1 Les principaux groupes génétiques

Les variétés de maïs actuellement cultivées résultent de la combinaison de lignées issues de groupes génétiques complémentaires (hétérotiques) connus.

Ces principaux groupes génétiques et leurs origines sont :

corné précoce	origine européenne
corné "plata"	origine sud-américaine
corné canadien	origine canadienne
denté "iodent"	origine nord-américaine
denté "Lancaster"	origine nord-américaine (Lancaster)
denté "Stiff Stalk Synthetic"	origine nord-américaine
denté "Minnesota"	origine nord-américaine

Les caractéristiques "corné" et "denté" concernent la forme et la texture du grain (Figure I.4). Le grain "corné" possède un albumen vitreux important et un albumen farineux réduit. C'est l'inverse pour le grain "denté" qui, de plus, a la forme d'une incisive. Le caractère "grain corné" est associé dans l'esprit du sélectionneur, aux populations précoces d'origine européenne. Le caractère "grain denté" est, quant à lui, associé aux populations plus tardives d'origines nord-américaines.

Les hybrides "corné x denté" sont à l'origine du succès de la culture du maïs dans les zones septentrionales de l'Europe, situées au nord de la Loire.

1.2 L'aptitude à la combinaison entre ces groupes

Selon leur appartenance, les lignées issues de ces groupes manifestent une certaine aptitude à la combinaison (aptitude à une certaine complémentarité pour engendrer une très bonne vigueur hybride).

Les principaux axes d'aptitude à la combinaison entre ces groupes sont :

i) "cornés"	x	"dentés" (tous les groupes)
ii) "denté Iodent"	x	"dentés" (tous les autres groupes)
iii) "Stiff Stalk Synthetic"	x	"Lancaster"
iv) "Stiff Stalk Synthetic"	x	"Minnesota"

1.3 La création des variétés hybrides

La création d'une variété hybride comporte trois phases :

- la création de lignées pures ou "fixées",

- l'évaluation de l'aptitude à la combinaison de ces lignées,
- la réalisation et l'évaluation des hybrides expérimentaux entre lignées.

2. La création de lignées pures

Pour que les lignées soient considérées comme "fixées" d'un point de vue agronomique, c'est-à-dire que la fixation des caractères permette de les reproduire indéfiniment à l'identique (lignée pure), au moins 8 à 10 générations d'autofécondations sont nécessaires. Au cours de ces générations, un système d'évaluation est introduit. Il permet de sélectionner les individus porteurs des caractères favorables et de les maintenir par autofécondations. Pour l'utilisation des nouvelles techniques de sélection, liées à la caractérisation des génotypes par des marqueurs moléculaires, il est nécessaire de créer des populations de lignées recombinantes. Ces lignées doivent être une représentation aléatoire des gamètes parentaux.

2.1 Principe général de la production de lignées parentes de variétés

A partir de populations naturelles ou créées artificiellement, présentant des qualités nouvelles, un cycle de sélection est réalisé (Figure I.5). L'objectif de ce cycle est double. D'une part, il s'agit d'identifier les individus portant les caractères intéressants et d'autre part, de fixer ces caractères par autofécondations successives jusqu'à l'homozygotie complète des génotypes. On aura alors obtenu des lignées nouvelles, comportant les caractères recherchés. Tout au long de cette phase, la sélection des futurs parents d'hybrides s'effectue progressivement et à deux niveaux : i) de l'individu lui-même pour la "valeur propre", ii) de sa descendance en croisement avec une lignée ou un hybride simple d'un groupe génétique complémentaire (testeur commun) susceptible de faire apparaître une bonne vigueur hybride. On évaluera alors l'Aptitude à la Combinaison (AC). Le choix du testeur commun du groupe complémentaire se porte en général sur une lignée parente de variété. Dans ce cas, à la fin du cycle de sélection, les hybrides expérimentaux se montrant supérieurs à des variétés témoins seront aptes à subir les tests de validation des nouvelles variétés. Certains critères de sélection s'appliquent aux individus eux-mêmes : la précocité, la résistance à la verse, la tolérance aux maladies,... D'autres s'appliquent aux descendances : la productivité, la précocité évaluée par la teneur en eau à la récolte, la résistance à la verse, la tolérance aux maladies,...

Lorsque la sélection est conduite de façon parallèle pour les deux groupes hétérotiques, il s'agit de sélection réciproque.

A partir des lignées jugées aptes à apporter un progrès à la suite des tests "d'Aptitude à la

Combinaison" avec un testeur, il peut être procédé à la création d'hybrides simples avec différentes lignées du groupe complémentaire. Ces hybrides sont alors expérimentés dans différents lieux, puis comparés à des variétés commerciales choisies comme témoins d'un progrès génétique. Si un hybride est significativement supérieur aux témoins, il peut alors être présenté au CTPS (Comité Technique Permanent de la Sélection) pour subir des tests en vue de son inscription sous forme de variété commercialisée au catalogue officiel des espèces et variétés. Les caractères des lignées parentes de ces hybrides, obtenues par autofécondations, utilisées le plus souvent dès la 6^{ème} génération ne sont pas entièrement fixés. Elles conservent une variabilité pouvant engendrer certains inconvénients, notamment des défauts d'homogénéité et de stabilité qui peuvent aller jusqu'à un refus d'homologation lors des tests de Distinction Homogénéité et Stabilité (DHS) du CTPS. Ensuite, si l'hybride devient une variété commerciale, il est nécessaire de multiplier ces lignées parentes dans un processus de sélection conservatrice. Cette dernière étape consiste en l'individualisation sous forme de lignes de tous les épis et de la sélection de lots homogènes pour la multiplication des semences de base qui serviront à la fabrication des variétés commerciales. Cette phase est une étape lourde qui mobilise d'importants moyens lors des périodes de multiplication.

Dans le processus de création variétale, la durée de fixation des lignées (6 à 8 générations) est la contrainte majeure.

2.2 La création de populations de lignées recombinantes

Si l'on veut produire une série de lignées représentatives d'un échantillon de plantes d'une population, ou des gamètes d'une F1, on réalise 8 à 10 générations d'autofécondations à partir d'un seul individu pris au hasard dans chaque descendance. Par exemple, si l'on retient 150 plantes dans la population de départ, on aura 150 lignées pures, une par plante de départ à la fin du cycle. Cette méthode, appelée filiation unipare ou single seed descent (SSD) peut être utilisée comme méthode de sélection ou comme méthode de production de lignées recombinantes à partir de deux parents pour différentes études génétiques.

Avec cette méthode, à la durée importante de fixation des lignées, s'ajoute un inconvénient majeur : il subsiste un certain pourcentage d'hétérozygotie résiduelle. De plus le mode de production de lignées SSD peut être la source de biais de sélections involontaires.

3. L'amélioration des populations par sélection récurrente

La sélection récurrente est la création de nouvelles populations à partir d'inter-fécondations des génotypes qui se sont montrés les plus performants lors des tests (Figure I.6).

Afin de limiter la longueur d'un cycle améliorateur d'une population, les génotypes servant de base aux nouvelles populations sont sélectionnés à partir des tests précoces, le plus souvent sur familles S_1 . Ces populations, qui peuvent être enrichies par l'introduction de matériel génétique nouveau (Figure I.2), servent de départ pour un nouveau cycle. Elles comportent une fréquence plus importante d'allèles favorables, augmentant ainsi la probabilité d'obtenir une lignée réunissant un grand nombre de ces allèles.

Depuis l'utilisation de cette méthode chez le maïs pour l'amélioration de l'aptitude à la combinaison (Hull, 1945), beaucoup de variantes ont été expérimentées. D'un point de vue général, un cycle de sélection comporte 4 étapes :

- 1) production des génotypes à évaluer,
- 2) croisement de ces génotypes avec une lignée d'un groupe complémentaire,
- 3) évaluation des hybrides,
- 4) intercroisements des individus sélectionnés.

Les variantes sont constituées par différentes modalités d'application au niveau de ces étapes.

Les expérimentations réalisées jusque là, principalement pour l'amélioration du rendement, montrent des résultats assez fluctuants mais souvent positifs. Certaines indiquent des progrès faibles ou nuls, d'autres indiquent des progrès d'environ 14 % par cycle. En moyenne, le progrès par cycle se situe entre 2 et 8 % (Hallauer et Miranda, 1981; Weyhrich *et al.* 1998).

Les tests précoces présentent les inconvénients liés à la structure hétérozygote des génotypes évalués et sélectionnés. L'augmentation du degré d'homozygotie par autofécondation allonge de façon importante la durée du cycle.

4. L'étude des déséquilibres de liaison et de l'épistasie

Une bonne connaissance de la structure génétique d'une population de départ de sélection, notamment celle de la présence de déséquilibres de liaison (DL) et d'effets d'épistasie, doit permettre la définition d'un programme de sélection approprié. Les DL, dans une population multipliée en panmixie, sont des associations non aléatoires d'allèles situés à des locus différents dans les gamètes. L'épistasie est la présence d'un effet d'interaction entre gènes non homologues, qui agit sur la détermination d'un caractère. Au niveau des locus présentant des effets de dominance, les associations entre locus ayant des valeurs de dominance de même signe vont agir sur la variance d'hétérosis (Charcosset, 1990). Les effets d'épistasie agissent sur la moyenne (Comstock et Robinson, 1952 ; Gardner et Lonquist, 1959 ; Robinson *et al.* 1960). Pour estimer ces composantes, différents modèles établis à

partir de plans de croisements particuliers ont été utilisés. Ils sont basés sur la comparaison des moyennes et variances de populations isogéniques à différentes générations de panmixie (Moreno-Gonzalez et Dudley, 1981) et sur l'étude des covariances entre apparentés (Gallais, 1974; Weir *et al.* 1980 ; Melchinger, 1984).

Les études expérimentales réalisées jusque là, ont été faites le plus souvent, à partir de lignées élites (Lamkey *et al.* 1995 ; Wolf et Hallauer, 1997 ; Wolf *et al.* 2000). La plupart mettent en évidence qu'une augmentation du nombre de générations de recombinaisons s'accompagne d'une baisse de la moyenne de la population (Melchinger *et al.* 2003). Ceci est s'expliqué par la rupture d'association d'allèles présentant des effets d'épistasie favorables chez les lignées élites parentales. Il n'a, par contre, pas été mis en évidence d'action significative de l'augmentation du nombre de recombinaisons sur la variance d'aptitude à la combinaison (Wolf *et al.* 2000). En général, les différentes expérimentations réalisées montrent de faibles effets d'épistasie pour la valeur en combinaison. Des études complémentaires pour évaluer l'impact réel de l'intensité des recombinaisons sur la variance génétique sont nécessaires (Melchinger *et al.*, 2003). Toutefois, les plans de croisement utilisés jusque là, présentent certaines limites liées à des sources d'erreur propres aux dispositifs. Melchinger (1984) indique notamment : des comparaisons effectuées entre descendance de compositions génétiques différentes (F_1 , F_2 , rétrocroisements, lignées), des semences pouvant présenter une énergie germinative différente selon le sens du croisement.

6. Conclusion

Les principaux inconvénients rencontrés lors des différentes étapes du processus d'amélioration génétique du maïs par les voies classiques sont :

- la durée importante de fixation des caractères,
- leur fixation incomplète,
- les biais de sélection lors de la conduite d'une SSD,
- l'évaluation de génotypes hétérozygotes lors des tests précoces ou lors d'études génétiques.

La production de lignées haploïdes doublées (HD), lorsque la technique est bien maîtrisée, permet de réduire ces principaux inconvénients. L'utilisation de lignées HD qui sont strictement homozygotes, permet la production de géniteurs de variétés homogènes et stables répondant parfaitement aux critères de DHS. L'étape de sélection conservatrice se trouve ainsi limitée à la vérification de l'absence de génotypes aberrants qui proviendraient d'allopollinisation lors des phases précédentes.

B : L'haploïdisation

1. Définition

Au cours de la reproduction sexuée, chez les Angiospermes, il se produit une double fécondation. Le grain de pollen contient deux noyaux ou cellules gamétiques mâles qui sont haploïdes : l'une féconde l'oosphère pour former le zygote diploïde qui se développera en un embryon, l'autre fusionne avec le noyau polaire du sac embryonnaire, habituellement déjà diploïde, pour former une cellule triploïde à partir de laquelle se développeront l'albumen et les tissus de réserve.

Exceptionnellement, des anomalies de fécondation peuvent conduire au développement d'un sporophyte à partir d'un seul gamète. Les cellules de cette plante seront alors à n chromosomes et la plante sera dite haploïde. C'est à partir de cet événement rare, dont on peut parfois maîtriser la fréquence, que se sont développées de nombreuses études pour l'utilisation de cette anomalie de la reproduction en amélioration des plantes.

Le développement d'une plante haploïde, l'haploïdisation, peut avoir deux origines :

- un noyau du grain de pollen, donc mâle, on parle d'androgenèse,
- un noyau du sac embryonnaire, donc femelle, on parle de gynogenèse.

Les plantes haploïdes sont en général stériles. Pour retrouver leur fertilité, il est nécessaire de restaurer l'état diploïde des cellules mères des microspores (gamétophytes mâles) et des macrospores (gamètes femelles). C'est la diploïdisation. Cette opération est réalisée au cours de divisions cellulaires, généralement à l'aide d'agents « mitobloquants » ou mitoclasiques tels que la colchicine. Au cours de la mitose, en présence de colchicine, la formation du fuseau chromatique le long duquel migrent les chromosomes des deux futures cellules est inhibée. Une seule cellule réunissant les produits de la mitose est formée, elle possède donc le double de chromosomes. Les deux séries $n + n$ sont identiques, la plante haploïde doublée (HD) est donc homozygote *sensu stricto* et on obtient ainsi une lignée fixée en une seule génération de reproduction sexuée.

2. Techniques d'obtention d'haploïdes chez le maïs

Le phénomène d'haploïdie peut être spontané.

Chez le maïs, la présence spontanée de plantes haploïdes au sein d'une population est

connue depuis longtemps (Randolph et Stadler, 1929 cités par Chase, 1969). Leur faible fréquence d'apparition dans différentes descendance, qui varie de 0,5 à 2‰ (Randolph, 1938; Chase, 1949), exclut l'utilisation du système en sélection.

Ce phénomène peut être aussi induit *in vitro* ou *in situ* et diverses techniques induisant le développement d'individus haploïdes ont été expérimentées.

2.1 La culture *in vitro*

- **La gynogenèse induite *in vitro***

Elle correspond à la culture d'ovules non fécondés. Elle a été appliquée avec succès sur un certain nombre d'espèces cultivées : l'orge (San Noeun, 1976), le blé (Zhu et Wu, 1979), le riz (Asselin de Beauvillé, 1979).

Chez le maïs l'obtention de plantes haploïdes par cette technique semble difficile (Ao *et al.*, 1982; Truong-André et Demarly, 1984).

- **l'androgenèse induite *in vitro***

La culture d'anthères (Figure I.7), contenant des microspores au stade précédant la première mitose pollinique, ou la culture de microspores isolées ont permis de régénérer des plantes (Miao *et al.* 1978). Depuis, de nombreux laboratoires se sont intéressés à la mise au point de cette technique (Brettell *et al.*, 1981; Genovesi et Collins, 1982; Nitsch *et al.*, 1982; Dieu et Beckert, 1986; Petolino et Jones, 1986).

Après avoir optimisé les conditions de production de plantes haploïdes par culture d'anthères (Barloy *et al.*, 1989; Murigneux *et al.*, 1993), l'équipe "Biologie du développement du maïs" de l'INRA de Clermont-Ferrand a pu réaliser une première étude de cette technique dans un schéma de sélection récurrente (Marhic *et al.*, 1998). Cette étude montre que, d'une part, on peut accroître de façon très significative le taux de réponse à l'androgenèse *in vitro* sans influencer sur les caractères agronomiques et que, d'autre part, on peut augmenter la valeur agronomique d'une population sans diminuer l'aptitude à l'androgenèse *in vitro*.

La réussite de cette technique est soumise à de nombreux facteurs. Son avantage principal est le taux élevé de doublement du stock chromosomique spontané, mais elle demeure très dépendante du facteur génotypique.

Il serait nécessaire de localiser et de caractériser les gènes impliqués dans les toutes premières étapes de ce processus de déviation morphogénétique des microspores pour pouvoir lever la barrière génétique qui aujourd'hui empêche l'obtention, à une échelle industrielle, d'haploïdes doublés *in vitro* quelle que soit la base génétique utilisée (Dufour *et al.*, 2001;

Barret *et al.*, 2004).

2.2 Les traitements physiques et chimiques

Afin d'induire le développement de plantes haploïdes ou d'amplifier des aptitudes spontanées, de nombreux agents physiques ou chimiques ont été employés.

Le bleu de toluidine, appliqué sur du pollen de maïs (Al-Yasiri et Rogers, 1971) n'a pas permis l'obtention de plantes haploïdes.

L'application par injection à travers les spathes ou par badigeonnage d'acides naphtylacétique, indolebutyrique, gibbérellique (Gyulavari, 1970) et borique (Lashermes, 1987), de colchicine (Daenon, 1957), de bleu de toluidine (Al-Yasiri et Rogers, 1971), de benzyladénine (Lashermes, 1987) n'a pas apporté d'amélioration notable de la production d'haploïdes.

Les résultats de ces techniques sont décevants et irréguliers, notamment à cause d'un faible pourcentage de grains viables et de nombreux effets secondaires (Chase, 1969 ; Lacadena, 1974).

2.3 Les croisements interspécifiques

L'apport de pollen de sorgho (*Sorghum bicolor* L.), de *Tripsacum* (*Tripsacum* sp.) et de *Pennisetum americanum* L. (Bernard et Jewell, 1985) sur des épis femelles de maïs n'a produit qu'exceptionnellement des plantes haploïdes. Cette technique est basée sur une pseudo fécondation suivie de l'élimination des chromosomes de l'espèce sauvage et l'élimination incomplète des chromosomes de l'espèce sauvage peut s'avérer fréquente (Stalker *et al.* 1977; James, 1978; De Wet *et al.*, 1984).

Remarque : on peut signaler que le pollen de maïs est utilisé à l'échelle industrielle pour l'induction de plantes haploïdes de blé (Suenaga, 1994).

2.4 Les croisements intraspécifiques avec des génotypes particuliers

La fréquence des haploïdes spontanés à l'intérieur d'une population peut varier selon le génotype des parents mâles ou femelles du croisement (Chase, 1949). Des génotypes spécifiques ou la présence de gènes particuliers peuvent accroître cette fréquence dans des proportions importantes. Selon le génotype "inducteur" utilisé, les individus haploïdes sont d'origine mâle ou femelle.

En 1956, Coe signale la lignée Stock 6 qui, utilisée comme parent mâle, induit le

développement *in situ* de 1 à 3% de plantes haploïdes d'origine gynogénétique dans sa descendance (Figure I.8).

En 1969, Kermicle rapporte l'apparition d'une mutation spontanée survenue dans la lignée Wisconsin 23 (W23). Le gène concerné, *indeterminate gametophyte (ig)*, qui a une action pléiotropique, entraîne notamment des modifications dans la structure du gamétophyte femelle provoquant une polyembryonie. Utilisée comme parent femelle (Figure I.9), la lignée W23 *ig* peut induire *in situ* dans sa descendance, la formation de 0,5 à 2% de plantes haploïdes d'origine androgénétique (Chumak, 1979), 0,2 à 0,7 % selon Lashermes (1987).

En 1988, Lashermes et Beckert sélectionnent la lignée *WS14* qui permet l'induction *in situ* de 2 à 5% d'individus haploïdes gynogénétiques. Par la suite, d'autres lignées ont été signalées pour leur forte aptitude à induire des plantes haploïdes d'origine gynogénétique (Zavalishina et Tyrnov, 1992 ; Shastskaya *et al.*, 1994 ; Sarkar *et al.*, 1994 ; Zabirowa *et al.*, 1996 ; Deimling *et al.*, 1997 ; Eder et Chalyk, 2002).

La gynogénèse induite *in situ* permet donc une production de plantes haploïdes à un taux compatible avec un travail à grande échelle. Elle est d'accès facile pour tout sélectionneur car elle utilise les techniques classiques de fécondation au champ et ne fait pas appel à des techniques élaborées de laboratoires comme la culture *in vitro*. Le problème que posait le faible taux d'induction semble donc en partie résolu par ces différentes avancées. Mais, la mise en œuvre de l'haplométhode nécessite un système de repérage des individus haploïdes, résultant du développement gynogénétique, dans la population diploïde d'individus hybrides résultant des processus de fécondation et de développement embryonnaire normaux. Le système d'identification des individus haploïdes doit être précoce et opérationnel soit au niveau de l'embryon, soit dès l'apparition des premières feuilles. En effet, l'efficacité de la deuxième étape, le retour à l'état diploïde, d'un traitement "diploïdisant" est conditionnée par une application précoce.

3. Identification des plantes haploïdes

Très généralement, l'individu haploïde présente les mêmes caractéristiques morphologiques que l'individu diploïde. Toutefois, la réduction de la moitié de son génome se traduit par une réduction du volume cellulaire et une diminution de la taille de la plante (Magoon et Khanna 1963). Cette miniaturisation relative ne suffit cependant pas à repérer de façon

suffisamment fiable les plantules présumées haploïdes. C'est la raison pour laquelle des marqueurs génétiques, visibles précocement et d'observation facile sont recherchés.

3.1 Utilisation des caractéristiques morphologiques

Certains caractères morphologiques ont été utilisés pour détecter les individus haploïdes : la taille du coléoptile ou des jeunes racines, la longueur de la première feuille (Chase, 1949) ou même les dimensions des cellules de garde des stomates (Sarkar et Coe, 1966). Mais, l'importance de la variabilité génétique et environnementale rend cette méthode de tri aléatoire. Il est, en effet, difficile dans une même série de plantes, de faire la différence entre une plante diploïde peu développée et une plante haploïde très développée.

3.2 Utilisation de transgènes

- **Gène léthal**

Une plante de tomate, possédant le gène *aux2* d'*Agrobacterium rhizogenes*, cultivée sur un substrat contenant une hormone de croissance, l' α -naphtalène acétamide, meurt. En effet, le gène *aux2* transforme l' α -naphtalène acétamide en acide naphtalène acétique. Les plantes résultant du croisement entre une plante transgénique homozygote pour le gène *aux2* et une plante possédant le gène sauvage ne développent pas de racines en présence d' α -naphtalène acétamide. Les plantes haploïdes qui se développent à partir d'un gamète de la plante possédant l'allèle sauvage, émettent des racines. (Hamza *et al.*, 1993).

- **Gène de résistance à un herbicide**

L'incorporation par transgénèse, chez l'inducteur WS 14 (Lashermes et Beckert, 1988), de la résistance à l'herbicide Basta® (Donn *et al.*, 1990) devrait permettre d'identifier les haploïdes (Geiger *et al.*, 1994). L'hérédité de ce caractère est monofactorielle dominante. On peut repérer les individus non résistants en déposant une goutte de solution de cet herbicide sur une petite surface de feuille afin de ne pas détruire la plante. Les plantes qui réagissent positivement, c'est-à-dire celles dont la feuille présente des "brûlures" sont sensibles à l'herbicide. Elles n'ont pas reçu l'allèle "résistance au Basta" lors de la fécondation. Le génome de ces plantes est uniquement d'origine maternelle. Elles sont donc haploïdes.

Cette technique fait appel à des manipulations assez lourdes. En effet, pour une production finale d'environ 100 lignées HD, avec un pourcentage d'induction d'environ 3% et un pourcentage de descendance d'environ 30%, il est nécessaire de trier environ 15 000

plantes. Ce qui suppose de déposer la solution herbicide sur autant de plantes. De plus, la culture de l'inducteur transgénique en plein champ nécessite des conditions particulières selon la législation propres aux organismes génétiquement modifiés (OGM).

3.3 Utilisation de marqueurs génétiques dominants

La présence de marqueurs génétiques permet de distinguer dans la descendance les plantes hybrides issues d'une fécondation normale et les plantes haploïdes issues d'une cellule non fécondée. Pour être efficaces, ces marqueurs ne doivent pas être sensibles aux conditions de milieu ou masqués par l'expression de gènes similaires.

Le système "idéal" de détection est la présence d'un gène dominant chez la plante utilisée comme inducteur d'haploïdes.

- **Gène létal**

Un gène létal dominant (*Rac*⁻) présent chez un mutant de tabac sélectionné *in vitro* (Muller *et al.*, 1985) ne développant pas de racines, a été utilisé pour repérer des plantes haploïdes (Pelletier *et al.*, 1987). Les plantes diploïdes résultant du croisement entre le mutant homozygote *Rac*⁻ et une plante de type sauvage *rac*⁺ n'ont pas de racines et meurent. A partir de ce même croisement, on peut voir se développer quelques plantes possédant des racines. Il s'agit de plantes haploïdes *rac*⁺ d'origine paternelle

- **Gène de coloration du grain**

Les gènes dominants de coloration du grain ont, jusqu'à maintenant, été les plus utilisés selon le principe schématisé à la Figure I.10 : lorsque l'embryon n'est pas coloré, il résulte de la division du gamète de la plante induite qui, elle, ne porte pas le gène de coloration. Il y a donc absence de l'allèle dominant de coloration présent chez l'inducteur. Il n'y a pas eu fusion des noyaux mâle et femelle, cet embryon est à n chromosomes, il est donc haploïde.

Ces pigmentations violettes ou pourpres qui apparaissent au niveau de l'embryon ou de la plante, sont dues pour l'essentiel à l'accumulation d'anthocyane (Strauss, 1959). Au moins 14 locus distincts affectent quantitativement et qualitativement l'élaboration et la distribution des pigments anthocyanés. Dans la voie de biosynthèse des anthocyanes, on a pu distinguer des gènes de structure : *C2* ou *Whp1*, *A1*, *A2*, *Bz1* et *Bz2*, qui codent pour des enzymes et agissent de façon linéaire. Chacune des fonctions est nécessaire pour que les pigments se développent. Si une ou plusieurs des trois premières fonctions faiblissent, par la présence d'un homozygote récessif par exemple, les pigments ne sont pas produits. Si un des deux gènes

Bz1 ou *Bz2* est homozygote récessif, le pigment est de couleur bronze (Neuffer *et al.*, 1997).

Ces gènes de structure sont régulés par différents gènes qui induisent des facteurs de transcription :- au niveau de la couche à aleurone *C1* en combinaison avec *R1*,

- au niveau de la gaine *P11* avec *B1* ou *Lc1*,

- au niveau du coléoptile et des feuilles *P11* avec *B1* ou *R1-r* ou *r1-r*.

Si un ou plus de ces allèles est récessif, les pigments ne sont pas synthétisés dans les tissus spécifiques.

Il existe des allèles dominants qui peuvent inhiber la biosynthèse des pigments dans la couche à aleurone : *C1-I*, *C2-Idf* et *In1-D*. Coe et Sarkar (1964) utilisent à titre expérimental un caractère de coloration chez le parent femelle et un allèle inhibiteur chez l'inducteur. Chez les grains issus d'une fécondation normale, ni l'embryon, ni l'albumen ne sont colorés. Chez les grains résultant du développement gynogénétique, seul l'embryon est coloré en violet pourpre.

Nanda et Chase (1966) utilisent le caractère *purple embryo marker*. Ce marqueur dominant est induit par le complexe *C2*, *A1*, *A2*, *Bz1*, *Bz2* *C1(R1-nj* ou *B1-peru)*, il se traduit par une coloration violet pourpre des grains. Lorsqu'il est présent dans le génome du mâle inducteur, les grains résultant d'une fécondation normale présentent un embryon et un albumen colorés en violet pourpre. En revanche, chez les grains résultant du développement gynogénétique, seul l'albumen est coloré.

Dans la pratique, il est difficile d'identifier un embryon non coloré car dans le grain, il peut être masqué en partie par la couche à aleurone et la coloration du péricarpe. De plus, l'expression de ces marqueurs est fortement influencée par le génotype du parent femelle utilisé, ou même par le processus général de maturation du grain. Toutefois, bien que de fiabilité partielle, ce système permet d'identifier, dans certains types de matériels génétiques, un certain pourcentage des individus haploïdes putatifs. En revanche, pour une étude de comparaison entre différentes techniques, cette identification partielle est susceptible d'induire des biais liés à la non-identification d'un certain nombre de plantes haploïdes.

3.4 Utilisation de marqueurs génétiques récessifs

Ce système pallie l'absence d'allèle marqueur dominant, d'efficacité totale, qui serait introduit chez l'inducteur.

L'utilisation d'un allèle marqueur récessif nécessite son introduction préalable dans le matériel végétal dans lequel on souhaite repérer les plantes haploïdes. Il s'exprimera dès lors qu'il n'y aura pas fécondation. L'embryon sera d'origine gynogénétique et la plante sera

haploïde.

- **Caractère *liguleless***

Prensky (1960) et Lashermes (1987) utilisent le caractère *liguleless* (*lg*). La présence de ce caractère se manifeste pendant toute la durée de la végétation, par l'absence de ligule au niveau de l'insertion du limbe. Les feuilles ont alors un port érigé (Figure I.11). Toutefois, ce caractère présente certains inconvénients majeurs puisqu'il provoque une baisse de productivité (Pendleton *et al.*, 1968) et rend les opérations ultérieures d'autofécondation difficiles. On a donc peu de chance d'obtenir une lignée utilisable ultérieurement.

- **Caractère *glossy***

Coe (1956) utilise le caractère *glossy* (*gl*) qui modifie la cire épicuticulaire des feuilles. Ce marqueur se traduit par un aspect brillant de la surface des feuilles des plantules au lieu de la glaucescence bleutée observée chez les plantules normales (Figure I.12). De plus, lorsqu'on pulvérise de l'eau sur les feuilles (Figure I.13) de fines gouttes sont retenues (Hayes, 1928).

La cuticule des plantes qui contrôle avec les stomates les mouvements d'eau entre la paroi extracellulaire des cellules de l'épiderme et l'air environnant est une membrane continue assez fine. Elle est composée d'une matrice tridimensionnelle de polymères (la cutine), de polysaccharides et de dérivés lipidiques spécifiques : les cires épicuticulaires. Ces cires sont un mélange complexe de composés lipidiques dont la majorité dérive d'acides gras à très longues chaînes saturés. La biosynthèse des cires requiert l'activité coordonnée d'un grand nombre d'enzymes pour assurer la synthèse des acides gras et leur transformation ultérieure en composés plus complexes. Deux voies de biosynthèse semblent être à l'origine de la formation des cires, une fonctionnant au niveau des 5 à 6 premières feuilles, l'autre fonctionnant pendant toute la durée du cycle de la plante (Bianchi *et al.*, 1985). Ceci conduit aux deux phénotypes différents : glaucescence bleutée pour les feuilles jeunes et aspect brillant pour les autres feuilles. Lorsque certaines mutations affectent les gènes codant pour les enzymes de synthèse des cires des premières feuilles, celles-ci expriment le caractère *glossy* chez les plantes homozygotes au locus impliqué. Vingt locus pouvant affecter la quantité et la qualité des cires épicuticulaires des jeunes feuilles de maïs ont été identifiés (*gl1, gl2, gl3, gl4, gl5, gl6, gl7, gl8, gl9, gl11, gl14, gl15, gl17, gl18, gl19, gl20, gl21, gl22, gl23, zb7*) (Schnable *et al.* 1994).

4. Doublement du stock chromosomique des plantes haploïdes

Les plantes haploïdes ainsi détectées vont se développer normalement, mais pour une

large majorité, elles seront stériles. En effet, une plante haploïde possède le nombre de chromosomes du gaméophyte de la même espèce. La garniture chromosomique d'une plante haploïde ne permet pas le déroulement normal de la méiose. Si l'on émet l'hypothèse d'absence d'un appariement entre chromosomes hétérologues et d'une distribution indépendante des 10 chromosomes lors de l'anaphase de la division réductionnelle de la méiose, la probabilité d'observer la migration de l'ensemble des chromosomes à l'un ou l'autre des deux pôles est de $2 \times (1/2)^{10}$. La probabilité d'obtenir une microspore équilibrée est de 1/512. Elle est de 1/1024 pour obtenir une macrospore équilibrée. Cependant, lors de la méiose mâle de plantes haploïdes de maïs, Ford (1952) observe un excès de migrations unipolaires (1/58) par rapport au nombre attendu dans le cadre d'une distribution binomiale.

4.1 La diploïdisation spontanée

De nombreux auteurs font état d'une fertilité partielle voire totale concernant jusqu'à 10% des plantes haploïdes de maïs (Chase, 1952; Seaney, 1955; Yudin et Khvatova, 1966; Lashermes, 1987). Cette restauration de la fertilité est due à une diploïdisation survenue dans la lignée des cellules germinales, mais elle semble dépendre du contexte génétique et de l'environnement. Il semble qu'au niveau de la méiose femelle, la fertilité soit restaurée à un taux très supérieur à ce qui est attendu avec la migration indépendante des chromosomes. En effet, en apportant en masse du pollen issu de plantes diploïdes sur des épis de plantes haploïdes, Chase (1969), puis Chalyk (1994) obtiennent, pour environ 50% des épis, un nombre de grains variant de 1 à 50 environ. Ces résultats étant insuffisants, un traitement "diploïdisant" est donc nécessaire pour restaurer la fertilité mâle d'un nombre conséquent de plantes haploïdes.

4.2 Le doublement induit

Lashermes (1987) note que l'application d'un traitement à la colchicine par absorption racinaire au stade plantule provoque une amélioration sensible de la fertilité mâle (Figure I.14). Selon le mode de traitement appliqué, il obtient de 30 à 50% de floraison mâle. Certaines études récentes font état d'une certaine efficacité de l'oxyde nitreux (Kato, 2002). Le recours à l'autofécondation pour l'obtention d'une descendance (au moins un grain par plante) deviendra alors possible.

5. Obtention d'une descendance = lignée strictement homozygote

L'obtention de grains à partir des plantes haploïdes traitées à la colchicine est conditionnée, non seulement par la réussite du doublement du stock chromosomique, mais

aussi par les conditions de culture.

Lors d'une étude, Lashermes (1987) obtient les résultats suivants : à partir de plantes haploïdes traitées à la colchicine, 30 à 50% émettent du pollen et seulement 12 à 15% produisent des grains. Il note que les conditions de culture des plantes haploïdes sont capitales pour l'obtention de grains. Selon le matériel génétique traité et malgré une bonne production de pollen, des difficultés liées aux conditions de cultures, peuvent aller parfois jusqu'à rendre impossible la réalisation des autofécondations des plantes haploïdes pour l'obtention de descendances.

6. Avancées du laboratoire et points à améliorer

Au début des années 1990, à la suite des travaux et études réalisés sur les différentes techniques d'obtention de lignées haploïdes doublées, le croisement intraspécifique avec un génotype inducteur de la gynogenèse semblait être, sous réserve de certains aménagements, la technique d'haploïdisation la plus intéressante du point de vue du sélectionneur. Les travaux de Lashermes et Beckert (1988) avaient permis d'améliorer de façon importante le niveau d'induction de la gynogenèse et les étapes conduisant à la lignée haploïde doublée. Malgré ces avancées significatives, certains points au niveau des différentes étapes devaient être améliorés pour permettre une utilisation à l'échelle du sélectionneur :

- **Induction des plantes haploïdes**

L'héritabilité du caractère "induction gynogénétique" est importante. La lignée WS14, obtenue à Clermont-Ferrand a été sélectionnée à partir de 56 familles F₃ issues du croisement W23ig x Stock6. Elle permet la production de 2 à 5% d'individus haploïdes gynogénétiques, mais sa faible valeur propre limite sa fertilité : peu de pollen émis et peu de grains produits par plante. Ceci engendre des problèmes d'utilisation à grande échelle, d'une part pour les croisements inducteurs au champ et d'autre part pour l'auto-entretien et la production de quantités suffisantes de semences de la lignée elle-même. Il est donc nécessaire de sélectionner un inducteur de meilleure valeur propre.

- **Identification des plantes haploïdes**

Les marqueurs génétiques dominants, intégrés chez l'inducteur, ne sont pas opérationnels sur l'ensemble de la variabilité génétique utilisée par les sélectionneurs et suffisamment fiables. De façon à pallier ces inconvénients, un caractère récessif peut être utilisé. Le recours au caractère *glossy*, déjà présent chez quelques lignées élites et qui n'a pas semblé présenter d'inconvénients majeurs au niveau de la valeur agronomique, peut être

envisagé. Cependant, afin d'exploiter une large variabilité, il est nécessaire de constituer une large collection de matériel spécifique, "marquée" avec ce caractère.

- **Doublement chromosomique des plantes haploïdes**

Les taux bien trop faibles ou nuls de diploïdisation spontanée observés, en général, nécessitent le recours à un doublement induit des chromosomes. Les protocoles d'application du traitement à la colchicine par absorption racinaire au stade plantule, expérimentés par Lashermes (1987) ont montré une bonne efficacité. Le traitement à une concentration de 0,10% de colchicine, pendant une période d'immersion de 6 heures, est efficace et assez compatible avec une utilisation pratique pour de petits échantillons de plantes haploïdes. Toutefois, avec une durée de traitement de 6 heures, si l'on intègre le temps de conditionnement des plantes avant et après, le nombre de plantes traitées dans une journée sera limité. De plus, l'expérimentation a été réalisée à des stades végétatifs précis qui sont difficiles à respecter lorsque la population travaillée présente une grande variabilité. La mise au point d'un protocole présentant une plus grande souplesse d'utilisation est donc nécessaire.

- **Obtention d'une descendance : au moins un grain par plante haploïde**

Des conditions de culture optimisées par la limitation des différents stress lors des périodes de végétation sont à définir. Les paramètres importants tels que périodes et conditions de culture doivent être fixés.

C : Conclusions de la synthèse bibliographique et objectifs de l'étude

1. Conclusions de la synthèse bibliographique

Le type de variété de maïs le mieux adapté à la grande culture est l'hybride. Le catalogue officiel français des variétés est composé pour une grande majorité d'hybrides simples F_1 , le reste étant des hybrides 3 voies. Il est renouvelé chaque année à environ 20%. Ces hybrides sont homogènes et reproductibles. Ils résultent de croisements entre lignées pures (quasi homozygotes), sélectionnées pour leur aptitude à la combinaison, selon un schéma conduit en parallèle et de façon réciproque entre deux groupes complémentaires ou hétérotiques. La fixation des caractères, qui est une étape clé de l'amélioration des plantes, nécessite huit à dix générations d'autofécondations, amenant à 10 ans la durée pour la création d'une nouvelle variété.

L'haplodiploïdisation peut intervenir et apporter un progrès dans différents domaines de l'amélioration du maïs :

- elle permet de réduire la durée de fixation absolue des caractères des lignées, ce qui accélère :
 - le processus de création variétale,
 - l'évaluation de la valeur en lignées d'une population de départ,
 - la production de lignées parfaitement homozygotes;
- elle peut améliorer l'efficacité de la sélection récurrente;
- elle peut faciliter l'analyse génétique des caractères et les études de génomique, les HD qui représentent les gamètes, permettant un accès direct aux produits de la méiose;
- elle permet de simplifier la sélection conservatrice.

Toutefois, pour être opérationnelle à une échelle industrielle, cette méthode doit remplir les conditions suivantes :

- facilité de production de lignées quel que soit le génotype utilisé,
- pas de biais de sélection défavorable par rapport à la voie de la fécondation,
- moyens mis en jeu et coûts comparables aux méthodes conventionnelles.

De plus, d'un point de vue génétique, par rapport à la voie de l'autofécondation, le nombre réduit d'étapes de recombinaisons peut avoir des conséquences sur la variation génétique des caractères.

Quelques résultats expérimentaux

Chez un certain nombre d'espèces de grande culture : orge, blé, riz l'haplodiploïdisation est utilisée en routine dans les schémas de sélection pour fixer des lignées pures. Certaines différences entre lignées HD obtenues par diverses méthodes et/ou lignées dérivées par autofécondations ont pu être notées.

Pour la sélection des meilleures lignées, chez le blé et l'orge, les lignées les plus performantes pour chaque méthode de fixation : SSD, HD par culture d'anthères et HD par croisements interspécifiques, ont des rendements en grains comparables (Mitchell *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1999).

Malgré des moyennes en général assez similaires entre les populations de lignées obtenues par différentes voies, certaines différences ont pu être observées.

Chez l'orge, pour le rendement, la hauteur des plantes et la date de floraison, Park *et al.* (1976), observent des différences entre HD obtenues par croisements avec *Hordeum bulbosum* et par SSD. Ils attribuent ces différences à un biais de sélection lié au mode de production des SSD. Pour le rendement, Rossnagel *et al.* (1987) ne trouvent pas de différences entre HD obtenues par culture d'anthères et lignées obtenues par SSD, contrairement à Björnstad *et al.* (1993). Par contre, les premiers observent des hauteurs de plantes plus faibles chez les HD.

Chez le blé, il a été montré des performances significativement différentes entre HD obtenues par culture d'anthères et lignées obtenues par SSD (Baenziger *et al.*, 1989; Mitchel *et al.*, 1992). Les HD sont plus tardives en moyenne (Powel *et al.*, 1992), elles ont un poids de 1000 grains plus faible (Mitchel *et al.*, 1992) et une teneur en protéines plus forte (Bedö *et al.*, 1996). Entre HD obtenues par cultures d'anthères et HD obtenues par croisements avec maïs, Henry *et al.* (1993) observent des différences pour le rendement et les dates d'épiaison. Ma *et al.* (1999) observent que les lignées obtenues par SSD sont supérieures aux HD obtenues par culture d'anthères pour le rendement, le poids de 1000 grains et la hauteur des plantes, et supérieures aux HD par croisement avec maïs pour la hauteur de plantes.

Chez le tricale, Charmet et Branlard (1985) observent un poids de 1000 grains des HD par culture d'anthères plus faible que celui des lignées obtenues par SSD.

Chez certaines espèces horticoles comme le piment (*Capsicum annuum* L.), l'asperge (*Asparagus officinalis* L.), l'oignon (*Allium cepa* L.), la chicorée (*Cichorium intybus* L.), la courge (*Cucurbita pepo* L.), l'haplométhode a permis d'obtenir des plantes de qualité

équivalente à celles obtenues par les méthodes conventionnelles (Dumas de Vaultx et Chambonnet, 1986 ; Dumas de Vaultx et Pochard, 1986 ; Doré, 1990 ; Doré et Marie, 1993 ; Doré *et al.*, 1996).

Chez le maïs, à partir du développement de plantes haploïdes spontanées, Chase (1952) sélectionne des lignées HD de bonne valeur agronomique. Pour l'aptitude à la combinaison, en comparant 43 lignées HD à 38 lignées S₅, Thomson (1954) trouve des rendements similaires.

Certains auteurs (Suenaga et Nakajima, 1993 ; Huang *et al.*, 1996), émettent l'hypothèse que les techniques nécessitant une étape de culture *in vitro* pourraient être à l'origine de certaines variations somaclonales ou gamétoclonales observées au niveau du phénotype.

Chez le maïs, il a pu être produit des individus haploïdes en grand nombre par culture d'anthers et par androgenèse et gynogenèse induites *in situ*. L'induction de la gynogenèse *in situ* s'est avérée être la technique dont on a actuellement la meilleure maîtrise pour produire en grand nombre des lignées haploïdes doublées. Toutefois, ces lignées ne devront pas présenter de biais de sélection défavorable, lorsqu'il s'agit d'isoler les meilleurs individus. Elles devront être représentatives d'un échantillon aléatoire des gamètes de la F₁, s'il s'agit de produire des populations de lignées recombinantes de cartographie.

Avec le matériel expérimental utilisé jusque là, il n'a pas été observé de génotypes réfractaires à la méthode d'induction de la gynogenèse et ce système est compatible avec les techniques et moyens habituellement mis en jeu par les sélectionneurs. Il est malgré tout nécessaire de juger : i) de sa faisabilité dans une large variabilité génétique élite utilisée par les sélectionneurs, ii) des conséquences de son utilisation par rapport aux méthodes conventionnelles et enfin iii) de son intérêt pour faciliter les études de génétique.

Parallèlement à cette phase de généralisation et de validation en sélection, un travail d'amélioration de la méthode doit être poursuivi.

2. Objectifs de l'étude

Pour une utilisation à l'échelle d'un programme de sélection, la première étape a consisté à mettre au point la méthode par la création d'un matériel génétique spécifique et à rechercher un protocole simplifié de production de lignées HD.

Une étude théorique de l'impact de l'haplométhode sur la variation génétique des caractères quantitatifs a été réalisée.

Ensuite, un programme de sélection a été conduit à partir d'une population à base

génétique large. Il nous a permis d'évaluer la réponse à la gynogenèse *in situ* de matériel génétique récent et de comparer la sélection avec HD aux méthodes conventionnelles.

- **Optimisation et amélioration de la méthode**

Les étapes clés ont fait l'objet, dans un premier temps, d'un travail de mise au point pour répondre aux contraintes d'une utilisation industrielle. Ensuite, le travail d'amélioration a été poursuivi.

- **Optimisation pour l'étude en sélection**

Pour la production industrielle de lignées HD, l'inducteur d'haploïdes WS14 qui ne présentait pas les qualités agronomiques suffisantes, nécessitait une adaptation.

En l'absence, chez l'inducteur, d'un système permettant l'identification de la totalité des individus haploïdes et afin de réduire les risques de biais provoqués par les haploïdes non identifiés, une variabilité génétique "marquée" avec un allèle récessif devait être constituée.

Un travail d'amélioration pour la mise au point d'un protocole facilité de doublement chromosomique des plantes haploïdes a été entrepris.

- **Poursuite de l'amélioration de la méthode**

Parallèlement à l'étude de l'impact en sélection et afin d'accroître les performances de la méthode, un travail d'amélioration, notamment au niveau de l'induction et de l'identification des plantes haploïdes, a été poursuivi.

- **Génétique quantitative et haplométhode**

Une étude théorique de l'impact de l'haplométhode sur la variation génétique des caractères a été réalisée :

- sur des lignées HD produites à différentes générations : F_1 , F_2 , F_3 , F_6 d'un croisement entre 2 lignées homozygotes,
- sur des lignées HD et SSD issues de familles S_1 d'une population à base large.

Elle nous permettra : 1) de juger de la faisabilité de plans de croisements, permis par la production de lignées HD à différentes générations, pour détecter les déséquilibres de liaison et l'épistasie 2) de déterminer les différences attendues entre les lignées HD et les lignées issues d'autofécondation et 3) de juger de l'importance de la place de l'HD dans un schéma de sélection.

- **Etude expérimentale**

Un programme expérimental, conduit dans des conditions similaires à celles existant chez les sélectionneurs, nous a permis :

- d'évaluer la réponse à la gynogenèse d'une large base génétique élite,
- de comparer, pour différents caractères agromorphologiques, des lignées HD à des lignées SSD et des familles S_1 ,
- de juger de l'efficacité de la sélection récurrente sur lignées HD par rapport à la sélection sur familles S_1 ,
- de tester le plan de croisements permis par la production de plusieurs lignées HD par plante S_0 pour estimer les effets d'épistasie,
- d'évaluer le coût de l'haplométhode par rapport aux méthodes conventionnelles de sélection.

II - MISE AU POINT ET AMELIORATION DE LA METHODE

A partir des avancées précédemment décrites, différents travaux de mise au point de l'haplodiploïdisation par gynogenèse induite *in situ* étaient nécessaires, pour sa diffusion et l'étude de son impact dans les programmes de sélection. La technique doit : i) être généralisable à une large variabilité agronomique utilisée par les sélectionneurs. ii) être utilisable à grande échelle avec des moyens et un coût comparables aux méthodes traditionnelles iii) être suffisamment maîtrisée pour ne pas introduire de biais dans l'analyse de l'impact pour la méthodologie de la sélection.

Ensuite, parallèlement à l'étude méthodologique, le travail d'amélioration de la méthode a été poursuivi, principalement au niveau de l'induction et de l'identification des individus haploïdes.

1. Induction de la gynogenèse

Les qualités requises d'un inducteur d'haploïdes d'origine gynogénétique *in situ* sont :

- une efficacité indépendante du matériel génétique utilisé comme parent femelle,
- un taux d'induction d'haploïdes élevé,
- une production suffisante de pollen,
- une maintenance et une multiplication faciles pour son "auto-entretien".

L'inducteur WS14 ne répondant que partiellement aux trois derniers critères, deux objectifs ont été fixés. Le premier à court terme était une mise au point pour son utilisation au niveau industriel, le second à plus long terme, était la sélection d'un inducteur amélioré.

1.1 Mise au point de WS14 pour une utilisation industrielle

L'inducteur d'haploïdes gynogénétiques WS14, obtenu dans le contexte génétique W23ig x Stock6 à Clermont-Ferrand, a été décrit comme plus performant que Stock6, le plus utilisé jusque là. Toutefois, sa faible émission de pollen provoque des problèmes de fécondation et rend difficile les croisements à l'échelle industrielle. Sa protandrie importante (décalage entre l'émission du pollen et la sortie des stigmates) rend les autofécondations difficiles avec, pour conséquence, une faible production de grains par épi, conduisant à une multiplication difficile. Il n'est pas envisageable de produire des quantités importantes de grains, nécessaires à une utilisation industrielle. Par exemple, pour la réalisation de croisements inducteurs en champ d'isolement, 25 000 plantes de parent mâle par hectare sont nécessaires. De plus, ces plantes doivent être bonnes productrices de pollen. Un travail de

sélection, pour améliorer les différents caractères liés à la valeur propre de WS14, a été engagé.

- **Sélection de FIGH1**

La sélection entreprise à partir d'une famille F₃ du croisement W23ig x Stock6 qui avait permis de dériver WS14 (Lashermes et Beckert, 1988). Cette famille comportait une certaine variabilité au niveau des caractères suivants : vigueur des plantes, nombre de talles fertiles par plante, quantité de pollen produite, taille de l'épi, fertilité. La première étape a consisté en une sélection de 28 plantes présentant les caractéristiques recherchées. Elles ont été autofécondées et testées pour leur aptitude à induire des haploïdes. Ce test a été réalisé sur un hybride simple *glossy* (F1800 x F1801) issu du croisement entre deux lignées dentées, F1800 *glossy* et F1801 *glossy*, sélectionnées à Clermont-Ferrand à partir d'une population d'origine nord-américaine. Le caractère *glossy* permet l'identification de tous les individus haploïdes (Tableau II.1). Les familles issues des 8 plantes ayant présenté la meilleure aptitude à l'induction (2,4 à 3,1 %) ont ensuite suivi deux générations d'intercroisement pour constituer en 1995 l'inducteur FIGH1 (France Inducteur Gynogénétique d'Haploïdes 1). La multiplication de cet inducteur ne se fait pas par autofécondation des plantes, mais par croisement frères-sœurs.

- **Tests d'aptitude à l'induction de FIGH1**

Les tests d'aptitude à l'induction de FIGH1 ont été faits sur différentes lignées de type "corné" d'origine européenne, de type "denté" d'origine nord-américaine et de type "corné-denté".

Les croisements ont été réalisés de façon manuelle à partir d'un mélange de pollen de plantes de FIGH1.

Le taux moyen d'induction obtenu pour l'ensemble des lignées est de 1,1% (Tableau II.2). Il est assez similaire pour les trois types de lignées (1,3, 1,2 et 1,0). La variation à l'intérieur de chaque groupe est assez semblable. Pour l'ensemble des lignées, elle est de 0,2 à 2,7%. Ces taux semblent inférieurs à ceux observés par Lashermes et Beckert (1988) pour WS14 (2 à 5%).

- **Description de FIGH1 et de ses descendance**

Le système de multiplication décrit précédemment fait de FIGH1, non une lignée mais une "population" présentant une légère hétérozygotie donnant aux plantes une certaine vigueur hybride (Figure II.1). Le nombre de talles fertiles est en moyenne de 1,5. Ainsi, avec

la tige principale, le nombre de panicules fertiles par plante est en moyenne de 2,5. Les panicules arrivant à floraison les unes après les autres, permettent une durée de production de pollen d'environ 15 jours, pour une plante possédant 2 talles.

La quantité de grains produite par épi dans les descendances pour la multiplication de l'inducteur, est en moyenne supérieure à 100. Ces grains présentent une forte coloration bleu noir qui est héritée du système génétique de coloration d'un des parents de départ (Stock6). Il s'agit du complexe des allèles *CI RI* dominants (cf A-II.3.3) qui induit une pigmentation anthocyanique au niveau de la couche d'aleurone du grain.

Les épis du matériel induit de façon industrielle en parcelle d'isolement sont très bien garnis, ce qui confirme la bonne production de pollen de FIGH1. De plus, la coloration bleu noir permet de s'assurer de l'absence de fécondations indésirables résultant, soit de pollen extérieur au dispositif, soit de pollen émis par des plantes femelles mal castrées. Ceci se manifeste par la présence de grains de coloration très contrastée (jaune, orangé, blanc). Toutefois, cette vérification ne peut pas être réalisée lorsque le parent femelle possède un inhibiteur de coloration. Cette inhibition se manifeste, soit par l'absence totale de coloration bleu noir (inhibition totale), soit par un gradient de coloration des grains (Figure II.2) allant du bleu au jaune (inhibition partielle).

- **Conclusion**

L'inducteur FIGH1, issu du même fond génétique que WS14, avait des caractères agronomiques suffisants pour envisager une induction de type industriel. Il a, d'une part permis d'engager le programme de sélection pour la comparaison des méthodes, et d'autre part fait l'objet d'une diffusion auprès de 6 firmes de sélection privées dans le cadre d'un partenariat. En revanche, avec un taux d'induction d'environ 1%, légèrement inférieur à celui de WS14, la probabilité d'obtenir au moins une lignée HD par plante de départ est assez faible. Il est donc nécessaire dans un schéma de sélection à partir d'une population à base large, d'appliquer l'haplodiploïdisation, non au niveau d'une plante S_0 , mais au niveau d'une famille S_1 . Ceci rallonge le cycle de sélection. Une amélioration du taux d'induction à un niveau permettant d'obtenir au moins une lignée HD par plante, rendrait possible l'application de l'haplodiploïdisation au niveau des plantes S_0 .

1.2 Amélioration du taux d'induction

Après la mise au point de FIGH1 pour sa valeur agronomique, un des objectifs importants était l'amélioration de son taux d'induction.

- **Sélection de l'inducteur PK6**

Dans le but d'améliorer ce taux, un croisement de départ de sélection a été constitué entre FIGH1 et la lignée MS1334 déjà connue pour son caractère améliorateur. L'hybride MS1334 x Stock6 avait permis d'obtenir un taux d'induction supérieur à la lignée Stock6, elle-même (Lashermes, 1987). A partir de FIGH1 x MS1334, une nouvelle lignée inductrice de troisième génération, plus performante que WS14 et FIGH1 : PK6 (Pollacsek *et al.* non publié), a été sélectionnée en 2000. La sélection a porté sur le critère principal d'induction et sur le critère de valeur agronomique.

Le Tableau II.3 montre une comparaison entre Stock6, WS14, FIGH1 et PK6 pour l'aptitude à induire des haploïdes à partir de différentes lignées, souvent utilisées comme géniteurs de variétés. Le Tableau II.4 indique les taux d'induction obtenus avec PK6 à partir de deux populations, européenne et nord-américaine, de large variabilité génétique. Les taux d'induction obtenus pour PK6, proches de 5% en moyenne, sont supérieurs à ceux des inducteurs sélectionnés jusque là. La sensible différence entre populations et lignées (Tableaux II.3 et II.4) pourrait s'expliquer par une plus forte létalité d'individus haploïdes chez les lignées. Malgré une production de pollen plus faible que celle de FIGH1, PK6 est utilisable à l'échelle industrielle.

- **Sélection de l'inducteur FIGH3**

L'introduction d'une variabilité nouvelle dans le contexte génétique de WS14 a permis avec la sélection de PK6, une augmentation importante du taux moyen d'induction des haploïdes. La question qui se posait alors était de savoir si à partir de PK6, en utilisant de nouvelles sources de variabilité, il était possible d'accroître encore ce taux.

- *Matériel génétique utilisé*

Les lignées CG203, F32 et HD7, croisées avec PK6, ont servi de base de départ de sélection. Les deux premières avaient déjà montré une bonne aptitude propre à induire la gynogenèse (Lashermes, 1987). Elles avaient induit respectivement 0,51 et 0,4% d'haploïdes en croisement avec un hybride simple contre 0% pour la plupart des lignées étudiées. La lignée HD7 avait été sélectionnée par Dieu et Beckert (1986) pour son aptitude à générer des haploïdes par culture d'anthere *in vitro*. L'autofécondation de chaque hybride simple CG203 x PK6, F32 x PK6 et HD7 x PK6 a permis de générer des plantes F₂. Ensuite, environ 50 plantes F₂ par croisement ont été autofécondées.

- *Processus de sélection*

Mise au point et amélioration de la méthode

Le premier test d'induction, est basé sur l'auto-induction qui représente la capacité d'une plante F_2 à générer des haploïdes suite à l'autofécondation. Ces tests sont réalisés sur 1 ligne de 20 plantes F_3 pour chaque famille F_2 . La lecture du test est faite au stade 10 à 12 feuilles, lorsque l'on peut différencier nettement les plantes chétives caractéristiques des haploïdes, des plantes vigoureuses plus développées caractéristiques des plantes diploïdes. Toutes les familles ayant eu au moins une plante haploïde sur les 20 plantées ont été sélectionnées (Tableau II.5). Ce qui représente : une famille pour CG203 x PK6, 8 familles pour F32 x PK6 et 12 familles pour HD7 x PK6. Chaque famille a ensuite été évaluée pour son aptitude à induire des haploïdes en croisement avec F1800 x F1801 (Tableau II.5). Pour CG203 x PK6, la seule famille sélectionnée est faiblement inductrice. A partir des 9 meilleures familles des deux autres croisements, une sélection généalogique a ensuite été engagée. A l'intérieur de chaque famille, un nouveau test d'induction a été réalisé au niveau plante. Par famille, 15 plantes ont été autofécondées et croisées pour un test d'induction avec F1800 x F1801 (Tableau II.6). Pour quelques plantes, le faible nombre de grains obtenus en croisement n'a pas permis d'estimer le taux d'induction. Certaines plantes ont des taux d'induction très forts. Leurs descendances (plantes F_5 en mélange) ont ensuite été estimées à plus grande échelle (Tableau II.7). La meilleure famille (PK6 x F32-4-10) constitue le nouvel inducteur FIGH3, induisant à un taux moyen d'environ 7%.

○ *Remarque*

Ceci confirme un déterminisme polygénique du caractère induction. Il pourrait s'agir, selon une hypothèse émise par P. Barret (communication personnelle) d'un "QTL" (ou d'un gène) à pénétrance incomplète, c'est-à-dire dont le taux d'expression serait dépendant du fond génétique dans lequel il se trouve.

2. Identification des individus haploïdes

En l'absence d'un marqueur dominant de fiabilité totale qui serait présent chez l'inducteur (cf. A-II.3.3), nous avons utilisé les allèles récessifs des gènes *glossy* (cf. A-II.3.4) pour identifier les individus haploïdes à un stade suffisamment précoce qui permette l'application du traitement "diploïdisant" au stade de la plantule. L'intérêt majeur de la méthode étant son application à une large variabilité agronomique utilisée par les sélectionneurs, le caractère *glossy* a été intégré à une base génétique représentative de cette variabilité. Il s'agit de différentes lignées ayant servi de géniteur de variétés, émanant d'établissements publics ou de différentes universités, pouvant être mise à la disposition de

l'ensemble de la communauté des sélectionneurs de maïs.

Le fait de devoir intégrer les marqueurs récessifs *glossy* à la variabilité génétique de départ de sélection peut rallonger de façon importante la durée d'un cycle si l'on procède par rétrocroisements. Afin de pallier cet inconvénient, un travail d'étude pour le "marquage" de l'inducteur avec un gène dominant a été poursuivi.

2.1 Les allèles récessifs des gènes *glossy*

Ces gènes, qui s'expriment à différents niveaux de la voie de biosynthèse des cires épicuticulaires des jeunes feuilles induisent, de façon plus ou moins marquée, le caractère *glossy*. Les allèles *glossy 1 (gl1)*, *glossy 2 (gl2)* et *glossy 6 (gl6)*, qui permettent une bonne expression du caractère, ont été retenus.

- **Les lignées "marquées glossy"**

Le gène *gl1* est situé sur le bras long du chromosome 7, le gène *gl2* sur le bras court du chromosome 2 et le gène *gl6* sur le bras long du chromosome 3. Lors des croisements entre lignées *gl1* et lignées *gl2*, lignées *gl1* et lignées *gl6* lignées *gl2* et lignées *gl6*, les descendance hybrides n'ont pas le phénotype [*glossy*] (Figure II.3).

Les allèles *gl1*, *gl2* et *gl6* ont été intégrés par rétro croisements successifs (*back-cross*) aux principales lignées représentatives des groupes génétiques complémentaires. Les lignées de type "corné" ont été marquées avec l'allèle *gl1*, celles de type "denté-Iodent" avec l'allèle *gl6*, celles de type "Lancaster" et "Stiff Stalk Synthetic" à la fois avec les allèles *gl2* et *gl6*. Par groupe, nous avons retenu un échantillon de lignées les plus utilisées par les sélectionneurs (Annexe 1).

Les rétrocroisements (Figure II.4)

Il s'agit d'intégrer un gène particulier, ici le gène récessif *glossy* présent chez une lignée "donneuse", à une lignée "receveuse" ("récurrente") présentant un intérêt agronomique. L'objectif final étant d'obtenir une lignée "isogénique" de la lignée d'origine, c'est-à-dire ayant retrouvé la presque totalité de son génome et possédant le gène transféré. Le gène *glossy* étant récessif, il est nécessaire de réaliser une autofécondation après chaque croisement avec la lignée récurrente, pour faire apparaître les disjonctions et identifier les plantes le possédant. Pour retrouver environ 99% du génome de la lignée receveuse, 14 générations sont donc nécessaires. Cela représente une durée de 7 ans si l'on utilise les générations de contre-saison. C'est une opération lourde lorsqu'on traite de cette façon un échantillon relativement important de lignées. Ceci explique, en partie, le peu d'engouement manifesté jusque là pour

ce système.

- **Les hybrides à partir de lignées *glossy***

Le "marquage" de chaque groupe des différents couples d'aptitude à la combinaison avec un gène *glossy* différent permet la production d'hybrides *non glossy*. C'est une précaution qui évite un risque, dans le cas où le caractère *glossy*, qui ne s'accompagne pas à priori de défaut majeur, montrerait au cours du temps un lien avec une sensibilité quelconque. L'exemple extrême est l'effet dévastateur qu'a entraîné le cytoplasme Texas. Ce cytoplasme qui induit la stérilité mâle et permet d'éviter les opérations de castration a été très utilisé pour la production de semences dans les années 1970. Il s'est avéré être lié à une sensibilité due au champignon parasite du maïs *Helminthosporium maydis*, race T. Aux Etats-Unis, en 1972, année qui fut favorable au développement de ce champignon, une grande partie de la culture a été détruite et l'utilisation de ce cytoplasme pour la production de semences a été abandonnée.

- **Les populations "marquées *glossy*"**

Afin de juger de l'effet du caractère *glossy* sur la qualité agronomique, des versions *glossy* et "*non glossy*" de populations artificielles ont été comparées. Il s'agit de 2 couples de populations à base génétique très large, constituées de lignées isogéniques, cornées "marquées" et "non marquées" *gl1* d'une part, dentées "marquées" et "non marquées" *gl6* d'autre part selon le plan de croisements représenté à la Figure II.5.

Les populations CGT (Cornée *Glossy1* Tardive) et CNT (Cornée Normale Tardive) d'une part, DGT (Dentée *Glossy6* Tardive) et DNT (Dentée Normale Tardive) d'autre part ont été comparées.

Les versions *glossy* et "*non glossy*" sont très semblables sur le plan agronomique notamment au niveau du rendement (Figure II.6) (Bordes *et al.*, 1997).

Un premier test global d'aptitude à générer des lignées HD a été réalisé (Tableau II.8). Les deux populations présentent la même réponse à l'induction par FIGH1. En revanche, la plus forte sensibilité aux stress du matériel génétique de type corné, bien connue des sélectionneurs, engendre l'obtention d'un plus faible pourcentage de descendances HD. Pour la conduite du programme d'étude de l'haplodiploïdisation en sélection, seul le matériel denté a été retenu. La population C0 de départ du programme a été constituée par l'intercroisement de 48 lignées HD prises au hasard parmi les 74 issues de la population DGT.

Remarque :

La mise au point d'un marqueur *glossy* dominant a pu être réalisée par transgène

(Beckert, comm. pers.). Il s'agissait d'une construction permettant l'expression dominante du caractère *glossy*. Le principe était l'introduction d'une séquence antisens réduisant l'expression d'un gène impliqué dans la voie de biosynthèse des cires épicuticulaires et induisant l'expression *glossy*. Il a pu être observé quelques plantes modifiées exprimant le caractère, mais des travaux complémentaires pour la généralisation de ce système seraient nécessaires.

2.2 Les allèles dominants des gènes de coloration

Afin de pallier l'inconvénient d'introduire préalablement les allèles récessifs dans la variabilité à sélectionner, un travail d'intégration d'un marqueur dominant chez l'inducteur a été entrepris. Deux gènes de coloration dominants ont été retenus : *R-ch* (*Cherry*) et *R-nj* (*Purple embryo marker*) précédemment décrit (cf. A-II.3.3)

En présence du complexe *C2, A1, A2, Bz1, Bz2 (Pl)*, les allèles *R1-ch* ou *r-ch* se manifestent au stade plantule par l'expression d'une forte coloration du joint foliaire de la première et parfois de la seconde feuille (Figure II.7 a). Ce caractère a été introduit par rétrocroisement dans l'inducteur PK6 (Pollacsek, comm. pers.).

L'allèle *R-nj* qui s'exprime au stade du grain, au niveau de l'embryon (Figure II.7 b) et de l'albumen permet d'identifier les haploïdes au stade embryonnaire. Ce système a déjà été proposé par différents auteurs (Nanda et Chase, 1966 ; Greenblatt et Bock, 1967). Une sélection généalogique a été réalisée à partir du croisement entre WS14 et la lignée SWC sélectionnée dans le contexte génétique Stock6 x W23ig par Lashermes et Beckert (1988). SWC qui présentait un taux d'induction équivalent à WS14 avait gardé le complexe *C2, A1, A2, Bz1, Bz2 (C1 R1-nj)* de W23ig. La sélection a été réalisée pour le critère "induction" à partir des plantes qui possédaient le caractère *R-nj*. Un nouvel inducteur FIGH2, possédant le marqueur dominant *Rn-j* et induisant le développement de la gynogenèse à un taux évalué sur quelques familles à 7%, a été sélectionné.

3. Doublement chromosomique pour restaurer la fertilité

Le taux de 10% de diploïdisation spontanée annoncé dans la littérature, pouvait être le moyen le plus performant pour réussir les autofécondations des plantes haploïdes. On évitait ainsi un traitement à la colchicine et deux manipulations de repiquage des jeunes plantes qui provoquent un stress et réduisent la production de grains par épi.

3.1 Doublement spontané

Une évaluation des doublements chromosomiques spontanés d'haploïdes obtenus dans

les populations CGT et DGT a été réalisée.

Au niveau de l'inflorescence mâle (Tableau II.9), quelle que soit l'origine génétique du matériel végétal, le doublement spontané évalué par la présence de pollen dans une panicule mâle au stade de la floraison est nul. Nous avons pu noter sur quelques plantes, la présence d'étamines filiformes, mais il n'y a jamais eu déhiscence avec libération de pollen. Ces résultats infirment les chiffres annoncés par plusieurs auteurs. Ces différences peuvent être liées au matériel génétique et/ou aux techniques de culture utilisées (action d'un stress quelconque inhibant ou provoquant un doublement spontané).

Au niveau de l'inflorescence femelle, la fertilité a été évaluée après pollinisation de plantes haploïdes par une lignée qui produit beaucoup de pollen, issue de CGT (Tableau II.10). Ces plantes haploïdes sont dérivées de différents croisements F_1 de lignées issues de la population DGT. Sur les 308 plantes ayant subi une pollinisation, 205 soit plus de 66% sont fertiles. La quantité moyenne de grains produits par épi est d'environ 14 grains.

Malgré une bonne fertilité des inflorescences femelles, l'absence de doublement spontané au niveau de l'inflorescence mâle nous a amené à utiliser le traitement à la colchicine avec le mode le plus performant décrit par Lashermes (1987) : l'immersion des racines.

3.2 Doublement induit par la colchicine

Pour la généralisation du système, un des objectifs étant la souplesse d'utilisation, nous avons souhaité fixer des limites de validité du protocole pour le "temps de trempage" et le "stade de traitement". Les contraintes pratiques liées à un temps de trempage trop long, une précision trop fine des stades physiologiques des plantules ou des équipements lourds pouvaient être des freins importants à la vulgarisation du système. On peut se placer dans l'hypothèse logique correspondant à un travail à l'échelle du sélectionneur, d'un module de 500 plantes haploïdes à traiter par 2 personnes. A la durée de trempage de 6 heures, si l'on ajoute les opérations de préparation et conditionnement des plantes avant et après traitement, la durée totale de l'opération dépassera 12 heures. D'autre part, la variabilité du matériel génétique d'une population de plantes haploïdes ne permet que la détermination d'un stade physiologique moyen (5-6 à 7-8 feuilles visibles).

Nous avons souhaité simplifier le protocole décrit par Lashermes (1987) et l'adapter à une utilisation pratique. Nous avons augmenté la concentration de colchicine et réduit le temps de trempage, d'une part, et tester une plage relativement large de stades physiologiques pour l'application du traitement, d'autre part.

3.3 Expérimentation de protocoles de doublement

Afin de limiter l'utilisation d'équipements importants tels que étuve et/ou chambre climatisée, nous avons modifié certaines opérations relativement lourdes utilisées dans les protocoles de base. Par exemple, pour accroître la transpiration de la plante et favoriser l'absorption de la solution, plusieurs techniques avaient été utilisées : "préfanage" des plantules, mise à l'obscurité 24 heures à 10°C, immersion à 33°C et faible hygrométrie de l'air. Nous les avons remplacées par : i) culture des plantes en atmosphère tempérée de serre (23°C et 50% d'hygrométrie) jusqu'au traitement ii) non irrigation durant 48 heures avant le trempage, ii) réalisation des traitements à une température ambiante d'environ 25°C. L'expérimentation de variantes de traitement a été réalisée selon les modalités suivantes :

- 1) Plantes au stade 5 à 6 feuilles visibles
 - a) 8 heures dans une solution de colchicine à 1g/l
 - b) 3 heures dans une solution de colchicine à 1,5g/l
- 2) Plantes au stade 7 à 8 feuilles visibles
 - a) 8 heures dans une solution de colchicine à 1g/l
 - b) 3 heures dans une solution de colchicine à 1,5g/l

De façon à ne pas traiter de "fausses" plantes haploïdes, le niveau de ploïdie des plantes a été contrôlé systématiquement au cytomètre en flux. La cytométrie en flux permet de distinguer des cellules présentant des niveaux de ploïdie différents.

Les quatre traitements n'entraînent pas de différences marquées tant au niveau de la létalité des plantules qu'au niveau du nombre de plantes produisant du pollen (Tableau II.11).

3.4 Conclusion

La plage d'efficacité du traitement à la colchicine, réalisé en conditions normales de culture en serre, fixe une certaine latitude d'application, compatible avec les modes et techniques de travail utilisés par les équipes de sélection des plantes de grande culture.

Le protocole de traitement utilisé dans la suite de notre expérimentation est :

- stade de traitement : 5 à 8 feuilles
- concentration de colchicine : 1,5 g/l
- non irrigation des plantes 48 heures avant le trempage
- durée de trempage : 3 heures

Ce protocole, permet à deux personnes de réaliser en une journée, les opérations de traitement et de conditionnement d'un module de 500 plantes.

4. Obtention d'une descendance : au moins un grain par plante haploïde

L'effet du traitement diploïdisant ne se manifeste qu'au niveau de quelques massifs cellulaires. D'un point de vue génétique, les plantes sont des chimères constituées d'un sporophyte haploïde possédant quelques massifs cellulaires diploïdes. Cet état haploïde des plantes les fragilise et les rend très sensibles aux stress. Les stress les plus marquants sont essentiellement dus aux températures, notamment au cours de la période encadrant la floraison, soit environ une semaine avant et jusqu'à quelques jours après la fécondation. Des températures trop faibles provoquent, selon leur niveau et la période où elles ont lieu, une absence de sortie des soies, une protandrie trop importante empêchant l'autofécondation, une absence ou une très faible émission de pollen. Des températures trop fortes lors de la période des fécondations provoquent une stérilité du pollen. Tout ceci conditionne la quantité et la qualité des grains qui seront produits par la plante lors de la première génération H -> HD (Figure II.8). Deux variables semblent influencer sur la réussite de cette phase capitale : les périodes de végétation et l'environnement cultural.

4.1 Périodes de végétation

Dans la logistique du processus d'intégration de l'haplométhode en sélection, il pourrait être intéressant de produire les lignées HD en période hivernale sous serre. Deux cultures sous serre de type verre, conduites, une en période hivernale et une en période printemps-été ont été comparées.

Conditions de culture : - chauffage et éclairage artificiels en période hivernale (18°C nuit et 22°C jour +/- 10°C, 60% d'hygrométrie et 550 lux/m²).

- climatisation pendant la période printemps-été (24°C +/- 10°C, 70% d'hygrométrie).

La période la plus performante correspondait à des cultures de printemps avec mises en culture début mars (Bordes *et al.*, 1997). Dans ce cas, les opérations d'autofécondation se déroulent avant les périodes de forte température de fin juin - début juillet.

4.2 Conditions de culture

Différentes conditions de culture en période printemps-été ont été expérimentées. Après traitement à la colchicine, les plantes étaient conditionnées en godets sur paillasse en serre. En mai, elles ont été transplantées dans 3 conditions de culture : i) plein champ, ii)

"serre tunnel" plastique, iii) serre verre (Tableau II.12). Les risques de gelée au printemps ne permettent pas de culture plus précoce au champ ou sous "serre tunnel" plastique protégée du gel. La culture de plein champ a fait l'objet d'un suivi particulier de type horticole au niveau de l'entretien, des traitements antiparasitaires et de l'irrigation.

La "serre tunnel" plastique est fermée aux extrémités par une toile grillagée permettant une ventilation naturelle. Elle est irriguée par des "asperseurs" situés au dessus des plantes qui provoquent, lors des arrosages réalisés pendant les périodes de fortes chaleurs, une certaine "brumisation" au niveau des plantes. Ceci permet de limiter en partie l'élévation de la température.

Les cultures en serre de type verre et plein champ donnent des résultats équivalents. Ils sont très nettement inférieurs à ceux obtenus dans les conditions de cultures sous "serre tunnel" plastique.

D'un point de vue général, la production sous "serre tunnel" plastique est la plus performante, elle est d'ailleurs la seule technique qui donne un résultat positif avec le matériel de type "corné".

5 Conclusion

Dans une première étape, les améliorations apportées ont permis la mise au point d'un système suffisamment performant et fiable pour permettre une étude de l'impact de l'haplo-méthode en méthodologie de la sélection. L'ensemble des techniques mises au point, les modes opératoires et un certain savoir-faire ont été diffusés aux utilisateurs industriels. Un protocole de production de lignées HD par gynogenèse a été élaboré (Annexe 2).

Ensuite, le travail d'amélioration de la méthode a débouché sur l'amélioration significative du taux d'induction et sur la mise au point de systèmes d'identification plus performants. De nouvelles lignées induisant la gynogenèse ont ainsi pu être diffusées aux utilisateurs industriels : PK6, PK6*R-ch*, FIGH2*R-nj* et FIGH3.

III - GENETIQUE QUANTITATIVE ET HAPLOMETHODE

L'haplodiploïdisation permet de réduire à une ou deux générations, selon la technique utilisée, la production de lignées strictement homozygotes. A partir d'un génotype hétérozygote, les lignées HD sont obtenues après une seule méiose, soit après une seule étape de recombinaison. Cette particularité, qui peut présenter certains inconvénients lorsqu'on cherche à maximiser les recombinaisons ou au contraire certains avantages lorsqu'on cherche à conserver des déséquilibres de liaison, peut être mise à profit pour estimer les effets dus au linkage et à l'épistasie.

1. Les lignées HD

Par rapport aux lignées dérivées par autofécondations répétées, nécessitant 6 à 10 générations selon le degré d'homozygotie souhaité, l'haplodiploïdisation permet l'obtention de lignées strictement homozygotes en une génération de culture. Deux phénomènes peuvent être à l'origine de différences génétiques entre ces deux types de descendance :

i) l'hétérozygotie résiduelle qui subsiste chez les lignées produites par autofécondation, phénomène souvent amplifié par un avantage sélectif des hétérozygotes. En effet, la conduite d'une SSD par exemple, s'accompagne souvent d'une sélection involontaire des plantes les mieux adaptées. En F_6 , pour un taux d'hétérozygotie théorique de 3,13 % (Figure III.1), Jaby, (1996) observe, avec 34 sondes moléculaires un taux de 5,6 %. En F_8 , pour un taux théorique de 0,78 %, Burr et Burr (1991) observent pour 2 populations de maïs des taux de 1,6 et 2,7 %.

ii) la fréquence des génotypes en présence de linkage (liaison entre gènes non homologues). En effet, si deux gènes non homologues sont liés avec un taux de recombinaison c , pour des HD dérivées de F_1 le taux de recombinaison sera de c alors qu'il sera de $\frac{2c}{1+2c}$ pour une SSD (Haldane et Waddington, 1931 ; Snape, 1976).

2. Les lignées HD et la sélection

La valeur variétale d'un génotype est la valeur attendue de toutes les variétés d'un type donné qui peuvent en être dérivées (Gallais, 1990b). Pour les variétés hybrides simples cela correspond à l'aptitude générale à la combinaison (AGC). Dans une population, l'AGC d'une plante S_0 représente l'AGC des lignées dérivables de cette plante.

Il est possible avant la production de lignées HD, d'évaluer l'AGC de plantes S_0 ou de familles S_1 pour sélectionner celles qui rentreront ensuite dans un processus de sélection

récurrente ou de création variétale. Mais, l'évaluation dans un dispositif expérimental, de lignées homozygotes par rapport à l'évaluation de plantes hétérozygotes, permet d'augmenter la variance génétique et de réduire la variance résiduelle. L'héritabilité ainsi augmentée permet une meilleure efficacité de la sélection sur lignée HD. Ces éléments devront être pris en compte dans le choix d'une méthode lors de la définition d'un programme de sélection.

3. Modélisation de la variation génétique

Chez le maïs, les variétés cultivées sont des hybrides et seule la variation des caractères pour la "valeur hybride" sera considérée ici. L'aptitude à la combinaison d'un génotype est représentée par la valeur de l'hybride issu du croisement entre ce génotype et une lignée appartenant à groupe génétique complémentaire. Nous considérerons que pour l'évaluation de l'aptitude à la combinaison, tous les génotypes sont croisés à une même lignée, prise comme "testeur commun".

Du point de vue de l'analyse de la variation avec un testeur commun, nous sommes dans une situation où il n'y a pas d'effet de dominance, celle-ci est intégrée dans la valeur de la descendance (Gallais, 1990b).

Si l'on considère deux locus avec présence d'épistasie entre ces locus, la variance génétique pour la valeur en test est égale à :

$$\sigma^2_{GT} = \sigma^2_{AT} + \sigma^2_{AAT}$$

σ^2_{GT} est la variance génétique pour la valeur en test, σ^2_{AT} est la variance d'additivité pour la valeur en test et σ^2_{AAT} est la variance d'interaction entre les deux locus qui représente l'épistasie additive x additive pour la valeur en test.

4. L'épistasie

Il peut y avoir épistasie lorsque plusieurs gènes, situés à des locus différents, agissent sur la même voie métabolique et finalement sur le même caractère (Figure III.2). Si l'on considère 2 gènes non homologues, chacun avec 2 allèles (*A-a* et *B-b*) agissant sur un même caractère, 9 génotypes résultant de la combinaison entre les allèles sont possibles. La valeur phénotypique de ces génotypes peut être définie par huit paramètres (Hayman et Mather (1955) :

d_a et d_b qui représentent, respectivement, les différences entre les homozygotes *AA-aa* et *BB-bb*,

h_a et h_b qui représentent les effets de dominance aux deux locus,

i_{ab} qui représente l'interaction entre d_a et d_b ,

$j_{a/b}$ et $j_{b/a}$ qui représentent respectivement les interactions entre d_a et h_b et d_b et h_a ,
 l_{ab} qui représente l'interaction entre h_a et h_b

Les phénotypes associés aux 9 génotypes sont indiqués Figure III.3. Les interactions peuvent être positives négatives ou nulles. Les plus importantes, celles de type complémentaire ou dupliqué peuvent être définies de la façon suivante (Mather, 1967) : lorsque l'on pose $d_a = d_b = h_a = h_b = i_{ab} = j_{a/b} = j_{b/a} = l_{ab}$, *AABB*, *AaBB*, *AABb* et *AaBb* ont le même phénotype de même que *aaBb*, *AAbb*, *Aabb*, et *aabb*. La ségrégation 9:7 indique une épistasie de type complémentaire. Si l'on pose $d_a = d_b = h_a = h_b = -i_{ab} = -j_{a/b} = -j_{b/a} = -l_{ab}$, tous les phénotypes sont les mêmes sauf *aabb*, ce qui conduit à une ségrégation 15:1, indiquant une épistasie de type dupliqué.

Pour les individus hétérozygotes, les effets d'interaction entre deux locus peuvent être définis par : l'épistasie additive x additive (entre 2 gènes non homologues), l'épistasie additive x dominante (entre 2 gènes homologues et un gène non homologue), l'épistasie dominante x dominante entre 2 gènes homologues et 2 gènes homologues. Dans le cas de l'aptitude à la combinaison avec un testeur commun où l'effet de dominance est intégré à la valeur en test, le seul type d'interaction considéré est l'épistasie additive x additive pour la valeur en test (Gallais, 1990b).

5. Linkage et épistasie dans les populations F₂ ou F₂-dérivées

Soit un génotype hétérozygote issu du croisement entre 2 lignées pures, 2 locus considérés avec 2 allèles, *A-a* et *B-b*, les gamètes issus de la génération F₁ sont : *AB*, *Ab*, *aB* et *ab*. En croisement avec une lignée prise comme testeur dont les gamètes sont *mn*, les génotypes obtenus à partir des parents sont : *AmBn*, *ambn*. A partir des gamètes de la F₁, les génotypes sont : *AmBn*, *Ambn*, *amBn*, *ambn*. On peut considérer que le testeur a un effet constant et que les différences entre les valeurs des génotypes sont seulement attribuables aux gamètes issus de la population en ségrégation.

Soit μ l'action moyenne des gènes, d_a la moitié de la différence *Am-am*, d_b la moitié de la différence *Bn-bn* et i_{ab} l'épistasie additive x additive aux deux locus, les paramètres peuvent être définis par :

$$\mu = (AmBn + Ambn + amBn + ambn)/4$$

$$d_a = (AmBn + Ambn - amBn - ambn)/4$$

$$d_b = (AmBn - Ambn + amBn - ambn)/4$$

$$i_{ab} = (AmBn - Ambn - amBn + ambn)/4$$

La valeur des génotypes est alors :

$$AmBn = \mu + d_a + d_b + i_{ab}$$

$$Ambn = \mu + d_a - d_b - i_{ab}$$

$$amBn = \mu - d_a + d_b - i_{ab}$$

$$ambn = \mu - d_a - d_b + i_{ab}$$

La moyenne de la population est donc dépendante de la fréquence des différents génotypes. Si les gènes sont indépendants, quelle que soit la génération de multiplication en panmixie considérée et en l'absence de sélection, les fréquences des génotypes multilocus seront identiques. Les moyennes et les variances des descendance à différentes générations seront donc identiques.

5.1 Effets du linkage

Si les gènes sont en situation de linkage, les fréquences des génotypes multilocus seront différentes, les premières générations seront composées de fortes fréquences de génotypes parentaux. Dans ce cas, les génotypes seront dits en déséquilibre de liaison. Leur fréquence sera dépendante du degré de liaison entre les gènes et du nombre d'étapes de recombinaisons rompant cette liaison. Le degré de liaison, ou coefficient de linkage, est défini par la probabilité de tirer, chez un individu, deux gènes non homologues dérivant d'une même association gamétique ancêtre. Il est égal à $1-2c$, c représentant la probabilité de recombinaison entre ces gènes (Schnell, 1961). Le coefficient de linkage ($1-2c$) sera compris entre 0, s'il y a indépendance, et 1, s'il y a liaison absolue.

Si on considère **A** et **B** les allèles favorables (+ et +) et **a** et **b** les allèles défavorables (- et -), les associations gamétiques **AB** et **ab** seront dites en "coupling" d'effets (++) et (--), les associations de type **aB** et **Ab** seront dites en répulsion d'effets (-+) et (+-). Si l'on considère une dominance complète, des effets équivalents pour les deux locus et 1 la valeur arbitraire d'un allèle alors : ++ = 2, -- = - 2 et -+ = 0. La variance sera maximale lorsque l'ensemble des génotypes sera en situation de coupling, **AmBn** et **ambn** et elle sera minimale lorsque l'ensemble des génotypes sera en situation de répulsion, **Ambn** et **amBn**. Un nombre important de gènes, impliqué dans le déterminisme d'un caractère quantitatif, peut conduire selon les fortes fréquences de phases de coupling ou les fortes fréquences de phases répulsion, aux distributions représentées Figure III.4.

En l'absence d'épistasie entre les gènes liés, le linkage n'aura pas d'effet sur la moyenne. En revanche, en présence d'épistasie entre les gènes liés, le linkage aura aussi un effet sur la moyenne. Au cours des générations, les étapes de recombinaisons qui feront varier la fréquence des différents génotypes, induiront une modification de la variance de la population et de sa moyenne en présence d'épistasie entre les gènes liés.

5.4 Sens de variation de la moyenne sous l'effet du linkage en présence d'épistasie

On peut estimer l'évolution des effets d'épistasie au niveau des moyennes de populations de lignées haploïdes doublées issues de générations F_1 , F_2 , F_3 et F_6 , pour deux locus considérés. Avec des allèles soit en "coupling", soit en répulsion chez les parents, deux cas peuvent être considérés : i) avec interaction dupliquée et ii) avec interaction complémentaire. Avec une interaction de type dupliqué, les haplotypes (combinaisons d'allèles sur un même chromosome) AB, Ab et aB (présence d'au moins un allèle favorable) auront un effet favorable sur la moyenne; avec une interaction de type complémentaire (présence des deux allèles favorables), seuls les haplotypes AB auront un effet favorable sur la moyenne. La variation de la fréquence des génotypes, induite par les recombinaisons, fera donc varier la moyenne des populations.

- **Estimations des effets à différentes générations**

Calcul des fréquences des différents génotypes :

On peut considérer par exemple des allèles en phase de coupling chez les parents, c'est-à-dire AB et ab. Les gamètes obtenus à partir de la F_1 , qui représentent la population de lignées HD sont, AB et ab les associations parentales, Ab et aB les associations issues de recombinaison lors de la méiose. Si c est le taux de recombinaison et n la génération considérée alors les fréquences des génotypes seront, pour AB par exemple :

$$f_{ABn} = (1-c)(f_{ABn-1}) + c p_A p_B$$

Estimation des effets d'épistasie à différentes générations :

Si on pose 1, la valeur des génotypes avec un effet d'épistasie favorable sur la moyenne et 0 la valeur des génotypes sans effet d'épistasie, les écarts entre les effets moyens à différentes générations peuvent être estimés. Avec des allèles en coupling ou en répulsion chez les parents, pour différents taux de recombinaison, à partir des fréquences théoriques calculées des génotypes à chaque génération, ces effets sont représentés Figure III.5. Les

linkages avec allèles en couplage et épistasie complémentaire, font varier la moyenne dans le même sens que les linkages avec allèles en répulsion et épistasie dupliquée : Moyenne $HD_{F1} > \text{Moyenne } HD_{F2} > \text{Moyenne } HD_{F3} > \text{Moyenne } HD_{F6}$. Les linkages avec allèles en couplage et épistasie dupliquée, font varier la moyenne dans le même sens que les linkages avec allèles en répulsion et épistasie complémentaire : Moyenne $HD_{F1} < \text{Moyenne } HD_{F2} < \text{Moyenne } HD_{F3} < \text{Moyenne } HD_{F6}$. Pour les deux types d'association, les écarts maximaux entre les moyennes se situent à des taux de recombinaison voisins de 0,20. Pour un taux de recombinaison de 0,25, les effets sont indiqués Tableau III.1. Avec épistasie complémentaire, la faible fréquence des génotypes associant les deux allèles favorables, induit de relativement faibles effets sur la moyenne. Dans le cas d'une épistasie dupliquée, la plus forte fréquence des génotypes possédant au moins un allèle dominant, induit des effets moyens plus importants. Les effets sont les plus importants pour les associations en répulsion chez les parents. Avec épistasie dupliquée, la comparaison entre les effets moyens à différentes générations est indiquée Tableau III.2. La différence la plus importante entre la moyenne des parents et la moyenne de la génération F1 est de 20% pour des associations en couplage. Entre les générations F1 et F2 la différence est proche de 10%. Après la génération F2, les recombinaisons supplémentaires affectent peu la moyenne des populations.

Le test de présence d'épistasie par la comparaison des moyennes entre les parents et la génération F1, entre les générations F1 et F2, F1 et F6 (équivalente à une SSD) semble envisageable sous certaines conditions :

- D'une part, au niveau de la structure génétique de la population initiale : plusieurs linkages, avec associations d'allèles manifestant des effets d'épistasie, qui agissent dans le même sens et représentent une proportion significative de la moyenne par rapport aux effets additifs. En effet l'épistasie totale est la somme des effets positifs et négatifs agissant sur le déterminisme du caractère. Pour les caractères déterminés par un grand nombre d'allèles et donc certainement un grand nombre de linkages, s'il y a équilibre entre les associations agissant positivement et celles agissant négativement, les effets s'annuleront.

- D'autre part, au niveau de l'estimation des moyennes des populations, les intervalles de confiance devront être suffisamment réduits pour permettre la mise en évidence de différences relativement faibles. Pour cela, l'effectif des populations devra être très important.

- **Résultats de simulations**

Riggs et Snape (1977) utilisent des populations de 500 individus pour mettre en

évidence des effets d'épistasie à partir d'une simulation dans laquelle ils comparent les moyennes de lignées SSD à celles de lignées HD issues d'une même F_1 .

Les conditions expérimentales hypothétiques étaient les suivantes :

* 8 locus considérés avec hétérozygotie aux 8 locus en F_1 , 500 SSD et 500 HD produites à partir de la F_1 .

* 2 types d'associations pour les 8 locus : 1) deux groupes de linkages de 4 locus et 2) un groupe de linkage de 8 locus.

* 3 types de liaisons avec des taux de recombinaison de : 0,45, 0,25 et 0,05.

* 3 types d'associations d'allèles : 1) tous les locus en phase de couplage, 2) tous les locus en phase de répulsion et 3) une situation intermédiaire avec 4 locus en phase de couplage et 4 locus en phase de répulsion.

* 2 types d'actions : 1) effets additifs avec dominance complète des allèles dominants et 2) effets additifs avec dominance complète des allèles dominants et interaction complémentaire pour les allèles dominants.

* le calcul était réalisé à partir d'une moyenne arbitraire de 10, d'un effet additif de 0,5, d'un effet de dominance de 0,5 et d'un effet d'interaction entre 2 locus homozygotes de 0,5.

* l'erreur standard de la différence était représentée par $\sqrt{\frac{VarSSD + VarHD}{500}}$.

Les résultats obtenus ont été les suivants :

Le Tableau III.3 reprend les données de Riggs et Snape (1977) présentées en pourcentages de la moyenne générale (10).

Pour tous les allèles en phase initiale de couplage où les moyennes attendues étaient : moyenne SSD < moyenne HD, seule la différence pour un groupe de linkage de 8 locus, au taux de recombinaison de 0,25, s'est montrée significative.

Pour tous les allèles en phase initiale de répulsion où les moyennes attendues étaient : moyenne SSD > moyenne HD, la différence pour les deux groupes de linkage de 4 locus et pour le groupe de linkage de 8 locus aux taux de recombinaison de 0,25 et 0,05 s'est montrée significative.

Pour les allèles en phase initiale intermédiaire couplage-répulsion, où les moyennes étaient attendues équivalentes, une différence significative a malgré tout été observée pour le

groupe de linkage de 8 locus, au taux de recombinaison de 0,25. Avec des populations importantes le biais d'échantillonnage peut donc parfois être supérieur à l'effet d'épistasie.

- **Résultats expérimentaux**

Chez l'orge de printemps, à partir de la comparaison entre les moyennes de populations de lignées HD issues de F_1 , F_2 , F_3 et d'intercroisements de F_2 , Snape et Simpson (1981) détectent des effets d'épistasie pour 3 caractères : nombre de grains par épi, poids de grains par épi et nombre d'épis par plantes.

5.5 Evolution de la variance sous l'effet du linkage

Si on pose $d_a = d_b = 1$, on peut de la même façon déterminer le sens d'évolution de la variance de populations de lignées haploïdes doublées au cours des générations F_1 , F_2 , F_3 et F_6 , sous l'effet du linkage en l'absence d'épistasie (Figure III.6). Avec les allèles en couplage l'évolution va dans le sens : Variance $HD_{F_1} > \text{Variance } HD_{F_2} > \text{Variance } HD_{F_3} > \text{Variance } HD_{F_6}$. Avec les allèles en répulsion le sens de variation est inversé : Variance $HD_{F_1} < \text{Variance } HD_{F_2} < \text{Variance } HD_{F_3} < \text{Variance } HD_{F_6}$. Comme pour les moyennes, les écarts maximaux dus au déséquilibre de liaison entre les générations, se situent à des taux de recombinaison voisins de 0,20. Les variances dues au déséquilibre de liaison les plus importantes se situent au niveau des situations de couplage chez les parents (Tableau III.4). Pour un taux de recombinaison de 0,25, la différence la plus importante est d'environ 30 % entre les générations F_1 et F_2 (Tableau III.5). Elle est proche de 20% entre F_2 et F_3 et entre F_3 et F_6 . Pour mettre en évidence, par la comparaison de variances, des effets dus au déséquilibre de liaison, il est nécessaire d'avoir des linkages en majorité avec un même type d'association. De plus, avec une statistique de second degré, la nécessité d'avoir un faible intervalle de confiance, suppose des populations d'effectif très important.

- **Résultats de simulations**

Dans l'expérimentation décrite précédemment, Riggs et Snape (1977) simulent une comparaison entre les variances des lignées HD et SSD. Pour les deux types de linkages (2 groupes de linkages de 4 locus et 1 groupe de linkage de 8 locus) aux taux de recombinaison de 0,25 et 0,05, ils observent une différence significative. Lorsqu'ils intègrent dans leur modèle un effet d'épistasie, celui-ci réduit la différence entre les variances. Par rapport au modèle sans épistasie, le niveau de significativité des différences est réduit voire supérieur à 5% dans un cas.

6. Effet du linkage sur les descendance dans une population à base large

Généralement, la sélection à partir d'une population à base large se déroule selon le schéma suivant : i) production de familles S_1 par autofécondations de plantes sélectionnées pour leur valeur propre dans la population ii) première évaluation de l'aptitude à la combinaison au niveau des familles S_1 puis iii) autofécondation et sélection sur la valeur propre à partir des meilleures familles S_1 jusqu'aux générations S_5 ou S_6 où les lignées seront considérées comme quasi homozygotes. L'utilisation de l'haplométrie permet de fixer des lignées directement à partir des S_1 sélectionnées. Dans ce cas, par rapport aux lignées issues d'autofécondation, les lignées HD sont produites après une seule étape de recombinaisons, ce qui peut avoir des conséquences au niveau du déséquilibre de liaison et donc des paramètres génétiques. Afin d'estimer l'importance de ces effets, une étude théorique a été réalisée à partir de descendance obtenues selon le schéma de la Figure III.7. Pour être comparable aux lignées HD, les lignées issues d'autofécondations sont représentées par des SSD (niveau S_5), c'est-à-dire obtenues sans sélection au cours des générations successives.

Une population à base large est généralement constituée par intercroisements d'un nombre relativement important, mais limité de fondateurs. Si l'on suppose deux générations d'intercroisements, il peut donc subsister des déséquilibres de liaison assez importants. Au cours des méioses, deux gènes quelconques non homologues, associés chez les fondateurs, peuvent se maintenir associés plus ou moins longtemps selon leur degré de liaison. En l'absence de linkage physique (pour des gènes indépendants), la probabilité de maintien d'une telle association est divisée par deux à chaque génération de panmixie. D'une façon générale, pour une association quelconque AB, gène A à un locus, gène B à un autre locus, la fréquence f_{ABm} de l'association à une génération m de panmixie est :

$$f_{ABm} = (1-c) f_{ABm-1} + c p_A p_B$$

c est le taux de recombinaison, p_A et p_B les fréquences des gènes A et B,

soit
$$f_{ABm} = g f_{AB0} + (1 - g) p_A p_B, \text{ avec } g = (1-c)^m.$$

g représente alors la probabilité que deux gènes liés au départ chez un fondateur se retrouvent encore liés (associés) chez un individu à une génération m de panmixie. Il s'agit du *coefficient de lien*. En posant $g_0 = 1$, g_m représente la probabilité d'avoir à la génération m , une association réalisée au départ. Pour deux gènes liés physiquement, cela représente la probabilité de transmission au cours des méioses d'un fragment chromosomique : les deux

gènes en cause ont alors la même origine parentale. Ils sont dits liés par descendance (Gallais, 1974), au sens qu'ils ne sont pas indépendants.

6.1 Structure génétique de la population et des descendance HD et SSD

La Figure III.8 montre l'évolution, au cours des générations de multiplication en panmixie, du coefficient de lien pour différentes valeurs du taux de recombinaison. Quand $g = 0$, l'équilibre de liaison est atteint. Avec un nombre plus ou moins grand de générations de panmixie selon le taux de recombinaison, g_m tend vers 0. Au bout de deux générations de panmixie, le degré de dépendance entre gènes non homologues peut encore être assez fort.

Les descendance étudiées sont dérivées à partir de la deuxième génération. Ce sont, des familles S_1 issues de l'autofécondation de plantes S_0 , des lignées HD produites à partir de chacune des familles S_1 et des lignées SSD en F_6 (une par famille).

Pour la valeur en combinaison, on considère que toutes les familles (S_1 , HD et SSD) sont croisées avec un même testeur.

6.2 Effets du déséquilibre de liaison

- Expression de la covariance entre apparentés

Les expressions théoriques de la variance entre familles d'un type donné (S_1 , HD ou SSD) sont celles de la covariance entre individus apparentés car : "*variance entre familles = covariance intrafamille (var inter = cov intra)*". Pour exprimer la variance entre familles, on considère la covariance entre individus "frères" d'une même famille. L'expression générale de la covariance entre apparentés avec consanguinité, déséquilibre de liaison et épistasie est très complexe (Gallais, 1974). Si l'on considère la valeur en croisement avec un testeur, en l'absence d'épistasie, il reste deux paramètres pour exprimer la covariance entre individus apparentés : la variance des effets additifs (var A) et la covariance des effets additifs (cov AA') avec deux locus. La covariance à deux locus entre deux individus apparentés peut s'écrire :

$$\text{Cov XY} = 2 K \text{ var A} + 8 L \text{ cov AA}'$$

K est le coefficient de simple parenté, défini comme la probabilité de tirer deux allèles identiques par descendance ("ibd"), un chez X et l'autre chez Y (Malécot, 1948). L est un coefficient de parenté à deux locus, défini comme la probabilité qu'un gène tiré à un locus chez X soit "*lié par descendance*" à un gène tiré à un autre locus chez Y. Deux gènes non

allèles sont dits liés par descendance (Gallais, 1974) ou équivalent par descendance (e.b.d = *equivalent by descent*) (Cockerham et Weir, 1977) quand ils dérivent, par descendance mendélienne, d'une même association gamétique ancêtre.

- **Sens de la covariance cov AA'**

Cov AA' représente la covariance entre effets additifs de la population (**Pop C₀**) prise comme référence pour définir les effets génétiques et pour définir les états de liaison entre gènes non homologues. Dans le cas de deux locus avec biallélisme (gènes *A* et *a* à un locus, *B* et *b* à un autre locus), on peut donner une expression particulière à cette covariance (Gallais, 1974). Si l'on pose $f_{AB} = P$, $f_{ab} = T$, $f_{Ab} = R$, $f_{aB} = S$, les fréquences des gamètes qui donnent naissance à la génération de référence (donc les gamètes donnés par les fondateurs) alors en l'absence de dominance :

$$\text{Cov AA}' = (PT-RS) a_1 a_2$$

a_1 et a_2 étant les demi-différences des valeurs entre homozygotes à chacun des locus.

On peut, en particulier, considérer des cas extrêmes de liaison :

- si $f_{AB} + f_{ab} = 1$ et $f_{aB} = f_{Ab} = 0$, alors il y a couplage total et cov AA' est positive,
- si $f_{AB} = f_{ab} = 0$ et $f_{aB} + f_{Ab} = 1$, alors il y a répulsion totale et cov AA' est négative.

Dans le cas particulier où la fréquence des allèles *p* et *q* à chaque locus est telle que $p = q = 1/2$, on a alors en couplage $\text{cov AA}' = 1/4 a_1 a_2$, et en répulsion $\text{cov AA}' = - 1/4 a_1 a_2$. Si, de plus, on suppose $a_1 = a_2$, on a $\text{cov AA}' = \pm 1/4 a^2$, ce qui peut alors se comparer aux effets additifs. A un locus, on a, avec $p = q = 1/2$, $\text{var A} = 1/2 a^2$. Dans ce cas, l'expression de la covariance devient :

$$\text{Cov XY} = 2 K a^2 \pm 2 L a^2 \quad (3)$$

Cela montre "qualitativement" que la covariance entre locus peut augmenter ou au contraire diminuer la covariance entre apparentés et donc la variance génétique totale de la population. Cela va dépendre de l'importance des coefficients de parenté *K* et *L*. Cov AA' est positive quand, dans la population initiale, les gènes favorables sont en couplage et négative quand ils sont en répulsion. Cette expression peut être étendue à l'ensemble des associations impliquées par sommation de toutes les paires de locus.

- **Covariances des descendance de la Pop C₀**

Les deux composantes, var A et cov AA', peuvent être estimées pour les variances entre les S₁, entre les HD et entre les SSD. La variance génétique entre les S₁ est égale à la covariance moyenne entre deux individus d'une même famille S₁. La variance génétique entre

les HD est égale à la covariance moyenne entre deux individus d'une même lignée HD. La variance génétique entre les SSD est égale à la covariance moyenne entre deux individus d'une même lignée SSD.

Pour chaque parenté, les coefficients de simple parenté K et de double parenté L peuvent être calculés. L est dépendant de la fréquence des recombinaisons, il peut être estimé si l'on admet un taux moyen de recombinaison pour chaque paire de locus déterminant le caractère.

Calcul du coefficient de simple parenté K

Pour les S_1 , le coefficient de simple parenté est égal à $\frac{1}{2}$. C'est la probabilité de tirer deux gènes identiques chez deux individus d'une S_1 , l'un chez X, l'autre chez Y ; cela revient donc à tirer deux gènes identiques chez la plante S_0 de départ, donc $K = \frac{1}{2}$.

Pour les HD, le coefficient de simple parenté de deux individus HD d'une même famille est évidemment de 1, donc $K = 1$.

Pour les SSD, à l'homozygotie totale, $K = 1$. A une génération n d'autofécondation $K_n = (1 + F_{n-1})/2$ avec $F_{n-1} = 1 - (1/2)^{n-1}$.

Calcul du coefficient de parenté à deux locus L

Pour la covariance entre les individus S_1 , la probabilité de tirer deux gènes liés, un gène chez X à un locus et un gène chez Y à un autre locus est égale à la probabilité de tirer indépendamment deux gènes liés chez l'ancêtre commun A, c'est-à-dire $L = \frac{1}{2} g_{S_0}$ (g_{S_0} étant le coefficient de lien à la génération S_0 – c'est-à-dire, probabilité que 2 gènes liés au départ chez un fondateur soient encore liés au niveau des familles S_0).

Pour la covariance entre les individus HD, on doit considérer l'effet de deux méioses, de S_0 à S_1 et de S_1 à HD, ce qui conduit à

$$L = (\frac{1}{2} g_{S_0}) [1 + (1-c)(1-2c)]$$

Pour la covariance entre les individus SSD, à une génération n d'autofécondation, on doit considérer l'effet des n méioses. La solution à ce problème a été donnée par Gallais (1974) :

$$L = (\frac{1}{2} g_{S_0}) (1 + B_{n-1}), \text{ avec } B_{n-1} = \frac{\lambda/2}{1 - \lambda/2} [1 - (\lambda/2)^{n-1}] \text{ et } \lambda = 1 - 2c, \text{ le paramètre de}$$

liaison défini par Schnell (1961).

Le graphique (Figure III.9) indique les effets théoriques pour diverses générations de

descendances. Il montre qu'entre SSD (F_5) et HD les coefficients L sont très proches. La différence entre $\text{cov AA}'$ SSD et $\text{cov AA}'$ HD, qui est maximale pour un taux de recombinaison de 0,2 (Tableau III.6), n'est que de 3,9%. Elle aura donc un effet très faible sur la variance totale.

6.3 Estimation du DL à partir de S_1 et HD

En l'absence d'épistasie, avec un dispositif expérimental composé de familles S_1 et de descendances HD le rapport des variances, $\text{var HD}/\text{var } S_1$, permet une information sur le déséquilibre de liaison et sur le type d'association. En l'absence de DL, var HD est attendue égale au double de $\text{var } S_1$. En présence de DL, le rapport $\text{var HD}/\text{var } S_1$ est inférieur à 2 lorsque les allèles impliqués sont en situation de couplage, il est supérieur à 2 lorsque les allèles impliqués sont en situation de répulsion. Par exemple, avec un taux moyen de recombinaison de 0,2 et $\text{cov AA}' = 0,5 \text{ var } A$, ce qui correspond à des situations de couplage total et un effet équivalent à chaque locus, le rapport est de 1,8 (Tableau III.6).

6.4 Conclusions

Dans un dispositif de ce type, var HD est attendue très proche de var SSD . L'effet provoqué par la différence du nombre d'étapes de recombinaison n'a pas d'action significative sur la qualité des descendances HD par rapport aux lignées obtenues par autofécondation. Si l'haplodiploïdisation était appliquée dès la génération S_0 , la différence attendue entre var HD et var SSD varierait de 6,1% pour des situations initiales de couplage à 4,5% pour des situations initiales de répulsion. Cette différence est trop faible pour être mise en évidence et cela, d'autant plus, si l'on tient compte de l'incertitude provoquée par la différence due à l'hétérozygotie résiduelle. En réduisant le DL, les deux générations initiales de panmixie suivies d'une ou deux étapes d'autofécondation dans le cas d'haplodiploïdisation respectivement en S_0 et en S_1 , rapprochent les descendances HD et SSD. La comparaison entre les variances génétiques de ces deux populations ne permettra pas de juger de la présence de déséquilibre de liaison dans la population initiale. Un plan de croisements de ce type semble inefficace pour caractériser la structure génétique d'une population synthétique à base large constituée par plusieurs générations d'intercroisements.

7. Estimation de l'épistasie avec plusieurs lignées HD par plante S_0

La production de plusieurs lignées HD par familles S_1 (plante S_0) dans une population, constitue un plan de croisement hiérarchique qui permet une estimation de l'épistasie (Gallais,

1990b).

Dans le cas de la population **Pop C₀** considérée ici, si par familles S₁ plusieurs lignées HD sont produites, l'estimation de l'épistasie peut être réalisée à partir de l'analyse de variance (Tableau III.7). La variance génétique totale (σ^2_{GL}) de l'ensemble des lignées est égale la variance génétique interfamilles S₁ (σ^2_{GLB}) plus la variance intrafamille S₁ (σ^2_{GLW}).

$$\sigma^2_{GL} = \sigma^2_{GLB} + \sigma^2_{GLW}$$

σ^2_{GLB} et σ^2_{GLW} sont estimées directement par l'analyse de variance.

En l'absence d'épistasie, la variance additive (σ^2_A) est estimée directement à partir de la variance interfamilles :

$$\sigma^2_A = \sigma^2_{GLB}$$

En présence d'épistasie, la variance interfamilles est représentée par :

$$\sigma^2_{GLB} = \sigma^2_A + \sigma^2_{AA}$$

σ^2_{AA} est la variance d'épistasie additive x additive au niveau des lignées HD,

la variance intrafamille est représentée par :

$$\sigma^2_{GLW} = \sigma^2_{AL} + \sigma^2_{AAL}$$

D'où l'estimation de σ^2_{AL} et σ^2_{AAL} :

$$\sigma^2_{AL} = 1/2 (3 \sigma^2_{GLB} - \sigma^2_{GLW})$$

$$\sigma^2_{AAL} = 1/2 (\sigma^2_{GLW} - \sigma^2_{GLB})$$

Chez le blé, à partir d'un modèle hiérarchique avec plusieurs lignées HD par plante S₀, Goldringer *et al.* (1997) ont mis en évidence des effets d'épistasie importants pour le rendement et la taille de l'épi, notamment.

8. Sélection récurrente sur lignées HD versus sur familles S₁

Différentes études théoriques ont montré que l'haplodiploïdisation pouvait être très efficace pour l'amélioration de la valeur en lignée des populations pour des caractères quantitatifs tels que le rendement (Bouchez et Gallais, 2000). Son intégration améliore l'efficacité des méthodes de sélection récurrente Griffing (1975). Gallais (1989, 1990a et b) démontre que si l'on considère le progrès par cycle, la sélection sur lignées haploïdes doublées (HD) est plus efficace que sur familles de demi-frères et de pleins-frères, sur descendances de pleins frères et de S₁. De plus, par rapport aux génotypes hétérozygotes, l'évaluation de lignées homozygotes permet l'évaluation du produit final et une estimation directe de la valeur en lignées des populations. Pour l'amélioration de l'aptitude à la combinaison d'une population, l'accroissement de la variance des descendances top cross de

HD par rapport aux descendance top-cross de S_0 ou S_1 , améliore l'héritabilité du dispositif expérimental (Gallais, 1990b).

- **Expression du progrès génétique attendu**

Le progrès génétique par cycle de sélection est donné par l'expression générale suivante (Gallais, 1991) :

$$\Delta G = i (\theta \text{ cov } P_T O_T / \sqrt{\text{var } P_T}) \quad (1)$$

où i est l'intensité de sélection et θ est le degré de contrôle des 2 sexes. $\text{Cov } P_T O_T$ est la covariance parent enfant pour la valeur en croisement, $\text{var } P_T$ est la variance phénotypique.

La covariance parent-enfant est donnée par l'expression suivante (Bouchez et Gallais, 2000) :

$$\text{cov } P_T O_T = (1+F)/2 * \sigma^2 A_T$$

où $\sigma^2 A_T$ est la variance additive pour la valeur en croisement et F est le coefficient de consanguinité des unités sélectionnées.

- **Estimation comparée du progrès sur S_1 et sur HD**

La valeur de F est égale à 0 pour S_1 (car la S_1 représente en fait une plante S_0) et 1 pour HD. Si l'on suppose une même intensité de sélection.

$$\text{Progrès avec } S_1: \Delta G_{(S_1)} = i \sqrt{1} h_F \sigma_{A_T}$$

$$\text{Progrès avec HD} : \Delta G_{(HD)} = \sqrt{2} h_F \sigma_{A_T}$$

avec $h^2_F = (1+F) \sigma^2 A_T / \text{var } P_T$ et $\text{var } P_T = (1+F) \sigma^2 A_T + \sigma^2_{GL}/n + \sigma^2_e/b$

où n est le nombre de lieux et b est le nombre de blocs.

Le progrès par unité de temps est donné par l'expression suivante :

$$\Delta G = (i \sqrt{1+F} h_F \sigma_{A_T})/t$$

Finalement, l'efficacité relative à chaque méthode dépend de 3 paramètres : le coefficient de consanguinité F , l'héritabilité h^2_F et la longueur du cycle. Le coefficient de consanguinité des lignées HD étant le double de celui des familles S_1 (plante S_0), leur variance d'additivité est donc attendue égale au double de celle des familles S_1 . Leur variance résiduelle est attendue plus faible que celle des familles S_1 . Il y aura donc une plus forte héritabilité au niveau des lignées HD. Pour le progrès génétique par cycle, la sélection sur HD est donc supérieure à la sélection sur S_1 . Mais, le paramètre qui affecte la sélection sur HD par rapport à la sélection sur générations précoces (S_0 , S_1 ou S_2) est la longueur du cycle (Gallais, 1993). Si l'on considère le progrès par unité de temps, Strahwald et Geiger (1988) montrent que l'utilisation de générations de contre-saison limite l'intérêt de la sélection récurrente avec HD.

Pour l'utilisation de l'une ou l'autre méthode, la question qui se pose alors est celle du progrès génétique permis par unité de temps. Toutefois, s'il s'agit d'un programme de sélection récurrente pour la création variétale, la création directe par HD de géniteurs de variétés devra être prise en compte dans le choix d'une méthode.

9. Conclusions

D'un point de vue génétique, l'haplodiploïdisation permet d'améliorer les méthodes de sélection et d'étude génétique des caractères quantitatifs chez le maïs.

Par rapport à la voie de la fécondation, il est possible d'agir sur les déséquilibres de liaisons lorsqu'ils sont présents dans une population de départ de sélection. Il est possible d'induire plus ou moins de recombinaisons, par la réalisation de plus ou moins de générations d'autofécondations ou d'intercroisements, avant la fixation des lignées. Le choix pourra être fait si l'on connaît la structure des déséquilibres de liaison. Un stade précoce d'application de l'HD permettra une meilleure conservation des déséquilibres de liaison qu'un stade tardif. L'intégration des marqueurs moléculaires doit permettre une meilleure efficacité de ce système pour la connaissance des déséquilibres de liaison.

Lorsqu'une population à base génétique large est constituée par plusieurs générations d'intercroisements en panmixie à partir de plusieurs fondateurs, il n'y aura que très peu de différences induites par les recombinaisons entre des lignées HD et des lignées issues d'autofécondations.

IV : ETUDE EXPERIMENTALE

Impact de l'haplométhode sur la méthodologie de la sélection du maïs

L'objectif final d'un programme de sélection est, d'une part de sélectionner rapidement la lignée qui permettra de développer de nouvelles variétés commerciales et, d'autre part d'assurer une certaine continuité dans le progrès génétique. Le but de l'étude réalisée ici a pour objectifs de déterminer l'impact de l'intégration de la gynogenèse *in situ* dans les programmes de sélection. Pour cela, l'expérimentation proposée ici est conduite avec l'haplométhode et avec deux méthodes conventionnelles de sélection (SSD et sélection récurrente). Les différents travaux sont conduits avec des moyens comparables à ceux utilisés par les sélectionneurs.

Pour répondre aux différentes questions posées, l'étude réalisée aborde les points suivants :

- réponse à la gynogenèse induite *in situ* d'une variabilité agronomique élite,
- comparaison de la valeur propre entre lignées HD et lignées SSD pour de nombreux caractères agro morphologiques,
- analyse de la variation de caractères agronomiques pour la valeur hybride de lignées HD, de lignées SSD et de familles S_1 . Cette partie est rédigée sous la forme d'un article qui est sur le point d'être soumis à l'une des revues suivantes (Theoretical and Applied Genetics (TAG), Genome, Crop sciences ou Maydica)
- comparaison de la sélection récurrente sur lignées HD à celle sur familles S_1 pour l'amélioration des populations pour le rendement en grains. Cette partie est rédigée sous la forme d'un article publié dans la revue TAG,
- comparaison entre les coûts, de production de lignées par gynogenèse induite et par SSD, de la sélection récurrente sur lignées HD et sur familles S_1 .

1. Matériels et méthodes

1.1 Matériel génétique

Le premier objectif était d'évaluer la réponse à la gynogenèse pour juger de son

efficacité dans la variabilité génétique utilisée actuellement par les sélectionneurs. A cette fin, il était nécessaire de constituer une population à base génétique large. Pour cette étude, le matériel génétique de type corné d'origine européenne aurait pu être retenu, mais il présente une sensibilité naturelle aux stress qui, de plus, peut être amplifiée au niveau haploïde. Afin de réduire les risques de cet ordre, liés aux aléas climatiques de l'année, nous avons retenu le matériel génétique de type denté d'origine nord-américaine, moins sensible aux stress. Une population (POP C₀) a été constituée par deux générations d'intercroisements en panmixie de 48 lignées HD issues de la population DGT (Dentée *Glossy* Tardive) (cf. II.2.2).

A partir de la population POP C₀, 150 plantes ont été autofécondées pour produire 150 familles S₁. A partir des familles S₁, des lignées HD (1 à n par famille) et des lignées SSD (1 par famille S₁) ont été dérivées. Ensuite, un schéma de sélection récurrente sur lignées HD et sur familles S₁ a été conduit (Figure IV.1.1).

Les lignées HD ont été produites selon le protocole décrit en annexe 1. L'inducteur d'haploïdes était FIGH1, mis au point pour une utilisation à l'échelle industrielle (cf. II.1.1).

Les familles S₁ ont été croisées avec FIGH1 pris comme parent mâle, en champ isolé. Afin d'assurer une production de pollen pendant une longue période, l'inducteur a été semé à deux dates successives à 10 jours d'intervalle.

Les lignées SSD de niveau S₅ sont le résultat de 4 générations d'autofécondation à partir des familles S₁. Le passage d'une génération à l'autre s'est fait, sans sélection, à partir de 3 plantes autofécondées sur des lignes de 10 plantes. Un épi pris au hasard sert à constituer la ligne de la génération suivante.

1.2 Méthode expérimentale

- **Dispositif expérimental**

Les différentes comparaisons ont été réalisées en 1999.

Pour la comparaison de la valeur propre, l'implantation des lignées a été effectuée à Clermont-Ferrand (Puy-de-Dôme) selon un dispositif en blocs aléatoires complets à 2 répétitions. Chaque parcelle expérimentale était composée d'une ligne de 4,5 m. L'écartement entre les lignes était de 0,80 m et la densité de culture de 50 000 plantes/ha.

Pour la comparaison de la valeur hybride, l'expérimentation a été conduite dans le réseau expérimental de l'INRA, sur 3 lieux situés dans des zones de culture traditionnelle du maïs. Ils sont représentatifs de 3 groupes de précocité du réseau du Comité Technique Permanent de la Sélection pour l'inscription des variétés au catalogue français. Ce sont : Le

Moulon (Yvelines) qui représente la zone précoce, Clermont-Ferrand qui représente la zone demi-précoce et Lusignan (Vienne) qui représente la zone demi-tardive. L'implantation, dans chaque lieu, a été réalisée selon un dispositif en blocs aléatoires complets à 2 répétitions. Chaque parcelle expérimentale était composée de 2 lignes de 5,50 m et de 0,80 m d'écartement et la densité de culture de 82 000 plantes/ha.

- **Analyse de la variation des caractères**

Pour l'analyse de la variation des caractères agro morphologiques, la variation due à l'effet génotype a été décomposée selon le modèle suivant:

$$Y_{jk} = \mu + b_j + G_k + E_{jk},$$

lorsque l'expérimentation était conduite sur un lieu,

$$Y_{ijk} = \mu + L_i + (b/L)_{ij} + G_k + (GL)_{ik} + E_{ijk},$$

lorsque l'expérimentation était conduite sur plusieurs lieux,

où L est l'effet lieu, b est l'effet bloc, (b/L) est l'effet bloc hiérarchisé au lieu, G est l'effet génotype, (GL) est l'effet d'interaction génotype x lieu et E est la variance résiduelle. Les effets génotype et lieu sont considérés comme aléatoires et l'effet bloc est considéré comme fixé.

2. Réponse à la gynogenèse

La réponse à la gynogenèse a été jugée au niveau des 150 familles S_1 pour les paramètres suivants :

- fertilité des épis obtenus pour juger de l'aptitude à féconder de l'inducteur,
- nombre de plantes haploïdes obtenues pour chaque famille S_1 ,
- nombre de plantes haploïdes émettant du pollen,
- nombre de plantes HD obtenues.

Le bilan des différentes étapes de production de lignées HD est indiqué aux Tableaux IV.I.1, IV.1.2 et à la Figure IV.I.2.

2.1 Résultats et discussion

- **Fertilité des épis**

La fertilité des épis est évaluée par la quantité de grains produite par famille S_1 . Pour les 150 familles, la répartition est la suivante :

- une S_1 : 0 grain,
- 10 S_1 : moins de 100 grains,
- 18 S_1 moins de 300 grains,
- environ la moitié des S_1 , plus de 1000 grains,
- les autres, entre 300 et 1000 grains.

Ces quantités de grains sont équivalentes à celles obtenues fréquemment lors des productions de semences en champ isolé, quel que soit le parent mâle utilisé. Les causes qui peuvent expliquer les faibles productions sont en général, soit l'absence de correspondance entre les dates de floraisons mâle et femelle pour les génotypes très précoces ou très tardifs, soit des fécondations perturbées par un stress lors des périodes de fortes chaleurs, de froid ou de sécheresse.

Ces faibles productions sont indépendantes de l'aptitude à féconder de FIGH1 puisque pour un grand nombre de familles une quantité importante de grains a été obtenue.

- **Réponse à l'induction**

L'identification des plantes haploïdes par la présence du caractère *glossy* est réalisée au stade moyen de 4 feuilles visibles, par brumisation d'eau sur les plantules.

En prenant en compte toutes les S_1 , plus de 90 % d'entre elles ont produit au moins un individu haploïde. Si l'on ne considère que les S_1 pour lesquelles plus de 300 grains, obtenus lors du croisement avec FIGH1, étaient disponibles, alors 98 %, soit presque toutes les familles, ont produit au moins un individu haploïde. La plupart des génotypes répondent donc à l'induction de la gynogenèse par FIGH1. Pour les quelques génotypes ne répondant pas, il peut s'agir, soit d'un effet d'échantillonnage, soit d'une létalité précoce des individus haploïdes au cours de la germination.

Finalement, le pourcentage d'haploïdes par S_1 varie de 0 à 2,2 % et le taux moyen d'induction de FIGH1 est de 0,86 %.

- **Réponse au doublement du stock chromosomique**

Au stade de la plantule, les plantes ont été déracinées puis traitées à la colchicine par trempage des racines jusqu'à la moitié de la gaine de la première feuille (Annexe 2). Les différentes manipulations de plantes et le traitement ont induit un stress suivi d'une létalité pour environ 5 % d'entre elles.

La présence d'étamines fertiles au niveau de la panicule indique qu'il y a eu doublement du stock chromosomique. Près de 80 % des plantes haploïdes identifiées et traitées à la colchicine émettent du pollen. Avec le même protocole, Seanev (1955) obtient 56% et Lashermes (1987), 65%. Avec un protocole modifié, par traitement des semences germées, Deimling *et al.*, (1997), obtiennent 70 %. Les conditions climatiques favorables lors des périodes de culture n'ayant pas engendré de protandrie ou de protogynie trop importante (écart entre floraison mâle et floraison femelle), toutes les plantes fertiles ont pu être autofécondées.

- **Obtention de descendance**

Sur les 1 360 plantes fertiles autofécondées, 775, soit 57 %, ont produit une descendance. Ceci représente près de 45 % du nombre des plantes haploïdes identifiées. A partir de deux croisements différents, Deimling *et al.*, (1997) obtiennent 48,5 et 62,7 %.

Le nombre de grains par épi varie de 1 à 50, il n'est que de 1 à 5 pour environ la moitié des plantes. Ceci pourrait être la conséquence d'une relativement faible vigueur des plantes haploïdes qui serait provoquée par les différentes manipulations nécessaires au traitement à la colchicine (mise à nu des racines, trempage pendant 3 heures dans une solution, puis repiquage en terre).

- **Première multiplication**

Seulement 453 HD sur les 775 obtenues ont pu être multipliées. Afin de ne pas allonger le cycle, la multiplication à contre-saison, a été réalisée en culture de plein champ au Chili. Beaucoup de descendance n'ayant produit que quelques grains n'ont pu être multipliées. Lorsqu'on ne dispose que de quelques grains, cette première multiplication nécessiterait une culture en conditions horticoles, identiques à celles mises en jeu pour la culture des plantes haploïdes.

2.2 Conclusions

La population étant représentative de la variabilité génétique d'origine nord-américaine utilisée par les sélectionneurs, ce travail montre que la gynogenèse *in situ* peut être utilisée à l'échelle industrielle dans les programmes de sélection. Néanmoins, malgré ces résultats très positifs, le rendement du système peut être amélioré pour certaines étapes.

Le taux d'induction d'haploïdes de 0,86 %, relativement faible, nécessite le croisement d'un grand nombre de plantes avec l'inducteur pour la production d'une quantité suffisante de

grains. C'est la raison pour laquelle, si l'on souhaite obtenir au moins une descendance par plante de départ, il est nécessaire de travailler au niveau de familles S_1 plutôt qu'au niveau de plantes S_0 . Cette autofécondation supplémentaire présente deux inconvénients majeurs, d'une part elle allonge la durée d'obtention des lignées HD et d'autre part elle constitue une nouvelle étape de recombinaison qui peut réduire, au niveau des linkages, certains effets d'épistasie ou rompre des associations génétiques favorables. De plus, d'un point de vue pratique, la nécessité de travailler sur une grande quantité de grains, augmente les moyens nécessaires aux étapes de production, de conditionnement et de mise en culture pour l'identification des haploïdes.

Les 80% de doublement du stock chromosomique obtenus indiquent que les protocoles appliqués successivement pour l'identification des plantules haploïdes, le traitement à la colchicine, le conditionnement et la culture des plantes jusqu'à la floraison sont bien adaptés. En revanche, le faible nombre de grains obtenus pour certains épis induit une élimination d'un grand nombre de descendances (322). La faible vigueur des plantes, qui en est une des causes, est la conséquence des diverses manipulations. Celles-ci pourraient être limitées par le traitement des plantes au niveau de la semence germée (Deimling *et al.*, 1997) ou au niveau du plateau de tallage des plantules (Eder et Chalyk, 2002). Ceci permettrait d'éviter la mise à nu des racines. Ce type de traitement nécessite par contre, l'identification des haploïdes dès le niveau de l'embryon.

Ensuite, le rendement de l'étape de première multiplication peut être amélioré. Lorsqu'on ne dispose que de quelques grains, la conduite de la culture devrait être faite en conditions confinées et non stressantes, serre ou chambre climatisée, par exemple.

3. Comparaison entre lignées HD et SSD pour la valeur propre

3.1 Caractères mesurés

Les descendances HD et SSD ont été implantées à Clermont-Ferrand selon un dispositif en bloc complet et 2 répétitions. Elles ont été évaluées pour les caractères agromorphologiques suivants : hauteur des plantes (Ht), hauteur de l'épi (Hé), nombre de feuilles par plante (Nf), nombre de feuilles par plante au dessus de l'épi (Nfé), longueur de la feuille de l'épi (Lof), largeur de la feuille de l'épi (Laf), surface de la feuille de l'épi (Sf), diamètre de l'épi (Dé), longueur de l'épi (Lé), nombre de rangs de l'épi (Nr), nombre de grains par rang

(Ng), longueur des brins de la panicule (Pan), poids de 1000 grains (PMG), date d'émission de pollen (floraison mâle –FM-), date de sortie des stigmates (floraison femelle –FF-).

3.2 Résultats et discussions

Au niveau de la moyenne des populations, il y a une différence entre les populations HD et SSD pour 4 caractères (Tableau IV.1.3). La population SSD est supérieure pour la hauteur des plantes et le poids de mille grains. La population HD est supérieure pour le nombre de rangs par épi et la longueur des brins des panicules. Une hauteur de plantes, supérieure pour les lignées SSD, a déjà été observée, notamment, chez l'orge (Henry *et al.*, 1988; Björnstad *et al.*, 1993) et chez le blé (Ma *et al.*, 1999). Un poids de mille grains, supérieur chez les lignées SSD a déjà été observé chez le blé (Charmet et Branlard, 1985; Mitchell *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 2000). Plusieurs causes ont été évoquées : effets dûs aux recombinaisons, effets négatifs induits par des délétions lors de la régénération des haploïdes ou associations génétiques défavorables entre gènes contrôlant des caractères agronomiques et gènes contrôlant la régénération, sélection involontaire lors de la conduite de la SSD. Dans notre cas, deux phénomènes peuvent expliquer la supériorité des lignées SSD pour la hauteur des plantes et le poids de mille grains: i) il peut s'agir d'une sélection involontaire de plantes de plus grande taille lors de la conduite de la SSD et ii) il peut y avoir un effet hybride provoqué par l'hétérozygotie résiduelle au niveau des SSD.

3.3 Conclusions

Il n'a pas été noté de caractères rédhibitoires pour l'ensemble des descendances HD. En général, il y a une relativement bonne conformité entre les lignées HD et les lignées SSD. Il semble qu'il y ait présence de biais de sélection dus à la conduite de la SSD. Mais, pour la sélection du maïs, la valeur propre au niveau des lignées n'a d'intérêt que pour l'aptitude à produire, sans contraintes fortes, des quantités suffisantes de semences d'hybrides. La qualité principale requise d'une lignée pour la création variétale est sa valeur hybride ou aptitude à la combinaison avec une lignée complémentaire pour engendrer un hybride performant.

4 Analyse de la variation de lignées HD, SSD et de familles S₁ pour la valeur hybride

L'objectif est ici de comparer pour l'aptitude à la combinaison avec un testeur commun, les performances de lignées produites par gynogenèse par rapport aux lignées produites par autofécondations. Cette analyse est réalisée au niveau des principaux caractères agronomiques : rendement en grains, humidité à la récolte, hauteur des plantes et de l'épi, longueur de la feuille de l'épi. Les lignées HD et SSD étant dérivées des mêmes familles S₁, le schéma expérimental génère des parentés : parenté entre les S₁ et les SSD, les S₁ et les HD, les SSD et les HD. Différents paramètres ont été comparés : moyennes, variances, héritabilités des populations, les covariances et corrélations entre populations apparentées. Une estimation de l'épistasie au niveau de la population de lignées HD a pu être réalisée.

Ce travail a fait l'objet de l'article suivant soumis à la revue Euphytica le 17/05/2006

Article 1

Doubled-haploid versus single-seed descent and S₁-families variation for test cross performance in a maize population

J. Bordes^{1*} · G. Charmet¹ · R. Dumas de Vaulx¹ · A. Lapierre¹ · M Pollacsek¹ · M. Beckert¹ & A. Gallais²

(1) UMR Amélioration et Santé des Plantes, Domaine de Crouelle, INRA-UBP, 234 avenue du Brezet, 63000 Clermont-Ferrand, France

(2) INRA-UPS-INAPG, Station de Génétique Végétale, Ferme du Moulon, 91190 Gif sur Yvette, France

(*author for correspondence; e-mail: jbordes@clermont.inra.fr)

Key words: Gynogenesis, doubled-haploid lines, single-seed descent lines, S₁-families, Maize

Summary

Progress made in the *in situ* gynogenesis technique since 1990 now allows production of a high number of maize (*Zea mays L.*) doubled-haploid (DH) lines. To compare DH lines versus selfing lines for test cross value, DH and single seed descent (SSD) lines were produced from random S₁ progenies of a genetically broad-base population. For grain yield, kernel moisture, plant height, ear height and leaf length, the three population means were similar. Except for kernel moisture, the genetic variance of DH lines was nearly twice as high as the genetic variance of S₁ families, as expected. On the other hand, genetic variance among SSD lines was only 1.5 times higher than the genetic variance of S₁ families. This could be due to a selection bias in the method of production of SSD lines. However, for all traits, heritability of SSD or DH lines was higher than heritability of S₁ families. For all traits, there was a high correlation between S₁ testcross progenies and DH or SSD testcross progenies, meaning that the S₁ testcross value can be used to select the families from which DH lines will be extracted. Furthermore epistasis effects in DH progenies were not significant. As a whole, compared with the variation in SSD lines, the variation in DH lines appeared to be more in accordance with the observed variation in S₁ families.

Introduction

Until the 1990s, the limited efficiency of the different techniques used in maize (*Zea Mays* L) prevented the use of *in situ* gynogenesis at the scale of a selection program (Beckert, 1994). Progress made in this technique since the works of Coe (1959) now allows production of a high number of doubled-haploid lines (DH) whatever the genotype (Lashermes and Beckert, 1988; Chalyk, 1994; Deimling et al., 1997; Bordes et al., 1997). DH may thus be useful in different breeding procedures used in maize improvement, pedigree selection and recurrent selection.

Pedigree selection implies the derivation of new inbred lines from crosses between elite inbred lines or from heterozygous plants from a population improved by recurrent selection. However, this type of scheme is long and complex because breeders have to select for combining ability with a tester. To initiate such a scheme, the testcross value is frequently evaluated on F₂ plants or S₁ families. The selected families are then selfed until the S₄ or S₅ generation with re-evaluation of their combining ability with a tester. Early selection is justified because in the absence of epistasis, the testcross value of a heterozygous plant is a good predictor for the testcross value of the lines that can be derived from such a plant (Gallais 1979a, b, 1990a; Bouchez and Gallais, 2000). However, the testing of heterozygous plants results in heterogeneous progenies (even if the tester is a homozygous line) and thus increases residual variance. Conversely, with tests carried out on homozygous lines within a genetic family, variation is removed, which increases the variance between genetic families and improves the heritability of the experimental design. The use of DH thus has several advantages: 1) it saves time, 2) it allows better use of genetic variation, 3) it increases selection efficiency by increasing genetic variance between families and by decreasing residual variance. Moreover, when the line used as tester is an elite line, the selected lines can be directly used for the development of new hybrids. The efficiency of recurrent selection can also be improved by the use of DH, specifically for low heritability traits (Griffing, 1975; Gallais, 1989, 1990b, 1993; Goldringer and al, 1996, Bouchez and Gallais, 2000; Bordes et al., 2006). Furthermore the use of DH allows the best combination of recurrent selection and varietal development because the varieties, i.e. the hybrids, are a co-product of population improvement (Bouchez and Gallais, 2000; Bordes et al., 2006).

The problem remaining to be clarified is whether potential genetic variability is affected by the DH process. Field comparisons of DH and SSD lines have already been performed for different quantitative traits in several species. With respect to agronomic traits, in spite of

some differences observed in wheat (Ma et al., 1999), barley (Bjornstad et al., 1993), and triticale (Charmet and Branlard, 1985), it appears that means and variances are often rather similar. In maize, Murigneux et al. (1993) and Marhic et al. (1998) found no significant differences between DH lines derived by anther culture and lines from SSD. In a small sample of DH lines derived from *in situ* gynogenesis, Lashermes et al. (1988) did not find any selection deviation.

The absence of epistasis also favors breeding using DH. Indeed in such a case, it is possible to predict the testcross value of DH lines that can be derived from a heterozygous plant from the testcross value of this plant. In maize, different experimental designs have been used to estimate epistatic effects (Hallauer and Miranda, 1981; Melchinger, 1987). Some authors found epistasis for several traits (for example, Lamkey et al., 1995) and some showed low or no epistasis (for example, Wolf et al., 2000; Hinze and Lamkey, 2003). However, this could be related to the methods used: comparison of generation means resulted in more frequent detection of epistasis than studies based on the estimation of variance components.

The main objective of this study was thus to compare genetic variance among DH testcross progenies to the S_1 and SSD testcross progenies for a given maize population in order to determine whether DH lines have the same breeding potential as SSD lines or S_1 families, i.e. whether there is an effect of the DH process on the variation that can be used by the breeder. Furthermore, in order to show whether early selection is justified, in our design, we considered the correlation between S_1 values and DH lines derived from the S_1 . As such a correlation is affected by the presence of epistasis, we also tested for the presence or absence of epistasis in different traits.

Materials and methods

Development of genetic material

A broad-base synthetic population was developed by intercrossing 48 lines from the three main North American genetic groups ('Iodent', 'Minnesota 13', 'Iowa Stiff Stalk Synthetic'), all with a *glossy* gene, as described by Bordes et al.(2006). From this population, 150 S_1 families were produced; we then tried to derive one to five DH lines and one SSD line from each S_1 family. SSD lines were derived from the S_1 families (F_3 plants), and successive generations through plants belonging to S_5 families. All the seeds from the S_5 families were harvested and bulked (F_6). For each family at each generation, three plants out of twenty were

selfed but only one selfed ear was taken for the next generation. DH lines were produced from haploid lines obtained by gynogenesis using a FIGH1 as haploid inducer derived from WS 14 (Lashermes and Beckert 1988). The haploid induction rate of FIGH1 was about 1%. Haploid plants were identified by the *glossy* phenotype when the first ligulate leaf appeared. Chromosome doubling to restore diploidy was induced by colchicine treatment at the three ligulate leaf stage (Bordes et al, 1997). After chromosome doubling, 261 DH lines were obtained from only 94 S₁ families with 1 to 8 DH lines per S₁ (22 S₁ with 1 DH, 31 with 2, 15 with 3, 11 with 4, 7 with 5, 4 with 6, 3 with 7, 1 with 8). In the present study, we considered these 261 DH lines, their 94 S₁ mother families and the corresponding 94 SSD lines.

For evaluation, these S₁ families, DH lines and SSD lines were crossed with the flint tester D171 to produce the testcross progenies. The elite D171 line selected at the University of Hohenheim (Germany) was chosen as tester because it combined well with our material. Testcross progenies were produced in isolated fields: S₁ progenies, DH and SSD lines sown in rows of 25 kernels were used as female parent, and the tester was used as male parent. The experimental testing design used for all the genetic material consisted of 94 testcross progenies from S₁ families, 94 testcross progenies from SSD lines and 261 testcross progenies from DH lines. Progeny evaluation trials were conducted in one year at three locations in the INRA experimental network: Le Moulon (Yvelines, France), Clermont-Ferrand (Puy de Dôme, France) and Lusignan (Vienne, France). In each location, the progenies of the same family (S₁, DH and SSD) and hybrid checks were distributed in sets of 56 entries and evaluated in a complete randomized block design with two replications and two-row plots 5.5 m long with 0.80 m between rows. Plant density was approximately 82 000 plants ha⁻¹. At harvest, grain yield (adjusted to 15.5% moisture), root lodging and kernel moisture were determined for all plots. Furthermore, at Clermont-Ferrand, plant height, ear height and ear leaf length were measured on the five first plants of one row for each plot.

Statistical analysis

To compare the mean of the three populations (DH, SSD and S₁) the analysis of variance of experimental designs was carried out according to the following model, for three locations:

$$Y_{ijk} = \mu + L_i + (b/L)_{ij} + T_k + G_{kl} + (GL)_{ikl} + E_{ijkl} \quad (1)$$

and for one location:

$$Y_{ijk} = \mu + b_j + T_k + G_{kl} + E_{jkl} \quad (2)$$

where L is the fixed location effect, (b/L) is the block/location nested effect, T is the fixed population effect, G the genotype effect, (GL) is the genotype x location interaction effect, E the residual effect. The last three (1) and two (2) effects were random, the others were fixed.

To compare the phenotypic variances of each type of family (DH, SSD, S_1) by a Bartlett test, we computed variance among DH family means by ignoring the fact that several DH lines were derived per S_1 . Indeed the bias introduced is expected to be very low. The expected value of such phenotypic variance is $\sigma^2 + \sigma_w^2 + \frac{N - \sum_i n_i^2 / N}{N - 1} \sigma_B^2$ (N being the total number of DH lines, i.e. 261, n_i the number of DH lines for a the S_1 family i , and $\sigma^2, \sigma_w^2, \sigma_B^2$ respectively the residual variance on family means and the within and between S_1 variance) instead of $\sigma^2 + \sigma_w^2 + \sigma_B^2$. We checked that, with the distribution of n_i , the coefficient of σ_B^2 is close to 1 (0.99).

The estimation of variance components for S_1 and SSD population was carried out according to the following model for three locations:

$$Y_{ijk} = \mu + L_i + (b/L)_{ij} + G_k + (GL)_{ik} + E_{ijk}$$

and for one location:

$$Y_{ijk} = \mu + b_j + G_k + E_{ijk}$$

where G_k , $(GL)_{ik}$ and E_{ijk} are random effects with σ_G^2 , σ_{GL}^2 and σ_E^2 variance respectively.

For the DH population, between S_0 plants (S_1 families) (σ_{GLB}^2) and within S_0 , genetic variances (σ_{GLW}^2) were derived by analysis of variance with the following nested model for three locations:

$$Y_{ijkl} = \mu + L_i + (b/L)_{ij} + B_k + W_{kl} + (BL)_k + (WL)_{kl} + E_{ijkl}$$

and for one location:

$$Y_{ijkl} = \mu + b_j + B_k + W_{kl} + E_{ijkl}$$

where L is the fixed location effect, (b/L) the fixed block/location nested effect, B and W the random genotype effects (between S_0 and within S_0), (BL) and (WL) the two location x genotype random interaction effect, and E the residual effect.

Variance components were estimated with the Restricted Maximum Likelihood procedure (VARCOMP REML option of SAS software). It was then straightforward to infer standard errors for the estimated variance components.

Heritabilities were estimated as follows for three locations:

$$h^2 = \sigma_G^2 / (\sigma_G^2 + \sigma_{GL}^2 / l + \sigma_E^2 / bl),$$

and for one location:

$$h^2 = \sigma_G^2 / (\sigma_G^2 + \sigma_E^2 / b),$$

where b is the number of replications in each location and l the number of locations..

The confidence interval of heritability was calculated according to the method described by Knapp et al. (1985).

Covariances and correlations between related families

Our experiment resulted in six different covariances between related families. Three were covariances among the three types of families: the covariance between S_1 -family and SSD family ($cov S_1$ -SSD), the covariance between S_1 -family and DH family ($cov S_1$ -DH), and the covariance between DH family and SSD family ($cov DH$ -SSD). Three others were the variances among families, because for a given type of family, the genetic variance among families is equal to the covariance between two individuals within a family. For example, genetic variance among S_1 families was equal to the covariance between two S_1 individuals. Furthermore as we considered combining ability of genotypes with a tester, there was no dominance effect, thus in the absence of epistasis, the covariance between related families is only a function of the additive variance for testcross value (Gallais 1990a). Consequently, with the assumption that the population is in linkage equilibrium, the covariance between two related families X and Y can be written

$$Cov XY = 2 K \sigma_{A_T}^2$$

where K is the classical coefficient of kinship, i.e. the probability of drawing two identical genes at one locus, one in X and the other in Y . It is thus clear that $K = 1/2$ for $cov S_1$ - S_1 , and $K = 1$ for $cov DH$ - DH . For $cov SSD$ - SSD , at a given generation n of selfing, $K_n = (1+F_{n-1})/2$, with $F_{n-1} = 1-(1/2)^{n-1}$. In S_5 generation, $K = 1.98 \sim 2$. For the three covariances between any two types of families, randomly drawing one gene in X and one gene in Y is equivalent to independently drawing the two genes in the common ancestor Thus $K = 1/2$ as for S_1 - S_1 kinship. Thus $var S_1 = cov S_1$ - $DH = cov S_1$ - $SSD = cov DH$ - SSD , $var DH = 2 var S_1$ and $var SSD = 1.98 var S_1$. Such relationships were used to improved accuracy of the estimation of $var A_T$. Covariance was found to be not significant when it was lower than twice its standard error.

Detecting additive x additive epistasis effects

The derivation of several DH lines per S_0 plant from a random mating design provides a design for detecting epistasis (Gallais, 1990b). Total genetic variance between all the lines derived from the S_0 population is:

$$\sigma^2_G = \sigma^2_{GB} + \sigma^2_{GW} = 2 \sigma^2_A + 4 \sigma^2_{AA}$$

where σ^2_G is the total genetic variance between all the lines, σ^2_A and σ^2_{AA} are the additive and the epistasis additive-by-additive variances. σ^2_{GB} and σ^2_{GW} components can be estimated from the nested analysis of variance, and from these estimates σ^2_A and σ^2_{AA} can be derived as follows:

$$\sigma^2_A = \frac{1}{2} (3 \sigma^2_{GB} - \sigma^2_{GW})$$

$$\sigma^2_{AA} = \frac{1}{2} (\sigma^2_{GW} - \sigma^2_{GB}) .$$

In the absence of epistasis it is expected that $\sigma^2_{GB} = \sigma^2_{GW} = \sigma^2_A$.

As each of these variance components is a linear combination of the expected mean squares of the analysis of variance, standard errors for the additive and epistatic variance components can then be derived by using the Scheffe method (1959).

Results

Mean and range

For all traits, population means were not significantly different (Table 1). DH and SSD population ranges were higher than the S_1 population range, except for plant height where the SSD range was lower. For all traits except kernel moisture, the mean of the DH range was higher than the SSD range.

Variance homogeneity

A Bartlett test showed heterogeneity of the three phenotypic variances among DH lines, SSD lines and S_1 families (Table 2). The differences among phenotypic variances were highly significant for kernel moisture and almost significant (0.06) for leaf length. Variances were also compared by pairs through their ratio using F-statistics. For all traits except plant height, variance among DH lines was not significantly different from variance among SSD lines. Variance among DH lines was also always significantly higher than variance among S_1 families whereas variance among SSD lines was higher than variance among S_1 families only

for kernel moisture, ear height and leaf length; variance was not significantly different for grain yield and plant height.

Variance components and heritability

Except for kernel moisture, the S_1 residual variance was higher than DH and SSD residual variances which were equivalent (Table 3). Genotype x location interaction variances of the three populations were not statistically different for grain yield, whereas for kernel moisture SSD lines showed higher genotype x location interaction variance than both DH lines and S_1 families.

When the overlapping of the confidence interval was taken into account, there were only a few significant differences between estimates of genetic variances. Whatever the trait, genetic variances among DH lines were no different from genetic variances among SSD lines, although for plant height the ratio of variance among DH to variance among SSD was 1.45. Genetic variance among DH lines was higher than genetic variance among S_1 families for grain yield, kernel moisture and leaf length. Genetic variance among SSD lines was higher than variance among S_1 families only for kernel moisture and leaf length.

Heritabilities (h^2) for DH and SSD lines were approximately equal for all traits except for kernel moisture where heritability was lower. At the statistical level 0.10, for grain yield and kernel moisture, heritabilities among DH lines appeared significantly higher than among S_1 families, since confidence intervals did not overlap. Similarly, except for kernel moisture, heritability among SSD lines appeared higher than among S_1 families.

Variance components and heritability

Each of the covariances (cov) between related families (cov S_1 -DH, cov S_1 -SSD and cov SSD-DH) represents another estimate of genetic variance among S_1 families (Table 4). The low cov S_1 -SSD and cov SSD-DH for kernel moisture and leaf length are notable. Coefficients of phenotypic correlation r_{S_1-DH} , r_{S_1-SSD} and r_{SSD-DH} were significant and similar for all traits, except for leaf length (where r_{SSD-DH} was significantly lower than r_{S_1-DH} and r_{SSD-DH} was not significant) and for kernel moisture (where r_{S_1-SSD} and r_{SSD-DH} were not significant) (Table 4). Genetic correlation coefficients were generally between 0.60 and 0.90 except for correlations involving SSD, for kernel moisture and leaf length.

Test for epistasis effects in the DH population

Estimates of between and within variance components of the variance among DH lines showed that, except for kernel moisture and leaf length, both components were very similar, as expected in the absence of epistasis (Table 5). As a consequence additive x additive epistasis variance was only significant for these two traits.

Discussion

The similar population means for DH, SSD and S₁ populations indicate the absence of directional selection in the development of DH and SSD populations for important agronomic traits. The greatest S₁ residual variance, as compared to DH and SSD residual variances, was expected on the basis of genetic heterogeneity within S₁ families which also induces greater environmental variance by competition between plants of different genotypes. The similar residual variances of DH and SSD populations corroborate this assumption.

At the level of phenotypic and genetic variances we were expecting var DH ~ var SSD > var S₁. Theoretically, in the absence of epistasis, the expected genetic variances of DH and SSD would be twice σ^2_G S₁. Indeed, in an inbred population derived from a panmictic population, the genetic variance in the absence of epistasis is (Gallais, 1990a):

$$\sigma^2_G = (1+F) \sigma^2_{A_T}$$

σ^2_G is the genetic variance, F is the coefficient of inbreeding and $\sigma^2 A$ is the additive variance. As for the S₁ progenies representing S₀ plants $F=0$ and for DH and SSD progenies, $F=1$, in the absence of epistasis we would thus expect $\sigma^2_{GDH} = \sigma^2_{GSSD} = 2 \sigma^2_{GS_1}$, i.e. $\sigma^2_{GDH} / \sigma^2_{GS_1} = \sigma^2_{GSSD} / \sigma^2_{GS_1} = 2$. However at the level of the ratios of phenotypic variances, due to the contribution of environmental effects, we would generally expect $1 < \sigma^2_{PDH} / \sigma^2_{PS_1} = \sigma^2_{PSSD} / \sigma^2_{PS_1} < 2$. Ratios observed for $\sigma^2_{PDH} / \sigma^2_{PS_1}$ were quite consistent with what was expected for all traits (Table 2). For the $\sigma^2_{PSSD} / \sigma^2_{PS_1}$ ratio, kernel moisture, ear length and leaf length resulted in consistent ratios. As for grain yield and plant height, the $\sigma^2_{PDH} / \sigma^2_{PS_1}$ ratio was consistent with what was expected, the low $\sigma^2_{PSSD} / \sigma^2_{PS_1}$ ratio observed for these traits could mean that it is σ^2_{PSSD} which is too low. A too low estimate of σ^2_{PSSD} for plant height could be the cause of a $\sigma^2_{PDH} / \sigma^2_{PSSD}$ ratio higher than 1 for this trait. The absence of a significant difference between σ^2_{PDH} and σ^2_{PSSD} , except for height, could be due to the large confidence intervals.

This reasoning is more informative with respect to genetic variance because phenotypic variance has two components: genetic variance and environmental variance. However, the confidence interval was still larger than for phenotypic variance and consequently only a few comparisons between expected and observed genetic variance ratio were significant. To narrow the confidence interval, genetic variances among S_1 families can be re-estimated by pooling its estimate with those of covariances between S_1 -DH, S_1 -SSD and DH-SSD (Table 4). Similarly, to estimate genetic variance among DH lines, in the absence of epistasis it is possible to pool both estimates resulting from the between and the within S_1 family variances. In this case, for all traits, the estimate of genetic variance among DH was significantly higher than that among S_1 with a $\sigma_{GDH}^2 / \sigma_{GS_1}^2$ ratio near 2 (higher than 2 only for kernel moisture and leaf length, which are the two traits displaying epistasis). Indeed, in the presence of epistasis it would be expected that $\sigma_{GDH}^2 / \sigma_{GS_1}^2 > 2$. With all the variance due to additive x additive epistasis, it could be 4. An approximate comparison (at threshold 0.10) of the observed value for σ_{GDH}^2 and that predicted by twice $\sigma_{GS_1}^2$ showed no significant differences whatever the traits (Table 6). In contrast, the comparison of the observed value for σ_{GSSD}^2 and that predicted by twice $\sigma_{GS_1}^2$ showed a significant difference, with a too low observed value for three traits: grain yield, plant height and ear height. Only for kernel moisture and ear leaf length $\sigma_{GSSD}^2 = 2 \sigma_{GS_1}^2$ as expected. This shows that the SSD genetic variance was generally too low. Thus it appears that some factors reduced genetic variation of SSD lines which mainly affected plant height, and also to a lesser degree, ear height and grain yield. During the process of SSD, unconscious selection of plants with mean values rather than random choice could explain such a reduction in variation. Indeed, each inbred family was represented by a row of twenty plants among which three were selfed and one was used for the next generation. It is probable that plants with extreme flowering dates were not considered. This kind of selection for the flowering date did not change the mean of the population but affected variance for such a trait (Table 7) and for all traits related to flowering date such as plant height, ear height and even grain yield.

For heritability, unlike the results for genetic variance, except for kernel moisture, heritabilities of DH lines were comparable to heritabilities of SSD lines and, as expected, were higher than heritabilities of S_1 families. However, this is mainly due to the lower residual variances observed for SSD and DH lines as a consequence of the genetic

homogeneity of such families. For kernel moisture, the lower heritability of SSD lines than of DH lines is due to an unexplained higher σ_{GL}^2 .

Concerning correlations among related families, the fact that three correlation coefficients involving SSD were not significant (two for kernel moisture and one for leaf length) confirmed our assumption that for these traits in SSD populations, an unknown factor has reduced the genetic variation (Table 4). However, for kernel moisture and leaf length, the presence of epistasis could also explain the lower correlation. In the absence of epistasis, the expected genetic correlation r_{S_1-DH} and r_{S_1-SSD} would be $\sqrt{2}/2 = 0.71$ whereas r_{DH-SSD} is 0.5. Our estimated genetic correlations are quite consistent with these values (the confidence interval of the genetic correlation was not computed, but it can be assumed to be relatively large). Now, assuming all genetic variance due to additive x additive epistasis variance, r_{S_1-DH} and r_{S_1-SSD} would be expected to be 0.5 and r_{DH-SSD} to be 0.25. The low r_{DH-SSD} observed for leaf length is another argument in favor of the presence of epistasis for such a trait. For the other traits, including grain yield, the absence of epistasis means that the correlation between S_1 testcross value and testcross value of all DH lines that could be derived from the S_1 line would be expected to be 1.

A direct test for the presence of epistasis showed that it was significant only for kernel moisture and leaf length. These are indeed the two traits for which the correlation between DH and S_1 families was lower. However it should be noted that the test used for the detection of epistasis is not powerful, due to poor accuracy in the estimation of genetic variance. The presence of epistasis effects has already been demonstrated but mostly in generation mean analysis: for kernel moisture and grain yield by Lamkey et al. (1995), for grain yield and ear height by Wolf and Hallauer (1997), for grain yield by Hinze and Lamkey (2003), however for only five crossings out of the 40 studied.

Conclusions

These results indicate that for an important agronomic trait such as grain yield, the doubled haploid technique by *in situ* gynogenesis allows the production of inbred lines showing similar variation to selfed inbred lines. The greatest conformity of relative variances DH/ S_1 compared to SSD/ S_1 allows us to suppose that the DH production of lines using the *in situ* gynogenesis technique is less subject to selection bias than the single-seed-descent method of production lines. It appears that in a selection program with early S_1 tests, derivation of inbred lines using the gynogenesis technique from the best S_1 families could advantageously replace

selfing technique without affecting the agronomic value. Such a technique could also be used efficiently in recurrent selection for the development of lines. The absence of significant epistasis and the significant correlation coefficients of S_1 -DH and S_1 -SSD for the main agronomic traits, confirm that tests on S_1 values are good predictors for the test value of lines that can be derived from the S_0 plants. This means that it is quite possible to first select the best S_1 families for their testcross value and then to apply the DH process only to the best S_1 families. This increases the time of line derivation in comparison with direct derivation from S_0 , but leads to better use of means. To shorten the length of the whole process of line derivation, S_0 plants should be directly crossed to the tester as female and simultaneously selfed.

Acknowledgements

We are grateful to Daniel Saint André and Bernard Coudert for their technical assistance and Josiane Bonnemoy for his documentation assistance. This work was supported by INRA and the Promaïs association members involved in this research: Caussade Semences, Euralis Génétique, Maïsadour Semences, Limagrain Genetics, R2N-RAGT Semences, Verneuil Recherche.

References

- Beckert, M., 1994. Advantages and disadvantages of the use of *in vitro* / *in situ* produced D H maize plants. In Y. Bajaj (ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Maize 25* Springer-Verlag, Berlin: 201-213.
- Björnstad, A., H. Skinnes, A. Uhlen, P. Marum & A. Marøy, 1993. Genetic marker segregations in doubled haploids in spring wheat crosses. *Hereditas* 118: 55-62.
- Bordes, J., R. Dumas de Vaulx, A. Lapierre & M. Pollacsek, 1997. Haplodiploidization of maize (*Zea mays* L.) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding. *Agronomie* 17: 291-297.
- Bordes, J., G. Charmet, R. Dumas de Vaulx, M. Pollacsek, M. Beckert & A. Gallais, 2006. Doubled-haploid versus S_1 -family recurrent selection for testcross performance in a maize population. *Theor Appl Genet* 112: 1063-1072.
- Bouchez, A. & A. Gallais, 2000. Efficiency of the use of doubled-haploids in recurrent selection for combining ability. *Crop Sci* 40: 23-29.
- Chalyk, S., 1994. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding. *Euphytica* 79: 13-18.
- Charmet, G. & G. Branlard, 1985. A comparison of androgenetic doubled haploid and single

- seed descent lines in Triticale. *Theor Appl Genet* 71: 193-200.
- Coe, E., 1959. Mutation of CI-a line with 2-3% haploids. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 30: 96-99.
- Deimling, S., F. Röber & H. H. Geiger, 1997. Methodik und Genetik der in-vivo-Haploideninduktion bei Mais. *Vorträge für Pflanzenzüchtung* 38: 203-204.
- Gallais, A., 1979a. Le concept de valeur en lignées d'un génotype et son utilisation possible en sélection. *Annales de l'Amélioration des Plantes* 29: 22.
- Gallais, A., 1979b. The concept of varietal ability in breeding. *Euphytica* 28: 811-823.
- Gallais, A., 1989. Optimization of recurrent selection on the phenotypic value of doubled haploid lines. *Theor Appl Genet* 77: 501-504.
- Gallais, A., 1990a. Application of the concepts of the test value and of varietal value to the study of genetic advance in recurrent selection. *Euphytica* 48: 197-209.
- Gallais, A., 1990b. Quantitative genetics of doubled haploid populations and application to the theory of line development. *Genetics* 124: 199-206.
- Gallais, A., 1993. Efficiency of recurrent selection methods to improve the line value of a population. *Plant Breeding* 111: 31-41.
- Goldringer, I., P. Brabant & A. Gallais, 1996. Theoretical comparison of recurrent selection methods for the improvement of self-pollinated crops. *Crop Sci.* 36:1171-1180.
- Griffing, B., 1975. Efficiency changes due to use of doubled-haploids in recurrent selection methods. *Theor Appl Genet* 46: 367-386.
- Hallauer, A. & J. Miranda, 1981. *Quantitative genetics in maize breeding*. Iowa State University Press, USA.
- Hinze, L. & K. Lamkey, 2003. Absence of epistasis for grain yield in Elite maize hybrids. *Crop Sci* 43: 46-56.
- Knapp, S., W. Stroup & W. Ross, 1985. Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. *Crop Sci* 25: 192-194.
- Lamkey, K., B. Schnicker & A. Melchinger, 1995. Epistasis in an elite maize hybrid and choice of generation for inbred line development. *Crop Science* 35: 1272-1281.
- Lashermes, P. & M. Beckert, 1988. A genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L) and selection of haploid inducing lines. *Theor Appl Genet* 76 : 405-410.
- Lashermes, P., A. Gaillard & M. Beckert, 1988. Haploidy plants analysis for agronomic and enzymatic markers in maize (*Zea mays* L). *Theor Appl Genet* 76: 570-572.
- Ma, H., R. Busch, O. Riera-Lizarazu & H. Rines, 1999. Agronomic performance of lines derived from anther culture, maize pollination and single-seed descent in a spring wheat cross. *Theor Appl Genet* 99: 432-436.

- Marhic, A., S. Antoine-Michard, J. Bordes, M. Pollacsek, A. Murigneux & M. Beckert, 1998. Genetic improvement of anther culture response in maize: relationship with molecular, Mendelian and agronomic traits. *Theor Appl Genet* 97: 520-525.
- Melchinger, A., 1987. Expectation of means and variances of testcrosses produced from F₂ and backcross individuals and their selfed progenies. *Heredity* 59: 105–115.
- Murigneux, A., D. Barloy, P. Leroy & M. Beckert, 1993. Molecular and morphological evaluation of doubled haploid lines in maize. *Theor Appl Genet* 86: 837-842.
- SAS Institute Inc., 2000. SAS/STAT user's guide, Version 8. SAS Institute, Cary, NC
- Scheffe, H., 1959. The analysis of variance. Wiley, New-York.
- Wolf, D. & A. Hallauer, 1997. Triple testcross analysis to detect epistasis in maize. *Crop Sci* 37: 763-770.
- Wolf, D., L. Peternelli & A. Hallauer, 2000. Estimates of genetic variance in an F₂ maize population. *Journal of Heredity* 91: 384-391.

5. Sélection récurrente sur HD versus sur S₁

Il s'agit de comparer pour la valeur hybride, l'efficacité de la sélection sur lignées HD par rapport à la sélection sur familles S₁ pour le rendement en grains.

La variance génétique des lignées est attendue égale au double de la variance génétique des familles S₁. La variance résiduelle au niveau de parcelles expérimentale est attendue plus faible pour les plantes homozygotes que pour les plantes hétérozygotes. L'héritabilité au niveau des lignées HD est donc attendue supérieure à celle des familles S₁. Par cycle, la sélection sur lignée est donc attendue plus efficace que la sélection sur famille S₁ pour l'amélioration d'une population. En revanche, la durée d'un cycle de sélection sur S₁ est inférieure à la durée d'un cycle sur HD. Dans notre expérimentation, la durée d'un cycle de sélection avec HD a permis la réalisation de deux cycles avec S₁. La question qui se pose alors est celle de savoir si un cycle de sélection sur HD est aussi efficace que deux cycles de sélection sur S₁.

Ce travail a fait l'objet de l'article suivant : accepté dans T.A.G le 29 décembre 2005.
Publié en ligne le 24/01/2006.

Article 2

Doubled-haploid versus S₁-family recurrent selection for testcross performance in a maize population

J. Bordes · G. Charmet · R. Dumas de Vaulx · M Pollacsek · M. Beckert · A. Gallais

J. Bordes · G. Charmet · R. Dumas de Vaulx · M. Pollacsek · M. Beckert
UMR Amélioration et Santé des Plantes, Domaine de Crouelle, INRA-UBP
234 avenue du Brezet,
63000 Clermont-Ferrand, France
e-mail: jbordes@clermont.inra.fr

A. Gallais
INRA-UPS-INAPG, Station de Génétique Végétale,
Ferme du Moulon, 91190 Gif-sur-Yvette, France

Abstract From a theoretical point of view, in a recurrent selection program, use of doubled haploids can increase genetic advance per unit of time. To evaluate such an expected efficiency for the improvement of grain yield in a maize population, two recurrent selection programs for testcross performance were initiated using testcross progenies from doubled haploid (DH) lines and S_1 families. In four years one selection cycle using DH and two selection cycles using S_1 families were carried out with the same selection intensity for both methods. As expected, testcross genetic variance was twice higher among DH lines than among S_1 families. Predicted genetic gain was 8.2% for the DH selection cycle, and 10.6% for the two S_1 selection cycles, giving per year a 29% advantage of the S_1 family method over the DH method in four years. With the DH method cycle in three years both methods were expected equivalent. Using a tester related to the one used for selection, realised genetic gains were equivalent for both methods: 6.6% for the DH cycle and 7.0% for the two S_1 cycles. With DH method cycle in three years the advantage would have been in favour of DH method. Furthermore, DH method has the advantage of producing simultaneously lines directly usable as parents of a hybrid. Thus if genetic advance per unit of time is evaluated at the level of developed varieties even with the same genetic advance or even a lower, DH method appears to be the most efficient.

Introduction

Until the 1990s, the low efficiency of the different techniques for the derivation of doubled haploids (DH) in maize prevented the integration of this tool at the scale of a selection program. Production of large numbers of DH lines by induced in situ gynogenesis (Coe 1959) is now well effective in maize (Lashermes and Beckert 1988; Chalyk 1994; Deimling *et al.* 1997; Bordes *et al.* 1997). The creation of elite populations with the recessive glossy character (Hayes and Brewbaker 1928; Bianchi and Marchesi 1960) allows the unambiguous differentiation of haploid plants from diploid plants and facilitates use of doubled haploids in recurrent selection programs (Bordes *et al.* 1997).

From a theoretical point of view, the use of DH can increase the efficiency of recurrent selection methods aimed at improving per se value and testcross performance of lines that can be derived from a given population (Griffing 1975; Gallais 1989, 1990a b; Bouchez and Gallais 2000). This is due to the increase in genetic variance among tested units which leads to an increase heritability (Gallais 1990b). However, the main parameter affecting selection using DH as compared to selection using S_1 or S_2 family is cycle length (Gallais 1993). If we consider the progress per unit of time, Strahwald and Geiger (1988) showed that the use of off-season nurseries reduces the usefulness of recurrent selection using DH. Bouchez and Gallais (2000) in their theoretical study comparing the efficiency of selection using DH, S_0 , S_1 and S_2 testcross progenies, concluded that for an annual plant like maize, without the use of off-season nurseries, recurrent selection using DH is the most effective, in particular at low heritability. This advantage disappears when off-season nurseries are used. However, from an applied breeding point of view, with the aim to develop new hybrids, when choosing a breeding method, the fact that recurrent selection using DH gives directly inbred lines that can be used as parents of new hybrids should be taken into account. Indeed, with the other schemes using S_0 , S_1 or S_2 progenies, it is necessary to add the time for the derivation of new lines.

To our knowledge, no experimental studies have compared DH method with other classical recurrent selection methods. In order to evaluate in a maize population whether the conclusions of Bouchez and Gallais (2000) are valid with our material and our experimental means, two recurrent selection programs for testcross performance was initiated using testcross progenies from on one hand doubled haploid (DH) lines and on the other hand S_1 families. During the selection process, with one cycle 4-year cycle for DH method and two 2-

year cycles for S_1 family selection, we estimated the different parameters of the response to selection and from these parameters expected genetic gain was derived. Realised genetic gain in tescross performance was evaluated with a tester related to that one used for selection. It was then possible to explore the impact of the cycle length on the relative efficiency of DH selection method.

Materials and methods

Doubled haploid process

The production of DH lines involves four main stages: i) haploid induction, ii) haploid identification, iii) artificial chromosome doubling and iv) plant growth after colchicine treatment (Bordes *et al.* 1997). The haploid lines were obtained by gynogenesis using a FIGH1 haploid inducer derived from WS 14 (Lashermes and Beckert 1988). The haploid induction rate of FIGH1 was about 1%. Haploid plants were identified by the glossy character when the first ligulate leaf appeared. Chromosome doubling to restore diploidy was accomplished by colchicine treatment at the three ligulate leaf stage. Chromosome doubling was performed only on some cells and on chimera haploid plants with some diploid sectors (Kato 2002). After colchicine treatment the plants were transferred to a greenhouse and were selfed. As plants were stressed by transplantation, the number of kernels produced per plant varied between 0 and 50. Finally, we derived approximately one DH line per 500 kernels resulting from FIGH1 crossing.

Development of genetic material

A synthetic population was developed by crossing 48 lines with *glossy* gene from the three main North American genetic groups ('Iodent', 'Minnesota 13', 'Iowa Stiff Stalk Synthetic'). The C0 population was derived by two intercrossing generations by developing independent 24 single crosses (1 x 2, 3 x 4, 5 x 6...47 x 48) for the first intercrossing and by chain crossing between single crosses (1 x 2) x (3 x 4), (3 x 4) x (5 x 6)...(47 x 48) x (1 x 2) for the second intercrossing. Then, 150 S_1 families were produced, and from these families, haploids were derived. After chromosome doubling, 261 DH lines were obtained from 94 S_1 families with 1 to 8 DH lines per S_1 family with an average of 2.8. The reduction in the number of S_1 families from which the DH lines originated was due to the elimination of families with only one haploid by consideration of the risk of chromosome doubling failure.

In the following, we consider that the 94 S_1 families from which the DH lines originated were a random sample of the 150, and that the number of haploids per plant is not related to agronomic traits such as grain yield.

Selection Process

With the use of off-season nurseries, the S_1 selection cycle required four generations over two years with the use of off-season nurseries (Fig. 1). Two S_1 family cycles were achieved in four years. During this time, one DH selection cycle was developed. Off-season nurseries were conducted in Chile, south of Santiago. The S_1 families and DH lines were crossed with the flint tester D171 to produce the testcross progenies. The elite line D171, selected at the University of Hohenheim (Germany), was chosen as tester because it combined well with our material. Testcross progenies were produced in isolated fields: S_1 progenies and DH lines, sown by row of 25 kernels, were used as female parent and tester as male parent. A common selection rate of 20 % was applied for each selection method. Therefore, for S_1 family selection, from the 150 S_1 derived from the C_0 population, 30 were selected on the basis of their testcross value and intercrossed by chain crossing to get the C_1S_1 population as follow: (1 x 2, 2 x 3, 3 x 4,.....30 x 1). To initiate the second selection cycle again 150 S_1 progenies were derived at random from the C_1S_1 population, and after their evaluation, 30 were selected and intercrossed by chain crossing to get the C_2S_1 population. For DH selection, after evaluation of the testcross progenies from the 261 DH lines derived from the C_0 population, 52 DH lines were selected and also intercrossed by chain crossing to get the C_1DH population. To achieve a similar genetic base at the DH population level after intercrossing, it would have been necessary to intercross 60 independent DH lines, which would have implied studying 300 DH lines in order to achieve the same selection intensity. Assuming independence among DH lines, the expected inbreeding coefficient after intercrossing the 52 selected DH lines is $1/52 = 0.019$, whereas with intercrossing 30 S_1 families it is $1/60 = 0.017$. The two expected coefficients are thus similar. However, selected DH lines were not completely independent: 28 S_1 gave one DH line each, 9 S_1 gave two DH lines each and 2 S_1 gave three DH lines each. This parentage increased the coefficient of inbreeding which became 0.025 (see appendix 1). This means that the expected size of the C_1DH population is less than that of the C_1S_1 population. However we had to compare it to the C_2S_1 population which had an expected inbreeding coefficient of 0.033 (Gallais 1989). The situation is then the reverse, the expected population size for C_1DH is higher than for C_2S_1 .

The experimental testing design used for the whole selection program consisted of 150 testcross progenies from S_1 families in 1997 and 1999, and 261 testcross progenies from DH lines in 1999. Progeny evaluation trials were conducted in the INRA experimental network in only one year in 3 locations: Le Moulon (Yvelines, France), Clermont-Ferrand (Puy de Dôme, France) and Lusignan (Vienne, France). In each location, the progenies and hybrid checks were arranged in sets of 56 entries and evaluated using a complete randomised block design with 2 replications. Each experimental plot was with 2 rows 5.5 m in length and 0.80 m between rows. Plots were over planted to a density of approximately 82 000 plants ha^{-1} . All plots were machine harvested. Grain yield adjusted to 15.5% grain moisture, root lodging and kernel moisture were determined for all plots at harvest. As the initial population was composed of elite lines belonging to equivalent maturity groups, neither root lodging nor significant differences in kernel moisture were observed between genotypes. Consequently, the only selection criterion taken into account was grain yield.

Expected genetic gain for direct selection

Expected genetic gain in one cycle of recurrent selection can be written (Gallais, 1991):

$$\Delta G = i \theta \text{cov } P_T O_T / \sigma_{P_T}^2 \quad (1)$$

where i is the selection intensity, θ is the degree of selection control on both sexes, $\text{cov } P_T O_T$ is the parent-offspring covariance for testcross value and $\sigma_{P_T}^2$ is the phenotypic variance among selection units. In our experiment, with a selection rate of 20 %, the i value is 1.40 (Falconer 1981) and the degree of selection control on both sexes is 2, for both methods. As we considered combining ability of diploid genotypes with a tester, there is no dominance effect. In a non-inbred population, if epistasis is not considered, the genotypic variance in test is equal to the additive variance in test (Gallais 1990b). Then $\text{cov } P_T O_T$ can be written (Bouchez and Gallais 2000):

$$\text{cov } P_T O_T = (1+F)/2 \sigma_{A_T}^2$$

where $\sigma_{A_T}^2$ is the additive variance for the testcross value and F is the inbreeding coefficient of selected units; it is equal to 0 for S_1 progenies and 1 for DH lines. The expression (1) can be written:

$$\Delta G = i \sqrt{1+F} h_F \sigma_{A_T} \quad (2)$$

with $h_F^2 = (1+F) \sigma_{A_T}^2 / \sigma_{P_T}^2$ and $\sigma_{P_T}^2 = (1+F) \sigma_{A_T}^2 + \sigma_{GL}^2 / l + \sigma_E^2 / bl$

where l is the number of locations, b the number of replications in one location, σ_{GL}^2 the genotype x location interaction and σ_E^2 the residual variance.

Finally, the relative efficiency of each method depends on 3 parameters: the inbreeding coefficient F , the heritability h_F^2 and the cycle length (the additive variance being unchanged). When expressed per unit of time t , genetic advance becomes:

$$\Delta G = (i \sqrt{1+F} h_F \sigma_{A_T})/t \quad (3)$$

The predicted genetic gain, per cycle and per year, was calculated with the (2) and (3) respectively. To estimate variance components, analysis of variance of experimental designs was carried out according to the following model:

$$Y_{ijk} = \mu + L_i + (b/L)_{ij} + G_k + (GL)_{ik} + E_{ijk}$$

where L is the location effect, (b/L) is the block/location nested effect, G the genotype effect, (GL) is the genotype x location interaction effect, E the residual variance. The last three effects were random, the others were fixed. Variance components were estimated with the Restricted Maximum Likelihood procedure (VARCOMP REML option of SAS software). The confidence interval of the heritability was calculated according to the method described by Knapp *et al.* (1985). The same model was used for DH testcross progenies as for S_1 testcross progenies, despite the presence of several DH lines per S_1 . Indeed, with the number of S_1 from which the DH were derived (94) and with an average of 2.8 DH lines per S_1 , the expected component for the genetic variance among DH lines estimated by ignoring this nested structure is very close to that estimated with the nested design. Assuming the same number n of DH lines per S_1 , the expected mean square would be $\sigma^2 + \sigma_w^2 + \frac{n(g-1)}{gn-1} \sigma_B^2$ (g being the number of parental S_1 lines and $\sigma^2, \sigma_w^2, \sigma_B^2$ respectively the residual variance on family means and the within and between S_1 variance) instead of $\sigma^2 + \sigma_w^2 + \sigma_B^2$. It can be seen that, with $g = 94$ and $n = 2$ or 3 , the coefficient of σ_B^2 is close to 1.

Observed Genetic Gains

Observed gains were studied at the level of testcross progenies from the improved population for each method. This study also allowed the evaluation of genetic variance after selection. The tester used, the elite line UH002, was different from that used for selection. This line, selected at the University of Hohenheim, as D171, belongs to the same heterotic group but

represents an improved generation. As the tester used to evaluate initial and improved populations was different from the tester used in the selection process, the realised genetic advance was the result of an indirect response to selection. Testcross performance was evaluated for each selected population (C1S₁, C2S₁, C1DH) and for the initial population (C0). To produce the testcross progenies for each population, 86 S₀ plants were selfed and S₁ families were crossed to the tester UH002. Progenies were evaluated in the INRA experimental network over a period of two years, in 2002 at five locations: Le Moulon, Clermont-Ferrand, Lusignan, Dijon (Côte d'Or, France) and Saint Martin de Hinx (Landes, France), and in 2003 in three locations: Le Moulon, Clermont-Ferrand and Lusignan. However, in 2003, due to a limit in seed amount, only fifty nine progenies have been evaluated. In each location, the progenies and hybrid checks were arranged in sets of 56 entries and evaluated using a complete randomised block design with one block in 2002 and two replications in 2003. Each experimental plot was made up of two rows of 5.5 m in length and 0.80 m between rows. Plots were over planted to a density of approximately 82 000 plants ha⁻¹. All plots were machine harvested. Grain weight and grain moisture were measured on all replications at harvest. Because of the differences between experimental design (no replications within a location in 2002), the data of each year were first analysed separately according to the following model:

$$\text{- for 2002: } Y_{ik} = \mu + L_i + G_k + (GL)_{ik} + E_{ik}$$

where l is the location effect, G is the genotype random effect, $(G \times L)$ is the genotype x location interaction effect and E is the residual variance.

$$\text{- for 2003: } Y_{ijk} = \mu + L_i + (b/L)_{ij} + G_k + (GL)_{ik} + E_{ijk}$$

where b/L is the hierarchical block/location effect.

For each year of the experiment, variance components of random effects (i.e. σ_G^2 , σ_{GL}^2 and σ_E^2) were estimated. With the pooling of both years we also estimated σ_G^2 , σ_{GL}^2 and σ_{GY}^2 the genotype x year interaction variance. In 2002, due to the presence of only one replication per location the genotype x location x year interaction variance was confounded with the residual variance.

Results

Variance components and predicted genetic gain

Variance components estimates, used to compute predicted genetic gain for both S₁ progenies and DH lines are given in Table 1. Genetic variance among DH lines in the C0 population

was close to twice the genetic variance among S_1 families in the C0 or the C1S₁ population. Genetic x location interaction variance for S_1 families from the C0 population was about twice that for S_1 progenies from the C1 population and that for DH progenies, which were equivalent. The residual variance for S_1 progenies from the C0 population was also significantly higher than residual variance for S_1 progenies from C1S₁ population and residual variance for DH progenies. As a consequence, heritability (h_F^2) for S_1 progenies from C0 population was significantly lower than for S_1 progenies from C1 population and for DH progenies from C0 population.

The predicted gain per cycle with the DH method (8.21%) was 1.7 times higher than the gain predicted with the S_1 method in the first cycle (4.77%) and 1.4 times the gain predicted in the second cycle (Table 2). The sum of the two S_1 selection cycles led to a total expected genetic advance of 10.63% which was 1.3 times higher than the expected advance with DH selection. Thus, per year, with a four-year cycle for DH method, predicted gain for this method (2.05%) was lower than predicted gain S_1 selection method: 2.39% in the first cycle and 2.92% in the second cycle.

Realised genetic gain

Realised gain with the DH cycle (6.58 %) was about the same as the sum of gain with the two S_1 cycles (7.02%) (Table 2). Consequently, with a 4-year cycle for the DH method, per year gain for this method (1.65 %) was almost the same as gain per S_1 cycle (1.76 %). However, per year gain obtained in the first S_1 cycle (1.13 %) was lower than that obtained in the second S_1 cycle 4.77 % (2.32 %). Therefore, per year, DH method was more efficient than the first cycle of S_1 method, whereas it was less efficient than the second cycle.

The realised genetic gain was always less than the expected gains. The ratio of realised to expected gain was 0.47 for C1S₁, 0.81 for C2S₁ and 0.80 for C1DH. Thus, there was about the same overestimation of predicted genetic advance for C2S₁ as for C1DH (Table 3). The overestimation for C1S₁ was much higher. Similarly, the realised heritability computed from the ratio of observed genetic advance to the differential selection, appeared to be lower for C1S₁.

It could be noticed that although selection was only on grain yield, kernel moisture has not significantly changed by such a selection.

Change in genetic variances

In 2002, the estimation of genetic variances in initial and improved populations showed any significant change due to the breeding methods (Table 3). In 2003 as in the pooled analysis genetic variance in the first S_1 selection cycle appeared to be higher than in the initial population and in the second cycle of selection. However, taking into account the large confidence interval for variance components such differences were not significant. On average, we can conclude that there was no significant change in the genetic variance. In 2002 and 2003 the genotype x location variance was about equal to the genetic variance. This was confirmed in the pooled analysis. Furthermore, such an analysis showed that genotype x year interaction variance was on average lower than the genotype x location variance.

Discussion

Variance component estimates

The estimates of genetic variance among testcross progenies from DH being about twice the estimates of genetic variance among testcross progenies from S_1 families are quite consistent with what was expected and shows that there was no significant epistatic variance component (Gallais 1990a). The highest heritability for DH progenies was also expected. However, we did not expect significant difference in heritability between $C0S_1$ and $C1S_1$. The lower heritability for $C0S_1$ was due to higher genotype x location interaction and environmental variances. In comparison with DH progenies the higher environmental variance for S_1 progenies was expected because of their heterogeneity leading to competition among plants of different genotypes increasing random variation. Concerning the higher genotype x location interaction, the test of S_1 progenies from $C0$ and $C1S_1$ the same years at the end of the experiment did not show a greater genotype x location variance which leads to the conclusion that in the first cycle of selection, it could have been due to a complex interaction genotype x location x year. Furthermore, heritability for DH progenies could have been overestimated because in comparison with results for S_1 progeny, genotype x location interaction variance for DH progenies was too low. Indeed, a higher genotype x location interaction was expected with DH progenies. This again could be the result of interaction with the year of test. It is known that genotype x year interactions are often more important than genotype x location (Sprague and Federer 1951). In our experiment they were about of the same amount.

Therefore two-year testing would have probably given more consistent genetic variance estimates.

Predicted gain versus realised gain

For the predicted genetic gain, the lower efficiency of the first S_1 cycle as compared to the second S_1 cycle is due to the lower heritability of the experimental design (0.53 compared 0.74). On a per cycle basis, the greater efficiency of DH method is due to the higher variance among DH lines than among S_1 families. That is mostly a consequence of inbreeding which led to higher heritability. In comparison with the S_1 second cycle, the lowest residual variance of the DH cycle, due to the plant homogeneity within plots, increased heritability. Indeed, when selection units are DH lines and the tester a homozygous line, the within progeny genetic variance is equal to zero.

Overestimation of genetic advance by predicted genetic advance can be due to two factors: the change in tester and the change in environmental conditions with the effect of genotype environment interactions. Consider first the effect of the change in tester. By selection with the first tester ($T_1 = D171$), but evaluation with the second tester ($T_2 = UH002$), the expected genetic advance is

$$\Delta G_{T_2/T_1} = i\sqrt{1+F} \rho h_F \sigma_{A_{T_2}}$$

where ρ is the genetic correlation between the two testers and $\sigma_{A_{T_2}}$ the additive variance in test with tester T_2 . Then the ratio of this expected genetic advance to the expected genetic advance by direct selection is

$$R_T = \frac{\Delta G_{T_2/T_1}}{\Delta G_{T_1/T_1}} = \frac{\rho \sigma_{A_{T_2}}}{\sigma_{A_{T_1}}} \quad (4)$$

ρ is necessarily less than 1. Assuming such a correlation of 0.70 between the two testers (which could be expected as the two testers are related), if both additive variances are equivalent, this could be sufficient to explain the observed results (at least for DH method). Now, in comparison to the first tester, if the second tester has a greater proportion of loci with dominant alleles, the additive variance would be expected to be lower. This could be a result of the improvement of the tester and would then also contribute to decreasing the observed genetic advance.

If overestimation of the genetic advance was only due to the change in the tester, the ratio R_T would be the same whatever the selection method and the cycle. As this is not the

case, change in the tester is not sufficient to explain the results. Overestimation could also be due to the variation of environmental conditions, depending on the year of testing. Evaluation of testcross progenies during the selection process was performed at three sites, but only in one year whereas valuation of genetic advance was performed in two years, representing eight site x year combinations. Consider the genetic advance in one cycle, with selection in environment $E1$ for response in environment $E2$, can be written

$$\Delta G = i\sqrt{1+F} \rho_{12} h_F \sigma_{A_2} \quad (5)$$

where ρ_{12} is the genetic correlation between the two types of environments and $\sigma_{A_2}^2$ the additive variance in test in environment 2. Then again the ratio of this expected genetic advance to the expected genetic advance by direct selection will be

$$R_E = \frac{\rho_{12} \sigma_{A_2}}{\sigma_{A_1}}$$

Again assuming the same amount of genetic variance in both types of environments, R_E will be less than 1, and all the more as genotype x environment (genotype x year) interaction will be high. It is then possible that the genetic correlation between the testing environments of S_1 families of $C0$ and the environments for final evaluation was lower than the other correlations. The higher genotype x environment interaction variance observed for S_1 progenies at the first cycle of selection is quite consistent with such an assumption (Table 2). Combination of both factors, change in tester and change in environments, then seems sufficient to explain the results observed. Therefore two-year testing would have probably led to more consistency between expected and realised genetic gains.

Change in variance due to selection and genetic advance

In spite of the change in tester, the variance components estimated at each cycle of S_1 selection (Table 1) can be compared to the variance components of S_1 progenies used for the evaluation of observed genetic gain (Table 3). Estimated heritabilities in $C0$ and $C1S_1$ populations are quite consistent in both evaluations. Finally, the absence of significant change in genetic variances in the first cycles of selection is quite consistent with what has been already observed in many selection experiments in maize with relatively low selection intensity (Hallauer and Miranda 1981). However a decrease in genetic variance is expected with further cycles. The absence of differences between the two methods after selection was expected because we have tried to get the same effective population size after both types of

selection. Indeed the effective population size can be computed as $1/(2F)$, F being the coefficient of inbreeding (Hallauer and Miranda 1981; Crow and Kimura 1970). According to F values given in the Material and Methods section, the effective population size for populations C1S₁, C2S₁ and C1DH was 30, 15 and 20 respectively. We expect genetic variance for C1DH nearer to variance for C2S₁ than to variance for C1S₁, which is what was observed, although non significantly. This means however that, on the whole selection intensity has been higher with the two S₁ selection cycles than with the DH selection cycle. To have the same inbreeding coefficient in C1HD as in C2S₁ it would have been required to select only 42 DH. Through an increase in the selection intensity for DH method, this leads to multiply by 1.09 expected genetic advance (8.92% instead of 8.21%). This does not change the conclusion: in four years, DH method is expected less than S₁ method. We can also expect the same increase for realised gain. Again, this would not change the conclusion: with a four year cycle, DH method is equivalent to S₁ method and with a three year cycle it tends to be better. This shows that it is difficult to compare the efficiency of breeding methods which do not maintain the same effective genetic size. Methods can be compared for the same effective genetic size at only given cycles. Indeed without consideration of such a problem, DH method could be favored because it narrows the genetic base faster than the S₁ method. In our experiment we have increased the number of selection units (DH lines) in order to apply the same selection intensity, but it will be also possible to reduce the selection intensity for the same number of selection units as in S₁ method.

Cycle length

In our experiment the cycle length for the DH selection method was of four years. It would have been possible to reduce to three years by several means: first by deriving haploids from S₀ plant; secondly, by suppressing the DH multiplication stage due to the low number of kernels produced by doubled haploids. The number of kernels on haploid plants varied from almost 0 to 50. For DH lines that produced enough kernels (about 20) it would be possible to avoid the DH multiplication stage. To use DH lines with only a few kernels, the simultaneous selfing and crossing to the tester taken as female parent could have been considered. However, this would lead to differences in the quality of testcross seeds although it will be possible to apply such a scheme to all DH.

Improvement of the DH process parameters (haploid induction, haploid identification and artificial chromosome doubling) would lead to shorten its length. Indeed, the increase in

the efficiency of haploid induction which is currently from 5 to 10 % (Deimling *et al.* 1997; Pollacsek unpublished) allows the production of at least one line per plant. Haploid identification at the embryonic stage (Chase and Nanda 1965) would allow colchicine treatment of the embryo or at an early stage (Demling *et al.* 1997; Kato 2002). This should avoid plant stress caused by the colchicine treatment at the plantlet stage and should improve the vigor of haploid plants. Grain production per DH line at the first selfing should then be increased. Finally, DH selection cycle could be developed in five generations, instead of seven, and with the use of off-season nurseries the cycle length could be reduced without too much difficulty to three years. It is not realistic to reduce it to two years.

As far as the cycle length of the S_1 method is concerned, from a realistic point of view it cannot be developed in less than two years although theoretically possible in one year with: 1) simultaneously selfing and crossing to the tester used as female parent in off-season nurseries, 2) evaluating testcross progenies in normal growing season, and 3) intercrossing in off-season nurseries. Indeed such an organisation would be difficult to manage due to the short time between each phase.

Another point to consider for the DH method is the intercrossing procedure which can affect cycle length. We have considered the intercrossing in only one generation. Thus, the resulting population is a mixture of F1. For the next cycle this leads to derive DH from F1. To avoid the risk of quick reduction of the genetic base by selection of sister DH lines, which will limit highly recombination between selected lines, it would then be recommended to control the pedigree of the F1. Another way consists in developing a second intercrossing generation in order to increase the recombination between selected parents. If this is possible without increasing the cycle length in years, this is recommended. Otherwise, this will decrease the genetic advance per unit of time. Note that, in both situations it will be better to derive only one DH line per plant (per F1 in the first scheme) (Gallais 1988).

Consideration of genotype x environment interaction

From the point of view of consideration of genotype x environment interaction, a 2-year testing could be considered; this will decrease the genetic advance per unit of time, more for the method with the shorter cycle, i.e. the S_1 method. However, due to its shorter cycle, the S_1 -family method has the advantage of considering twice as many years of evaluation as one cycle of the DH method in one cycle, with the same number of locations for the progeny test for both methods, at each cycle. We could then expect the S_1 method to develop material with

a more general adaptation than the DH method. However, it would be possible to use additional diverse environments for the DH method to try to compensate for its lower sampling of genotype x year interactions, although it will be difficult to compensate. The cost per unit of time will thus depend on this choice. With the same number of tested progenies, without supplementary locations for DH method, S_1 will be the most expensive, whereas with twice more locations for DH method, the cost would be the same. However, if the objective is to maintain the same effective population size, with the DH method it is required to double the number of tested progenies. In this case, without supplementary locations for the DH method, both methods will have the same cost per year. With supplementary locations, the DH method would then be more costly. However, in practice, with elite material, it would be better to have a compromise between the same population size and the double (Bouchez and Gallais 2000) and also between the same number of locations and the double. In such a case the cost per unit of time could be about the same for both methods.

Genetic advance per unit of time

Consider the consequence of a 3-year cycle for DH selection and still a 2-year cycle for S_1 selection at the level of predicted and realised gain per year which could be considered as organisations leading to the best use of time for both methods. This will increase the efficiency of DH method by 33%. With a 4-year cycle for DH selection, genetic advance per year with this method was 23% less than for S_1 selection (Table 3) whereas with a 3-year cycle, both methods become equivalent with 2.74% for DH method and 2.66% for S_1 method (average gain on both cycles). At the level of realised gains with a 4-year cycle, DH method was equivalent to S_1 method and then it is expected more efficient with a 3-year cycle. In conclusion, from the study of both expected and realised genetic advance in population improvement, it appears that to have the DH method competitive per unit of time it is required to have a cycle in three cycles.

However from an applied plant breeding point of view we have to consider the whole process of population improvement and varietal development. If we consider that one cycle of DH selection is about equivalent to two cycles of S_1 selection for population improvement, DH method is expected more efficient in term of genetic advance per unit of time at the level of varietal development. Indeed with DH method, if the tester is an elite line, then recurrent selection for testcross performance leads directly to new hybrids: after testing the DH testcross progenies it is only necessary to identify the best one or two, whereas with the S_1

method it will be necessary to add all the process of varietal development from the best S_1 families. Figure 2a illustrates what is expected in term of genetic advance per unit of time by considering 3 and 4-year cycle for the DH method, and considering that lines are developed from selected S_1 by Single Seed Descent in two years (see appendix 2 from more details on the computations). Based on realised gains 4-year DH selection is better than S_1 method for the first cycle ($2.97 \text{ q ha}^{-1}\text{year}^{-1}$ in 4 years versus $2.4 \text{ q ha}^{-1}\text{year}^{-1}$) and then after two cycles both methods are expected equivalent. The same conclusion is drawn on the basis of expected gains, although after two cycles of 4-year DH selection, S_1 method tends to be better than DH method. Therefore with our material, considering variety development, with a 4-year cycle for DH method, such a method is expected significantly more efficient than S_1 method only in the first selection cycle. In both situations the consideration of a 3-year cycle for DH method gives a clear advantage to DH method: $3.08 \text{ q ha}^{-1}\text{year}^{-1}$ after 8 years for DH method versus $2.3 \text{ q ha}^{-1}\text{year}^{-1}$ for S_1 based on realised gains. After 12 years its advantage is still important: $2.64 \text{ q ha}^{-1}\text{year}^{-1}$ versus $2.09 \text{ q ha}^{-1}\text{year}^{-1}$ on the base of realised gain and $3.05 \text{ q ha}^{-1}\text{year}^{-1}$ versus $2.54 \text{ q ha}^{-1}\text{year}^{-1}$ on the base of expected gain.

The total cost of both methods could be considered, although for a plant breeder what is important is to develop as quickly as possible the best variety in order to be early as possible on the market which will make the investment profitable (Bouchez and Gallais 2000). In our conditions, per unit evaluated (including the cost of production), the cost of DH was only about 1.20 times superior to the cost of S_1 (data not shown). Thus, from a population improvement point of view, considering the number of progenies which have been studied for each method in four years, the total cost of the DH cycle was slightly higher than the cost of the two S_1 cycles. From a varietal development point of view, considering the cost of pedigree selection required for S_1 method would give a clear advantage to DH method.

Conclusion

Considering only population improvement, on a per year basis, with one cycle in four years, DH method was approximately equal to S_1 -family method. It would be necessary to develop one cycle in three years for the DH method to be better. This is quite consistent with the theoretical conclusion of Bouchez and Gallais (2000). Considering simultaneously population improvement and variety development, the DH system has the advantage of producing potential hybrid cultivars at each cycle. Thus, if the genetic advance per unit of time is evaluated from the point of view of varietal development, there is a clear advantage to the DH

method. In this case, varietal development can be considered as integrated in the process of recurrent selection which becomes a recurrent varietal development.

Acknowledgements We are grateful to Annie Lapierre, Daniel Saint André and Bernard Coudert for the experimental work and the production of DH lines. This work was supported by INRA and the Promaïs association members involved in this research: Caussade Semences, Euralis Génétique, Maïsadour Semences, Limagrain Genetics, R2N-RAGT Semences, Verneuil Recherche.

Appendix 1: derivation of the coefficient of inbreeding of the C1DH population

Among the 52 intercrossed DH lines to develop the C1DH population 28 derived from 28 independent S_1 , 18 derived from 9 independent S_1 with 2 DH lines per S_1 and 6 derived from 2 independent S_1 with 3 DH lines per S_1 .

The coefficient of inbreeding is defined as the probability of drawing at a locus in a zygote two genes identical by descent, i.e. deriving from the same ancestor gene. Assuming random mating, identity by descent in one zygote can result either from selfing with probability $1/52$, or by crossing between sister lines, i.e. from the same S_1 . In the case of crossing between two sister lines the expected inbreeding coefficient of progeny is $1/2$. One S_1 with two sister lines generates two crosses between sister lines (including reciprocal); one S_1 with three sister lines generates six crosses between sister lines. The total inbreeding coefficient will thus be:

$$1/52 + 9 (2 \frac{1}{2}) 1/52^2 + 2 (6 \frac{1}{2}) 1/52^2 = 0.0247$$

Appendix 2: genetic advance at the level of varietal development

Total genetic advance ΔG_{TV} was derived by adding genetic advance due to varietal development from one selection cycle of population improvement (ΔG_V) and the cumulated genetic advance due to population improvement (ΔG_P). Assuming linear response over the first cycles of selection, the expression of genetic advance per unit of time can be written

$$\Delta G_{TV} / t = [(t - c) \Delta G_P / c + \Delta G_V] / t,$$

where t is the number of years from the beginning of the selection, c is the duration of the cycle (3 or 4 years for DH method), and ΔG_P is the genetic advance in one cycle of population improvement.

For considering varietal development with the S_1 method, several schemes are possible. As it is not the frame to discuss all the possible schemes, we have simplified by considering SSD from the best S_1 and we have assumed that the same potential as with DH can be reached. Using off-season nurseries S_5 or even S_7 lines can be derived in two years and one year more for evaluation of testcross progenies (which can begin at the level S_4) this gives a minimum duration of 5 years from the population resulting from intercrossing. Then the same formula as previously can be used with appropriate parameters. Obviously it is not justified to study more than 3 to 4 cycles without considering the decrease in genetic variance. Note that the duration of 5 years for the derivation of lines without the use of DH is a minimum and tends to favour S_1 method.

The difference between the two genetic advances per unit of time

$$\Delta G_{TV_{DH}} / t - \Delta G_{TV_{S1}} / t = (t - c_{DH}) \Delta G_{P1_{DH}} / c_{DH} t - (t - c_{S1}) \Delta G_{P1_{S1}} / c_{S1} t, \text{ (for } t > 4)$$

depends only on the time t (in years), the duration of the varietal development from a population resulting from intercrossing (c_{DH} or c_{S1}) and the genetic advance in one cycle of recurrent selection ($\Delta G_{P1_{DH}}$ or $\Delta G_{P1_{S1}}$).

Figure 2b represents the comparison of genetic advance per year for both methods with the following conditions:

- potential of varietal development for DH selection was considered by selecting the best 3% lines;
- genetic variance among DH lines was taken equal to 44 which is the value estimated at the first DH selection cycle and which is quite consistent with variance among S_1 estimated at the end of the experiment;
- heritability at the level DH lines was taken equal to 0.80: it was estimated equal to 0.83 in the first selection cycle. Then genetic advance due to varietal development ΔG_V from any selection cycle was computed as $i h^2 \sigma_G = 11.9 \text{ q ha}^{-1}$; we recall that such a quantity does not affect the difference between the two methods;
- for the genetic advance due to population improvement, expected and realised values were considered.

References

Bianchi A, Marchesi G (1960) The surface of the leaf in normal and glossy maize seedlings. *Z Vererbungsl* 91:214–219

- Bordes J, Dumas de Vaulx R, Lapierre A, Pollacsek M (1997) Haplodiploidization of maize (*Zea mays* L.) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding. *Agronomie* 17:291–297
- Bouchez A, Gallais A (2000) Efficiency of the use of doubled-haploids in recurrent selection for combining ability. *Crop Sci* 40:23–29
- Chalyk ST (1994) Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding. *Euphytica* 79:13–18
- Nanda DK, Chase SS (1966) An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci* 6:213–215
- Coe E H (1959) A line of maize with high haploid frequency. *Amer Nat* 93:381–382
- Crow JF, Kimura M (1970) An introduction to population genetics theory. Harper & Row Pub., New York, Evanston and London. 591p
- Deimling S, Röber F, Geiger HH (1997) Methodik und Genetik der in-vivo-Haploideninduktion bei Mais. *Votr Pflanzenzüchtung* 38:203–204
- Falconer D S (1981) Introduction to Quantitative Genetics. Longman Group Ltd, Harlow
- Gallais A (1988) A method of line development using doubled haploids: the single doubled haploid descent recurrent selection. *Theor Appl Genet* 75:330–332
- Gallais A (1989) Optimization of recurrent selection on the phenotypic value of doubled haploid lines. *Theor Appl Genet* 77:501–504
- Gallais A (1990a) Quantitative genetics of doubled haploid populations and application to the theory of line development. *Genetics* 124:199–206
- Gallais A (1990b) Application of the concepts of the test value and of varietal value to the study of genetic advance in recurrent selection. *Euphytica* 48:197–209
- Gallais A (1991) A general approach for the study of a population of test-cross progenies and consequences for the recurrent selection. *Theor Appl Genet* 81:493–503
- Gallais A (1993) Efficiency of recurrent selection methods to improve the line value of a population. *Plant Breeding*.111:31–41
- Griffing B (1975) Efficiency changes due to use of doubled-haploids in recurrent selection methods. *Theor Appl Genet* 46:367–386
- Hallauer AR, Miranda JB (1981) Quantitative genetics in maize breeding. Iowa State Univ Press, Ames, Iowa
- Hayes HK, Brewbaker HE (1928) Glossy seedlings in maize. *Am Nat* 62: 228–235
- Kato A (2002) Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. *Plant Breeding*. Volume 121 Issue 5 Page 370

- Knapp SJ, Stroup WW, Ross WM (1985) Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. *Crop Sci.* 25:192–194
- Lashermes P, Beckert M (1988) A genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. *Theor Appl Genet* 76:405–410
- SAS Institute. 2000. SAS/STAT user's guide, Version 8. SAS Institute, Cary, NC
- Sprague GF, Federer WT (1951) A comparison of variance components in corn yield trials: II. Error, year x variety, location x variety, and variety components. *Agron J* 43:535–541
- Strahwald JF, Geiger HH (1988) Theoretical studies on the usefulness of doubled-haploids for improving to efficiency of recurrent selection in spring barley. *Proc. 5th Meeting of the EUCARPIA Section “Biometrics in Plant Breeding”*, 1–12

6. Coût des méthodes

La comparaison du coût de l'haplométhode par rapport aux méthodes utilisant la voie de l'autofécondation est réalisée, d'une part pour la production de lignées, d'autre part pour la sélection récurrente. Cette évaluation est basée sur les tarifs moyens pratiqués en 2004, par deux entreprises de prestation de service, spécialisées dans la réalisation des opérations classiques de croisements et d'autofécondations en France et au Chili (Tableau IV.6.1).

6.1 Production de lignées

L'évaluation du coût des lignées a été faite dans le contexte du schéma expérimental utilisé ici. La production de lignées HD, n'étant actuellement pas proposée par les entreprises de prestation de service, certaines hypothèses d'estimation sont faites par rapport aux opérations courantes.

Dans notre schéma, la production de lignées HD comporte 3 générations :

- une génération de croisements avec l'inducteur *FIGHI* en champ isolé,
- une génération de production H -> HD (identification des haploïdes, traitement à la colchicine et autofécondation),
- une génération de multiplication des HD ayant produit quelques grains.

Les générations de croisements avec l'inducteur et de multiplication des HD sont des opérations classiques. En revanche, le coût de la génération de production H -> HD doit être estimé par rapport aux opérations classiques.

Estimation du coût de la génération H -> HD

Cette génération comporte (voir annexe1) :

- la mise en culture individualisée des grains en plaques alvéolées pour l'identification des haploïdes,
- le conditionnement des plantes avant et après le traitement à la colchicine,
- les autofécondations répétées 3 à 4 fois par plante haploïde produisant du pollen (ces plantes étant des chimères haploïdes à n chromosomes possédant des massifs cellulaires à $2n$ chromosomes).

Les deux premières opérations peuvent être considérées équivalentes à la mise en place d'une culture en pépinière au champ, pour des opérations traditionnelles d'autofécondation. L'étape d'autofécondations répétées sur une même plante peut être assimilée à plusieurs

autofécondations sur une même ligne de 10 plantes au champ. Finalement, le coût de traitement d'une plante haploïde, pour la phase H -> HD, peut être assimilé au coût d'une ligne de 10 plantes autofécondées. La différence entre le coût des deux systèmes se situe au niveau de la quantité d'unités à traiter. En effet, si l'on souhaite produire une lignée SSD par famille S_1 , la mise en place en pépinière d'une ligne de cette famille à chaque génération sera suffisante. En revanche, si l'on souhaite produire une lignée HD par famille S_1 , le traitement d'au moins 4 plantes haploïdes par famille sera nécessaire. Pour des SSD en S_5 , comme c'est le cas dans notre schéma, quatre générations d'autofécondations représentent aussi 4 lignes de pépinière. Si l'on souhaite une homozygotie suffisante, il sera nécessaire d'effectuer une ou deux générations supplémentaires d'autofécondations. Finalement, le coût de production d'une lignée HD est peu différent du coût de production d'une lignée SSD en S_6 (Tableau IV.6.2).

6.2 Sélection récurrente

L'évaluation du coût de la sélection récurrente sur lignées HD et de la sélection sur familles S_1 est réalisée pour un cycle de sélection, de la génération S_1 de C_0 jusqu'à la constitution des populations $C_1 S_1$ et $C_1 HD$ (Figure IV.1). Elle est calculée sur la base des différentes unités produites et évaluées. En théorie, dans une population panmictique, la variabilité d'une lignée ne représente que la moitié de la variabilité de la S_1 dont elle est dérivée. Pour avoir une représentativité équivalente, le nombre de lignées HD doit être deux fois plus important que le nombre de familles S_1 . Dans notre expérimentation, pour 150 familles S_1 , seulement 261 lignées HD avaient été considérées. Une simulation du coût de l'haplométhode avec 300 lignées est réalisée (Tableau IV.6.3). Dans les conditions de notre expérience, le coût de la sélection récurrente sur HD représente environ le double du coût de la sélection récurrente sur S_1 . Cette différence est seulement due au nombre d'unités évaluées. Si l'objectif du programme de la sélection récurrente est la création variétale, dans le schéma avec S_1 , les meilleures familles devront ensuite suivre un processus de création de lignées alors que les meilleures lignées HD peuvent servir directement de parents d'hybrides. Finalement, dans un processus complet de sélection récurrente pour la création variétale le coût de la méthode avec HD doit être avantageux.

6.3 Conclusion

Finalement, pour la production de lignées ou pour la sélection récurrente, les deux méthodes ont des coûts assez équivalents. Ce paramètre n'interviendra que très peu dans le choix d'une méthode lors de la mise en place d'un programme de sélection.

V- CONCLUSION GÉNÉRALE

Les travaux conduits à l'INRA de Clermont-Ferrand depuis une vingtaine d'années, pour le développement d'une méthode de production de lignées de maïs par haplodiploïdisation, ont débouché sur la mise au point de l'induction de la gynogenèse *in situ* et ont permis d'envisager son intégration dans les programmes de sélection.

Les progrès, d'abord réalisés concernant cette méthode (Beckert, 1994), ont permis une bonne maîtrise de la production en grand nombre de lignées haploïdes doublées (HD). Mais, son développement, c'est-à-dire son utilisation dans un schéma de sélection nécessitait de disposer d'un outil fiable et de vérifier son intérêt sur le plan théorique. Pour cela : i) l'amélioration de certaines étapes clés de l'haplodiploïdisation et leur validation pratique dans un contexte de large variabilité agronomique, ii) l'étude théorique des répercussions et conséquences de l'haplométhode par rapport aux méthodes conventionnelles en termes de génétique quantitative et iii) la comparaison de l'efficacité de l'haplométhode avec les méthodes conventionnelles dans un programme de sélection récurrente, sont les différents points qui ont fait l'objet de cette thèse. Ils ont donné les résultats suivants :

- **Amélioration et validation pratique**

A partir de WS14, nous avons pu sélectionner un inducteur d'haploïdes FIGH1, de bonne valeur agronomique propre et conduisant au développement d'individus gynogénétiques *in situ* avec une fréquence de 1%, c'est-à-dire utilisable au niveau industriel. Des sélections successives ultérieures nous ont permis de détecter deux autres inducteurs beaucoup plus performants : PK6 (Pollacsek, non publié) et, plus récemment, FIGH3, avec un taux moyen d'induction d'environ 5 et 7% respectivement.

Un matériel végétal élite sur le plan agronomique et correspondant à une variabilité génétique importante a été d'abord marqué génétiquement par l'introduction du caractère récessif *glossy* qui s'exprime dès le stade de la plantule. L'identification précoce de plantes haploïdes a permis d'établir la faisabilité de cette méthode d'haplodiploïdisation et d'envisager sa diffusion auprès des sélectionneurs de maïs sous forme d'un programme de sélection conduit en partenariat avec six firmes de l'association PROMAÏS de 1997 à 2005.

Parallèlement à cette étude et en vue de la généralisation du système, nous avons amélioré certaines étapes clés :

- deux nouveaux inducteurs d'haploïdes, marqués génétiquement avec un caractère

dominant de coloration des grains, PK6 R-ch (Pollacsek, non publié) et FIGH2 R-nj, très récemment, ont été sélectionnés,

- les techniques de doublement du stock chromosomique et les conditions de conduite de la culture ont été améliorées de façon à augmenter la probabilité d'obtenir une descendance HD à partir de plantes haploïdes.

Nous avons validé ce système amélioré sur une population à base génétique large et, si l'on excepte quelques cas isolés, la quasi-totalité des 150 génotypes qui la constituait a répondu favorablement à l'induction d'individus haploïdes gynogénétiques. Pour une grande partie des plantes haploïdes identifiées, soit environ 80%, le traitement à la colchicine a permis le doublement du stock chromosomique avec émission de pollen et la réussite d'une autofécondation. Ainsi, une descendance HD a été obtenue avec 45% des plantes haploïdes.

- **Génétique quantitative et haplométhode**

Il est connu, que, si à partir d'un croisement F_1 hétérozygote on dérive des lignées HD à partir de différentes générations ($F_1, F_2, F_3, \dots, F_6$) et en présence de déséquilibres de liaison et d'épistasie, les recombinaisons efficaces générées au cours des méioses précédant la production des lignées, auront un effet sur leur moyenne et leur variance. Alors, réciproquement, la comparaison entre moyennes et/ou variances de lignées produites à différentes générations de recombinaison, renseignera sur la présence de déséquilibres de liaison et d'épistasie. Mais, à partir de différentes hypothèses de taux de recombinaison, les estimations que nous avons faites, indiquent que les différences attendues sont faibles. Il ne sera donc possible d'obtenir cette information, que, si parmi tous les couples de locus déterminant un caractère, les effets combinés du déséquilibre de liaison et de l'épistasie vont dans le même sens.

Lorsque la population de départ de sélection est issue de générations d'intercroisements en panmixie, l'estimation que nous avons faite à partir des travaux de Gallais (1974, 1990b) montre que les lignées HD et SSD dérivées de familles S_1 , sont très peu différentes au niveau des déséquilibres de liaison. La différence provoquée par le nombre de recombinaisons n'affectera que faiblement leur valeur. En revanche, dans une population, la production de plusieurs lignées HD par familles S_1 rend possible la constitution d'un plan de croisements hiérarchique qui permet d'évaluer les effets d'épistasie (Gallais, 1990b).

- **Evaluation de l'haplométhode dans un programme de sélection**

Dans un programme de sélection, la comparaison de l'intérêt respectif de

L'haplométhode et des méthodes conventionnelles de sélection a permis de montrer que :

- pour la valeur propre des lignées, il y a une bonne conformité entre les principaux caractères agro morphologiques des lignées HD et des lignées SSD;

- pour la valeur hybride et pour quelques caractères agronomiques (rendement en grains, humidité à la récolte, hauteur des plantes et de l'épi, longueur de la feuille de l'épi), les moyennes des familles S_1 et des lignées HD et SSD, dont elles sont issues, sont équivalentes. Les valeurs très proches des coefficients de corrélation $S_1 \rightarrow HD$ et $S_1 \rightarrow SSD$, signifient une représentativité des familles S_1 équivalente au niveau des lignées HD et au niveau des lignées SSD. L'haplodiploïdisation n'induit donc pas de biais de sélection défavorable par rapport aux lignées obtenues par autofécondation. Les variances génétiques des lignées HD et SSD sont supérieures à la variance génétique des familles S_1 . Toutefois, les rapports HD/ S_1 et SSD/ S_1 sont en général inférieurs à 2, qui est la valeur attendue en absence d'épistasie. Le rapport SSD/ S_1 est le plus souvent inférieur au rapport HD/ S_1 . Cette différence, parfois importante, pourrait être attribuée à un biais de sélection lors de la production des lignées SSD.

- la sélection récurrente sur HD est plus efficace par cycle que la sélection récurrente sur S_1 . La plus forte variance génétique et la plus faible variance résiduelle des lignées homozygotes, par rapport à celle des familles hétérozygotes, augmentent l'héritabilité du dispositif expérimental, donc l'efficacité de la sélection. Mais, la durée plus importante du cycle avec sélection sur HD, ramène son efficacité par unité de temps au niveau de celle de la sélection sur S_1 . Toutefois, lorsqu'on se place au niveau de la création variétale, la sélection sur HD reste plus efficace, puisque les unités produites peuvent servir directement de parents de variétés alors que les familles S_1 nécessitent ensuite plusieurs générations d'autofécondations pour la fixation des caractères. Cette dernière étape peut d'ailleurs être réalisée aussi par haplodiploïdisation.

- le coût de production des lignées HD est comparable à celui des lignées obtenues par autofécondations. Le coût d'un cycle de sélection récurrente sur lignées HD est proche du double de celui de la sélection récurrente sur S_1 . Ceci est dû aux nombres d'unités évaluées. En effet, pour avoir une représentativité équivalente de la variabilité, il faut deux fois plus de lignées HD que de familles S_1 . Mais, lorsque la sélection récurrente s'inscrit dans un programme de création variétale, les coûts des deux méthodes doivent être assez voisins.

En conclusion, on peut donc dire que les différents points étudiés dans cette thèse ont permis de vérifier l'intérêt théorique global de l'haplométhode, ce qui établit la justification de

son utilisation pour la sélection d'hybrides de maïs. Avec un rendement amélioré et sachant qu'elle est applicable à n'importe quel génotype de maïs, l'haplodiploïdisation par croisement intraspécifique à l'aide d'un inducteur, est maintenant un système performant de production de plantes homozygotes à l'échelle industrielle, à la disposition du sélectionneur.

VI- PERSPECTIVES

Les résultats obtenus ici permettent le développement d'un travail plus approfondi de connaissance de l'haploïdisation. Si certaines améliorations peuvent être envisagées, la méthode devrait maintenant être expérimentée, en association avec la sélection assistée par les marqueurs moléculaires, pour des études de génétique quantitative de caractères d'intérêt et pour l'optimisation de schémas de sélection récurrente.

- **Bases génétiques du caractère « aptitude à l'induction »**

L'accroissement important du taux d'induction de la gynogenèse a justifié et rendu possible un travail d'étude pour comprendre le phénomène au niveau moléculaire et mieux le maîtriser. Ce travail, conduit actuellement à l'INRA de Clermont-Ferrand par P. Barret, fait l'objet d'une thèse. Après la détection d'un QTL important, les travaux en cours portent sur la recherche d'un gène candidat par différentes techniques de biologie moléculaire.

- **Amélioration de la méthode d'haplodiploïdisation**

L'identification des individus haploïdes par la mise au point d'un marqueur dominant présent chez l'inducteur pourrait devenir systématique. Ceci pourrait être fait par un travail complémentaire, de mise au point et de validation de la construction génétique moléculaire, réalisée par M. Beckert, qui intègre un système antisens conduisant à l'expression dominante du caractère *glossy*. On disposerait alors d'un inducteur avec un marqueur dominant, opérationnel au stade plantule, dans la très large base génétique naturellement *non glossy*. Il permettrait de pallier certains défauts constatés avec les marqueurs de coloration du grain qui, selon le contexte génétique (présence d'inhibiteurs de coloration ou de caractères semblables à ceux des marqueurs), peuvent être de fiabilité partielle ou même inefficaces. Un tel marqueur serait d'une fiabilité totale dans la base génétique *non glossy* et pourrait servir, notamment dans la production de lignées recombinantes, pour des études fines de cartographie.

- **Etudes des effets combinés du déséquilibre de liaison et de l'épistasie**

La détection de linkage et d'épistasie par la comparaison de moyennes et de variances de lignées produites à différentes générations de recombinaison, pourrait être mise à profit pour des études de caractères d'intérêt chez le maïs (qualité fourragère, teneur en protéines, tolérance à la sécheresse, valorisation de l'azote, etc..).

- **Intégration de la sélection assistée par marqueurs et de l'haplométhode dans un programme de sélection récurrente**

Pour la sélection de caractères quantitatifs, on peut recourir à la sélection assistée par marqueurs (SAM), qui consiste à utiliser les marqueurs moléculaires pour prédire la valeur génétique des individus candidats à la sélection (Charcosset et Gallais, 2003). L'objectif principal est de repérer, soit ceux qui donneront les meilleures lignées pour la création variétale, soit ceux à intercroiser pour former une nouvelle population améliorée dans un programme de sélection récurrente. En sélectionnant les individus sur leur valeur génétique associée à des marqueurs moléculaires, on peut espérer retenir les individus porteurs du plus grand nombre d'allèles favorables aux QTL (Quantitative Trait Loci).

Les lignées HD présentent certains intérêts pour l'utilisation de la SAM :

- l'haplodiploïdisation donne des lignées strictement homozygotes à partir d'un croisement. Pour chaque génotype, on dispose donc d'un nombre quasi illimité d'individus génétiquement identiques permettant une meilleure appréciation de leur valeur ;
- contrairement aux analyses sur F_2 ou rétrocroisements, les HD permettent une utilisation de tout le polymorphisme, les gènes dominants, comme les gènes codominants pouvant être pris en compte ;
- les corrélations QTL x marqueurs pourront être estimées avec une meilleure précision en cas de faible héritabilité.

On dispose dès lors d'un outil très efficace, en évolution constante, qui va rendre la sélection encore plus performante. Dans cette perspective, on peut envisager un schéma de sélection récurrente intégrant HD et SAM.

Schéma possible de création variétale récurrente avec SAM

Le schéma proposé comporte quelques variantes possibles (Figure VI.1). Il prend en compte l'utilisation de générations à contre-saison (hiver) pour la réalisation des opérations courantes d'autofécondations et de croisements. Les opérations lourdes, production de lignées HD et expérimentation agronomique, sont supposées être effectuées pendant la période normale de culture (printemps-été). Le testeur d'aptitude à la combinaison considéré est une lignée d'un groupe hétérotique complémentaire, potentiellement apte à servir de parent de variété hybride.

- Sélection sur valeur agronomique seule

A partir d'une population, un cycle de sélection de lignées HD sur la valeur

agronomique seule comporte quatre générations, réalisées en 2 ans (Figure VI.2) :

- 1) croisement de la population avec un inducteur d'haploïdes, ce travail peut être fait à contre-saison après la constitution de la population en période normale de culture,
- 2) production des lignées HD (H → HD), cette opération est réalisée en période normale de culture,
- 3) production des unités à évaluer, c'est-à-dire des hybrides expérimentaux qui sont le résultat du croisement entre les lignées HD et un testeur, opération effectuée à contre saison,
- 4) évaluation des hybrides expérimentaux (HD x Testeur), opération conduite en période normale de culture, dans plusieurs lieux.

A la fin de ce premier cycle, une sortie d'hybrides simples (HD x Testeur) pour la création variétale (1) et une sortie pour la sélection récurrente sont permises (2).

- Intégration de la SAM

La SAM peut être introduite à différents niveaux, soit sur la valeur des marqueurs seuls, soit sur la valeur d'un index associant valeur agronomique et marqueurs (Moreau *et al.* 2001). Toutefois avec une sélection sur marqueurs seuls, il faut noter que le premier cycle sera toujours sur une sélection combinée phénotype + marqueurs, puisqu'il faut d'abord déterminer les marqueurs associés à des QTL.

- Sélection sur marqueurs seuls

Si l'on suppose déterminés lors d'un cycle précédent, des marqueurs associés au caractère, alors dès l'identification des haploïdes et avant le traitement à la colchicine (A), deux issues sont possibles :

- i) des individus présentent les haplotypes recherchés, le processus est poursuivi jusqu'à la formation des lignées HD pour la création variétale (Figure VI.3),
- ii) aucun individu ne présente les haplotypes recherchés, on constitue alors des croisements par paires entre HD (Figure VI.4) présentant la meilleure complémentarité pour développer ainsi une nouvelle population améliorée (2) qui entrera dans un nouveau cycle.

Dans le cas des lignées sorties directement vers la création variétale, il sera ensuite nécessaire, d'évaluer leur aptitude à la combinaison. Ce cycle aura donc nécessité 4 générations, soit une durée équivalente au cycle avec sélection sur la valeur agronomique seule. Mais, le recours à la SAM pour un criblage au niveau haploïde, permet de réduire le nombre de plantes qui suivront le processus complet, H → HD. Avec des moyens constants,

soit un plus grand nombre d'individus, soit un plus grand nombre de populations pourront être traités.

Pour la sortie vers la sélection récurrente avec un cycle en 2 générations, la population améliorée est constituée sous forme d'hybrides F_1 qui entrent ensuite dans un nouveau cycle. Lorsque le nombre d'individus sélectionnés est faible, la population améliorée peut être constituée par croisements de type diallèle (toutes les combinaisons possibles). Lorsque le nombre d'individus est important (nécessaire pour maintenir une certaine variabilité), on peut alors faire des diallèles partiels « circulaires », un HD étant croisé à au moins 5-6 autres HD de telle sorte que tous les HD sélectionnés participent de la même façon. Enfin, il faut gérer les généalogies afin d'éviter la sélection des HD frères et minimiser le nombre de demi-frères.

○ Sur un index associant marqueurs et valeur agronomique

La SAM est intégrée, d'une part pour sélectionner, parmi les lignées HD de bonne aptitude à la combinaison, celles qui présentent les haplotypes recherchés (**B**) et d'autre part pour constituer la population améliorée à partir des individus présentant une bonne complémentarité (**B'**).

A ce niveau, il est possible d'intégrer une nouvelle variabilité. S'il s'agit d'une nouvelle lignée, elle sera croisée avec toutes les lignées sélectionnées pour constituer des structures F_1 qui seront gérées comme indiqué précédemment.

Remarques : Pour compléter le processus de création variétale, il peut être intéressant de prendre en compte les effets d'épistasie. On peut supposer que les plus forts effets d'épistasie pour l'aptitude spécifique à la combinaison avec le testeur se situent chez les lignées les plus performantes. Dans ce cas et selon la performance, quelques-unes (4 à 6) sont sélectionnées et croisées entre elles dans un plan de croisements diallèle pour étudier les F_1 ainsi constitués (3). Pour chaque croisement, la comparaison entre la valeur moyenne des parents et de l'hybride F_1 nous renseignera sur la présence d'épistasie. Si un croisement F_1 présente une supériorité par rapport à la moyenne de ses deux parents, il y aura présence d'épistasie positive. La production de lignées HD à partir de ce croisement pourrait nous permettre ensuite de sélectionner pour ce critère. L'évaluation agronomique doit être effectuée avec un nombre important de répétitions de façon à minimiser l'intervalle de confiance des moyennes et pouvoir mettre en évidence un effet qui, bien que très intéressant au niveau d'une variété, ne représente en général qu'une faible part de sa valeur.

On voit donc que ce système permet à chaque cycle de produire des unités de sélection qui peuvent servir indifféremment la création variétale et la sélection récurrente. Toutefois, il

sera nécessaire de très bien gérer les généalogies pour ne pas perdre trop rapidement la variabilité génétique en sélection récurrente. Il est donc indispensable de séparer, sélection récurrente et maintien d'une certaine variabilité, de ce qui est programme spécifique de valorisation des meilleurs HD vers la création variétale.

L'intégration de l'haplométrie et de la sélection assistée par marqueurs moléculaires devrait permettre d'améliorer de façon très significative l'efficacité des schémas de sélection récurrente pour la création variétale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Al-Yasiri S and Rogers OM. 1971.** Attempting chemical induction of haploidy using toluidine blue. *Journal of American Society of Horticultural Science*. 96 (1), 126-127.
- Ao GS , Zhao S and Li G. 1982.** *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of corn (*Zea mays* L.). *Acta Genetica Sinica*. 9, 281-283.
- Asselin de Beauvillé M. 1980.** Obtention d'haploïdes *in vitro* à partir d'ovaires non fécondés de riz, *Oryza sativa* L. *Compte-rendus de l'Académie des Sciences , Paris*. 290 (série D), 489-492.
- Baenziger PS, Wesenberg DM, Smail VM , Alexander WL and Schaeffer GW. 1989.** Agronomic performance of wheat doubled haploid lines derived from cultivars by anther culture. *Journal of Plant Breeding*. 103, 101-109.
- Barloy D and Beckert M. 1993.** Improvement of regeneration ability of androgenetic embryos by early anther transfer in maize. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 33, 45-50.
- Barloy D, Denis L and Beckert M. 1989.** Comparison of the aptitude for anther culture in some androgenetic doubled haploid maize lines. *Maydica*. 34, 303-308.
- Barret P, Brinkman M, Dufour P, Murigneux A and Beckert M. 2004.** Identification of candidate genes for *in vitro* androgenesis induction in maize. *Theoretical and Applied Genetics*. 109, 1660-1668.
- Beckert M. 1994.** Advantages and disadvantages of the use of *in vitro* / *in situ* produced DH maize plants. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Maize 25*. YPS Bajaj (Ed.). 201-213. Springer-Verlag.
- Bedó Z, Karsai I, Láng L and Vida Gy. 1996.** Breadmaking quality of doubled haploid lines of wheat. In: *In vitro Haploid Production in Higher Plants*. SM Jain, SK Sopory, RE Veilleux (Eds.). 93-109. Kluwer Academic Publishers.
- Bernard S and Jewell DC. 1985.** Crossing maize with sorghum, *Tripsacum* and millet: the products and their level of development following pollination. *Theoretical and Applied Genetics*. 70, 474-483.
- Bianchi A and Marchesi G. 1960.** The surface of the leaf in normal and glossy maize seedlings. *Zeitschrift für Vererbungslehre*. 91, 214-219.
- Bianchi A, Bianchi G, Avato P and Salamini F. 1985.** Biosynthetic pathways of epicuticular wax of maize as assessed by mutation, light, plant age and inhibitor studies. *Maydica*. 30, 179-198.
- Björnstad AH, Skinnnes H, Uhlen AK , Marum P and Marøy AG. 1993.** Genetic marker segregations in doubled haploids in spring wheat crosses. *Hereditas*. 118, 55-62.
- Bordes J, Charmet G, Dumas de Vault R, Pollacsek M, Beckert M and Gallais A. 2006.** Doubled-haploid versus S₁-family recurrent selection for testcross performance in a maize population. *Theoretical and Applied Genetics*. 112 (6), 1063-1072.
-

Bordes J, Dumas de Vaulx R, Lapierre A and Pollacsek M. 1997. Haplodiploidization of maize (*Zea mays* L.) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding. *Agronomie*. 17, 291-297.

Bouchez A and Gallais A. 2000. Efficiency of the use of doubled-haploids in recurrent selection for combining ability. *Crop Science*. 40, 23-29.

Brettel RIS, Thomas E and Wernicke W. 1981. Production of haploid maize plants by anther culture. *Maydica*. 26, 101-111.

Burr B and Burr FA. 1991. Recombinant inbreds for molecular mapping in maize: Theoretical and practical considerations. *Trends in Genetics*. 7, 55-60.

Chalyk ST. 1994. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding. *Euphytica*. 79, 13-18.

Charcosset A. 1990. Etude de l'hétérosis chez le maïs *Zea mays* L. : Prédiction de la valeur d'hybrides F1 sur la base d'informations agronomiques, biochimiques et moléculaires. Thèse de docteur INA Paris-Grignon.

Charcosset A. 2004. Le fait hybride, conditions de l'innovation et choix stratégiques. In : Colloque L'amélioration des plantes, continuités et ruptures. Montpellier (France), P Boistard, C Sabbagh, I Savini (Eds.). 4, 1-14. INRA Editions.

Charcosset A and Gallais A. 2003. Application of markers in selection. In: *Molecular markers in plants genetics and biotechnology*. De Vienne D (Ed.). 153-176. Science Publishers.

Charmet G and Branlard G. 1985. A comparison of androgenetic doubled haploid and single seed descent lines in Triticale. *Theoretical and Applied Genetics*. 71, 193-200.

Chase SS. 1949. Monoploid frequencies in a commercial doublecross hybrid maize, and in its component singlecross hybrids and inbred lines. *Genetics*. 34, 328-332.

Chase SS. 1952. Production of homozygous diploids of maize from monoploids. *Agronomy Journal*. 44, 263-267.

Chase SS. 1969. Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.). *Botanical Review*. 35, 117-167.

Chase SS and Nanda DK. 1965. Comparison of variability in inbred lines and monoploid-derived lines of maize. *Crop Science*. 5, 275-276.

Choo TM. 1981. Doubled haploids for estimating mean and variance of recombination values. *Genetics*. 97, 165-172.

Choo TM, Reinbergs E and Park SJ. 1982. Comparison of frequency distributions of doubled haploid and single seed descent lines in barley. *Theoretical and Applied Genetics*. 61, 215-218.

Chumak MV. 1979. The use of haploidy in breeding maize. In: *Proceedings 10th Meeting of the Maize and Sorghum, section Eucarpia*. Varna (Bulgarie), 145-151.

- Cockerham CC and Weir BS. 1977.** Two-locus theory in quantitative genetics. In: Proceedings of the International Conference on Quantitative Genetics. E Pollak, O Kempthorne, TB Bailey Jr (Eds.). 247-269. Iowa State University Press.
- Coe EH and Sarka KR. 1964.** The detection of haploids in maize. *Journal of Heredity*. 55, 231-233.
- Coe EH. 1959.** Mutation of CI - a line with 2 - 3% haploids. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 30, 96-99.
- Comstock RE and Robinson HF. 1952.** Estimation of average dominance of genes. In: *Heterosis*. JW Gowen (Ed.). 494 -516. Iowa State College Press, Ames.
- Crow JF and Kimura M. 1970.** An introduction to population genetics theory. Harper and Row Publishers, New-York (USA).
- De Wet JM, Newell JCA and Brink DE. 1984.** Counterfeit hybrids between *Tripsacum* and *Zea* (Gramineae). *American Journal of Botany*. 71, 245-251.
- Deanon JR. 1957.** Treatment of sweet corn silks with maleic hydrazide and colchicine as means of increasing the frequency of monoloids. *Philippine Agriculturist*. 41, 364-377.
- Deimling S, Röber F and Geiger H H. 1997.** Methodik und Genetik der in-vivo-Haploideninduktion bei Mais. *Vorträge für Pflanzenzüchtung*. 38, 203-204.
- Dieu P and Beckert M. 1986.** Further studies of androgenetic embryo production and plant regeneration from in vitro cultured anthers of maize (*Zea mays* L.). *Maydica*. 31, 245-260.
- Donn G, Nilges M and Morocz S. 1990.** Stable transformation of maize with a chromatic, modified phosphotransferase gene from *Streptomyces vividochromogenes*. In: VIIth International Congress Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam (The Netherlands), abstract.
- Doré C. 1990.** *Asparagus*: anther culture and field trials of dihaploids and F₁ hybrids. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Y Bajaj (Ed.). 12, 322-345. Springer-Verlag.
- Doré C and Marie F. 1993.** Production of gynogenetic plants of onion (*Allium cepa* L.) after crossing with irradiated pollen. *Plant Breeding*. 111, (2), 142-147.
- Doré C, Prigent J and Desprez B. 1996.** *In situ* gynogenetic haploid plants of chicory (*Cichorium intybus* L.) after intergeneric hybridization with *Cicerbita alpina* Walbr. *Plant Cell Reports*. 15, 758-761.
- Dufour P, Antoine-Michard S, Johnson C, Cheng R, Murigneux A and Beckert M. 2001.** Segregation distortion at marker loci : Variation during microspore androgenesis in maize. *Theoretical and Applied Genetics*. 102, 593-1001.
- Dumas de Vault R and Chambonnet D. 1986 .** Obtention of embryos and plants from *in vitro* culture of unfertilized ovules of *Cucurbita pepo*. In: *Genetic Manipulation in Plant Breeding*. W Horn, CJ Jensen, W Odenbach, O Schieder (Eds.). 295-297. De Gruyter, W (Berlin).
-

- Dumas de Vaulx R and Pochard E. 1986.** Parthénogenèse et androgenèse chez le piment. Rôle actuel dans les programmes de sélection. *Le Sélectionneur Français*. (36), 3-16.
- Eder J and Chalyk S. 2002.** In vivo haploid induction in maize. *Theoretical and Applied Genetics*. 104, 703-708.
- Falconer DS. 1981.** Introduction to Quantitative Genetics. 2nd edition. 340 p. Longman Group Ltd (London, UK).
- Ford L. 1952.** Some cytogenetic aspects of maize monoploids and monoploid derivatives . Ph D. Thesis Iowa State College, USA.
- Gallais A. 1974.** Covariances between arbitrary relatives with linkage and epistasis in the case of linkage disequilibrium. *Biometrics*. 30, 429-446.
- Gallais A. 1979a.** Le concept de valeur en lignées d'un génotype et son utilisation possible en sélection. *Annales de l'Amélioration des Plantes*. 29 (1), 22.
- Gallais A. 1979b.** The concept of varietal ability in breeding. *Euphytica*. 28, 811-823.
- Gallais A. 1988.** A method of line development using doubled haploids: the single doubled haploid descent recurrent selection. *Theoretical and Applied Genetics*. 75, 330-332.
- Gallais A. 1989.** Optimization of recurrent selection on the phenotypic value of doubled haploid lines. *Theoretical and Applied Genetics*. 77, 501-504.
- Gallais A. 1990a.** Quantitative genetics of doubled haploid populations and application to the theory of line development. *Genetics*. 124, 199-206.
- Gallais A. 1990b.** Application of the concepts of the test value and of varietal value to the study of genetic advance in recurrent selection. *Euphytica*. 48, 197-209.
- Gallais A. 1990c.** Théorie de la sélection en amélioration des plantes. Masson (Paris).
- Gallais A. 1991.** A general approach for the study of a population of test-cross progenies and consequences for the recurrent selection. *Theoretical and Applied Genetics*. 81, 493-503.
- Gallais A. 1993.** Efficiency of recurrent selection methods to improve the line value of a population. *Plant Breeding*. 111, 31-41.
- Gardner CO and Lonnquist JH. 1959.** Linkage and the degree of dominance of genes controlling quantitative characters in maize. *Agronomy Journal*. 51, 524-528.
- Geiger HH, Roux SR and Deimling S. 1994.** Herbicide resistance as a marker in screening for maternal haploids. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 68, 99.
- Genovesi D and Collins B. 1982.** In vitro production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Science*. 22, 1137-1144.
- Goldringer I, Brabant P and Gallais A. 1997.** Estimation of additive and epistatic genetic variances for agronomic traits in a population of doubled haploid lines of wheat. *Heredity*. 79, 60-71.
-

Greeblatt I and Bock M. 1997. A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. *Journal of Heredity*. 79, 60-71.

Griffing B. 1975. Efficiency changes due to use of doubled-haploids in recurrent selection methods. *Theoretical and Applied Genetics*. 46, 367-386.

Gyulavari B. 1975. Studies on the monoploid method and their results. In: Some methodological achievements of the hungarian hybride maize breeding. I Kovacs (Ed.).

Haldane JBS and Waddington CH. 1931. Inbreeding and linkage. *Genetics*. 16, 357-374.

Hallauer AR and Miranda JB. 1981. Quantitative genetics in maize breeding. Iowa State University Press, USA.

Hamza S, Camilleri C, Pollien JM, Vaucherret H, Bourgin JP and Chupeau Y. 1993. Selection for spontaneous tomato haploids using a conditional lethal marker. *Theoretical and Applied Genetics*. 86, 657-664.

Hayes HK and Brewbaker HE. 1928. Glossy seedlings in maize. *American Naturalist*. 62, 228-235.

Henry H, Bernard S, Bernard M, Gay G, Marcotte JL and De Buyser J. 1993. Nuclear gametophytic genes from chromosome arm IRS improve regeneration of wheat microspore-derived embryos. *Genome*. 36, 808-814.

Hinze LL and Lamkey KR. 2003. Absence of epistasis for grain yield in Elite maize hybrids. *Crop Science*. 43, 46-56.

Huang N, Courtois B, Khush GS, Lin H, Wang G, Wu P and Zheng K. 1996. Association of quantitative traits loci for plant height with major dwarfism genes in rice. *Journal of Heredity*. 77, 130-137.

Hull FG. 1945. Recurrent selection and specific combining ability in corn. *Journal of American Society of Agronomy*. 37, 134-145.

Jaby C. 1996. Représentativité et stabilité des lignées haploïdes doublées de maïs par une approche moléculaire. Diplôme Universitaire Supérieur, Université Blaise-Pascal, Clermont-Ferrand (France), 24 p.

James J. 1978. Maize x Sorghum. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 52, 119.

Kato A. 2002. Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. *Plant Breeding*. 121, 370-377.

Kermicle JL. 1969. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. *Science*. 166, 1422-1424.

Knapp SJ, Stroup WW and Ross WM. 1985. Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. *Crop Science*. 25, 192-194.

Lacadena JR. 1974. Spontaneous and induced parthenogenesis and androgenesis in haploids in higher plants. In: *Haploids in higher plants*. KJ Kasha (Ed.), 13. University of Guelph

(USA).

Lamkey KR, Schnicker BJ and Melchinger AE. 1995. Epistasis in an elite maize hybrid and choice of generation for inbred line development. *Crop Science*. 35, 1272-1281.

Lashermes P. 1987. Gynogénèse *in vivo* chez le maïs (*Zea mays* L.), étude génétique et physiologique, utilisation en sélection. Thèse d' Université Clermont II, n°58, Clermont-Ferrand (France). 183 p.

Lashermes P and Beckert M. 1988. A genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L) and selection of haploid inducing lines. *Theoretical and Applied Genetics*. 76, 405-410.

Ma H, Busch R, Riera-Lizarazu O and Rines H. 1999. Agronomic performance of lines derived from anther culture, maize pollination and single-seed descent in a spring wheat cross. *Theoretical and Applied Genetics*. 99, 432-436.

Magoon ML and Khanna KR. 1963. Haploids. *Cariologia*. 16, 191.

Malécot G. 1948. Les mathématiques de l'hérédité. 63 p. Masson et Cie, Paris.

Marhic A, Antoine-Michard S, Bordes J, Pollacsek M, Murigneux A and Beckert M. 1998. Genetic improvement of anther culture response in maize : relationship with molecular, Mendelian and agronomic traits. *Theoretical and Applied Genetics*. 97, 520-525.

Melchinger AE. 1984. Effects of recombination in the parental populations on the means and combining ability variances in hybrid populations of maize (*Zea mays* L.). Ph D Thesis, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.

Melchinger AE, Geiger H, Utz H and Schnell F. 2003. Effect of recombination in the parent populations on the means and combining ability variances in hybrid populations of maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 106 (2), 332-340.

Miao SH, Kuo CS, Kwei YL, Sun AT, Ku WL, Wang YY, Cheng ML, Wu MK and Hang L. 1978. Induction of pollen plants of maize and observation of their progeny. In: *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*. Pekin (China), H Ku (Ed.). 23-33. Pitman Publ Ltd, London (UK).

Mitchell MJ, Bush RH and Rines HW. 1992. Comparison of lines derived by anther culture and single seed descent in a spring wheat cross. *Crop Science*. 32, 1446-1451.

Moreau L, Charcosset A and Gallais A. 2001. Experimental evaluation of marker-assisted selection efficiency in maize population. In: 7th QTL-MAS workshop. Valencia (Spain), 31.

Moreno-Gonzalez J and Dudley JW. 1981. Epistasis in related and un related maize hybrids determined by three methods. *Crop Science*. 21, 645-651.

Muller JF, Goujaud J and Caboche M. 1985. Isolation in vitro of naphthaleneacetic acid-tolerant mutants of *Nicotiana tabacum* which are impaired in root morphogenesis. *Molecular and General Genetics*. 199, 194-200.

Murigneux A, Barloy D, Leroy P and Beckert M. 1993. Molecular and morphological

evaluation of doubled haploid lines in maize. 1. Homogeneity within DH lines. Theoretical and Applied Genetics. 86, 837-842.

Murigneux A, Bentolila S, Hardy T, Baud S, Guitton C, Jullien H, Ben Tahar S, Freyssinet G and Beckert M. 1994. Genotype variation of quantitative trait loci controlling in vitro androgenesis in maize. Genome. 37, 970-976.

Nanda DK and Chase SS. 1966. An embryo marker for detecting monoploids of maize. Crop Science. 6, 213-215.

Neuffer MG, Coe E and Wessler SR. 1997. The mutants of maize. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Nitsch C, Anderson S, Godard M, Neuffer MG and Sheridan WF. 1982. Production of haploid of *Zea mays* and *Pennisetum* through androgenesis . In: Variability in Plants Regenerated from Tissue Culture. ED Earle , Y Demarly (Eds.). 69-91 .

Park SJ, Walsh EJ, Reinbergs E, Song LSP and Kasha K. 1976. Field performance of doubled haploid barley lines in comparison with lines developed by the pedigree and single seed descent methods Canadian. Journal of Plant Science. 56, 467-474.

Pelletier G, Ferault M, Goujaud J, Vedele F and Caboche M. 1987. The use of rootless mutants for the screening of spontaneous androgenetic and gynogenetic haploids in *Nicotiana tabacum* : evidence for the direct transfer of cytoplasm. Theoretical and Applied Genetics. 75, 13-15.

Pendleton JW, Smith GE, Winter SR and Johnston TJ. 1968. Field investigations of the relationships of leaf angle in corn (*Zea mays L.*) to grain yield and apparent photosynthesis. Agronomy Journal. 60, 422-424.

Petolino JF and Jones AM. 1986. Anther culture of elite genotypes of maize. Crop Science. 26, 1072-1074.

Powell WW, Thomas TB and Thompson DM. 1992. The agronomic performance of anther culture derived plants of barley produced via pollen embryogenesis. Annals of Applied Biology. 120, 137-150.

Prensky W. 1960. Induction of monoploidy. Maize Genetics Cooperation Newsletter. 34, 43-44.

Randolph LF. 1938. Note on haploid frequencies. Maize Genetics Cooperation Newsletter. 12, 12.

Riggs TJ and Snape JW. 1977. Effects of linkage and interaction in a comparison of theoretical populations derived by diploidized haploids and single seed descent methods. Theoretical and Applied Genetics. 49, 111-115.

Robinson HF, Cockerham CC and Moll RH. 1960. Studies on estimation of dominance variance and effects of linkage bias In: International Series of Monographs on Biometry, Proceedings of an International Symposium, Ottawa, 08/1958. O Kempthorne (Ed.). 171-177.

Rosnagel BG, Sariah MA and Kao KN. 1987. Field evaluation of anther culture derived breeding materials compared to materials developed by the pedigree and single seed descent methods in barley (*Hordeum vulgare*). In: Barley Genetics V. 997-1004. Edinburgh University Press (GB).

San Noeum LH. 1976. Haploïdes d' *Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* d'ovaires non fécondés. Annales de l'Amélioration des Plantes. 26, 751-754.

Sarkar KR and Coe EH. 1966. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize. Genetics. 54, 453-464.

Sarkar KR, Pandey A, Gayen P, Madan JK, Kumar R and Sachan JKS. 1994. Stabilization of high haploid inducer lines. Maize Genetics Cooperation Newsletter. 68, 65-66.

SAS Institute Cary NC. 2000. SAS/STAT user's guide. 8th Ed. SAS Institute, Cary (NC).

Scheffe H. 1959. The analysis of variance. Wiley, New-York (USA).

Schnable PS, Stinard PS, Wen TJ, Heinen S, Weber D, Zhang L, Hansen JD and Nikolau BJ. 1994. The genetics of cuticular wax biosynthesis. Maydica. 39, 279-287.

Schnell FW. 1961. Some general formulations of linkage effects in inbreeding. Genetics. 46, 947-957.

Seaney RR. 1955. Studies on monoploidy in maize . Ph D Thesis, Cornell University, USA.

Shatskaya OA, Zabirova ER, Shcherbak VS and Chumak MV. 1994. Mass induction of maternal haploids in corn. Maize Genetics Cooperation Newsletter. 68, 51.

Shull GH. 1908. The composition of a field of maize. American Breeders Association Reports. 4, 296-301.

Shull GH. 1914. Duplicate genes for capsule form in *Bursa-pastoris*. ZIAV .12, 97-149.

Shull GH. 1948. What is "heterosis" ?. Genetics. 33, 439-446.

Snape JW. 1976. A theoretical comparison of diploidized haploid and single seed descent populations. Heredity. 36, 275-277.

Snape JW and Simpson E. 1981. The use of doubled haploid lines for genetic analysis in barley. In: Barley Genetics IV. 704-709. Edinburgh University Press (GB).

Sprague GF and Federer WT. 1951. A comparison of variance components in corn yield trials: II. Error, year x variety, location x variety, and variety components. Agronomy Journal. 43, 535-541.

Stalker HT, Harlan JR and DeWet JMJ. 1977. Cytology and morphology of maize-*Tripsacum* introgression. Crop Science. 17, 745-748.

Strahwald JF and Geiger HH. 1988. Theoretical studies on the usefulness of doubled-haploids for improving to efficiency of recurrent selection in spring barley In: 5th Meeting of

the EUCARPIA Section “Biometrics in Plant Breeding”. 1-12.

Strauss J. 1959. Anthocyanin synthesis in corn endosperm tissue cultures. I. Identity of the pigments and general factors. *Plant Physiology*. 34, 536-541.

Suenaga K and Nakajima K. 1993. Segregation of genetic markers among wheat doubled haploid lines derived from wheat × maize crosses. *Euphytica*. 65, 145-152.

Suenaga K. 1994. Doubled Haploid System using the intergeneric crosses between wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*). *Bulletin of Natural Institute of Agrobiological Resource*. 9, 83-139.

Thomson DL. 1954. Combining ability of homozygous diploids of corn relative to lines derived by inbreeding. *Agronomy Journal*. 46, 134-136.

Troyer AF. 1996. Breeding widely adapted, popular maize hybrids. *Euphytica*. 92, 163-174.

Truong-André I and Demarly Y. 1984. Obtaining plants by *in vitro* culture of unfertilized maize ovaries (*Zea mays* L.) and preliminary studies on the progeny of gynogenetic plant. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*. 92, 309-320.

Weir BS, Cockerham CC and Reynolds I. 1980. The effects of linkage and linkage disequilibrium on the covariances of non-inbred relatives. *Heredity*. 45, 351-359.

Weyhrich RA, Lamkey KR and Hallauer AR. 1998. Responses to seven methods of recurrent selection in the BS11 maize population. *Crop Science*. 38, 308-321.

Wolf DP and Hallauer AR. 1997. Triple testcross analysis to detect epistasis in maize. *Crop Science*. 37, 763-770.

Wolf DP, Peternelli LA and Hallauer AR. 2000. Estimates of genetic variance in an F2 maize population. *Journal of Heredity*. 91 (5), 384-391.

Yudin BF and Khvatova MN. 1996. [The question of cognizance and application of haploidy and polyploidy to corn selection]. *Genetika*. 3, 60-67.

Zabirova ER, Chumak MV, Schatskaya OA and Shcherbak VS. 1996. The mass accelerated production of homozygous lines. *Kukuruza i Sorgo*. 4, 17-19.

Zavalishina AN and Tyrnov VS. 1992. Induction of matroclinal haploidy in maize *in vivo*. In: XIIIth Eucarpia Congress, Reproductive Biology and Plant Breeding. Angers (France), 221-222.

Zhu ZC and Wu HS. 1979. *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* and *Nicotiana tabacum*. *Acta Genetica Sinica*. 6, 181-184.

Annexe 1

**DESCRIPTIF DU MATERIEL GENETIQUE
CONVERTI AVEC DIFFERENTS ALLELES GLOSSY**

LIGNEES		ALLELES <i>glossy</i>			
Origines	Nom	<i>gl 1</i>	<i>gl 2</i>	<i>gl 3</i>	<i>gl 6</i>
4.29 x NWD 644	A 188		+		
A 405 x CC 36	A 427 (su 1)			+	
(A 171 x 0443) 0443	A 619				+
ND 203 x B 14	A 641				
CMI x ETO	ARG1138				+
B 555 (RS) C ₅	B 73		+		+
Pioneer 3995	CL 35	+			
Sel from Greece	CM 48		+		
V 3 x B 14 ²	CM 105				+
V 3 x B 14 ²	CM 174 (su 1)			+	
Dekalb 46	C0 158				
(C109 x 190) BCCO 109 ³	C0 220		+		
INRA 258	C0 255	+			
(B68 x B37 HT x C103 x Mp3204 double cross)	De 811				+
Population Lacaune (F)	F 2	+			
Population Larruns (F)	F 72	+			
F 22 x EP 1 ³	F 120	+			
F 115 x W 33	F 195				+
F 188 x F 186	F 244		+		
W 401 x CM 7	F 250		+		
F 186 x C0 125	F 252		+		
C 0 169 x W 401	F 259		+		
C0 125 x W 103	F 271		+		
F 113 x F 186	F 272		+		
F 252 x F 277	F 303		+		
F 49 x F 21	F 1254	+			
W 153 R x F 26	F 1444	+ et y **			
Syn. cornée (60 Pop, F2, F65)	F 1933	+			
Composite corné x (F492 x F 712)	F 1947	+			

(F 564 x F 576) x Yu21	F 7001	+			
Iodent	Io	+	+	+	+
187. 2 x C 103	Mo 17		+		
O.P. Golden glow	W 23		+		
Pop Minn 13	W 79 A		+		
Rec Io 153	W 153 R				+
(W33 x W 25) x W67 C	W 401	+			

** forme blanche

(su1 = peut contenir l'allèle récessif su1, "sugary 1")

+ = niveau 5 rétrocroisements ou plus.

PROTOCOLE (1998)

**PRODUCTION DE LIGNEES DE MAÏS HAPLOIDES
DOUBLEES PAR GYNOGENESE *IN SITU***

J BORDES, A LAPIERRE, J F CHARMET, B COUDERT, M POLLACSEK

SOMMAIRE

- REFERENCES
- MODE OPERATOIRE
- MATERIELS ET FOURNISSEURS

REFERENCES

Beckert M (1986) Quelques systèmes de production de plantes haploïdes chez le maïs. Perspectives d'utilisation. Le Sélectionneur français 1986 (36) 29 - 46.

Lashermes P (1987) *Gynogenèse in vivo chez le maïs (Zea mays L.) études génétique et physiologique, utilisation en sélection.* Thèse de l'Université de Clermont II, France (n° d'ordre 58), 183 p

Remarques générales. La détection des haploïdes est réalisée avec le gène "glossy" introduit au préalable dans le matériel à sélectionner. Le niveau moyen d'induction de 1% et le taux moyen d'obtention de descendances de 20 à 60% entraînent certaines contraintes supplémentaires par rapport au système traditionnel de création de lignées en sélection généalogique.

MODE OPERATOIRE

1 INDUCTION DES HAPLOÏDES

Croisement avec l'inducteur **FIGH1: date de floraison = W182 E + 2 jours**

Le tallage important de cet inducteur favorise une période assez longue d'émission de pollen par une même plante (7 à 10 jours)

2 possibilités

a) en parcelle d'isolement

Les densités de semis devront être très faibles de façon à avoir une castration à 100%. La moindre panicule oubliée entraînerait la production d'un grand nombre de plantes "*glossy*" diploïdes.

b) par croisements manuels

La castration du matériel "*glossy*" femelle est conseillée pour éviter les pollinisations accidentelles.

Remarques. L'inducteur FIGH1 possède un gène dominant de coloration du grain (couche à aleurone). La plupart du temps, ce caractère permet de s'assurer de la qualité du croisement. Toutefois certains matériels génétiques possèdent un inhibiteur dominant de coloration et ce contrôle n'est alors plus possible. C'est par exemple le cas des lignées F271, F252, F244, F257... A l'égrenage, sur les épis des plantes femelles n'ayant pas l'inhibiteur à l'état homozygote, donc a priori devant présenter 100% de grains pigmentés, tout grain jaune doit être éliminé. Cette remarque ne s'applique pas aux plantes hétérozygotes pour l'inhibiteur car les épis sont en ségrégation (50% colorés - 50% non colorés).

2 SEMIS EN PLAQUETTES ALVEOLEES

Les semis sont réalisés dans des plaquettes à 96 alvéoles. La densité est en principe de 3 grains par alvéole. Le support est de la vermiculite.

Une personne peut préparer environ 50 plaques par jour.

Il est conseillé de garder la structuration par épi. Cela permet de localiser des erreurs de croisement éventuelles.

Remarque. La vermiculite permet, contrairement au terreau, de réaliser les semis à n'importe quelle période. Il n'y a pas de germination tant que les plaques ne sont pas arrosées.

3 MISE EN GERMINATION

Elle est réalisée en serre ou sous abri. La rétention en eau relativement faible de la vermiculite oblige à un arrosage fréquent. Un stress en eau entraîne une sortie des racines de l'alvéole et une dessiccation quelquefois irréversible des feuilles.

Remarque Par rapport au terreau, la levée est plus hétérogène mais cela n'a pas de conséquences pour la suite.

7 AUTOFECONDATIONS

En moyenne, environ 50 à 60% des plantes produisent du pollen. Dès l'apparition des stigmates on réalise une autofécondation puis on répète ensuite l'opération tant qu'il y a émission de pollen. Ceci conditionne le nombre de descendances obtenues. Les panicules ne sont pas isolées, cela évite un effet de serre qui réduit l'efficacité du pollen. Nous n'avons jamais remarqué de pollution à ce niveau là.

Remarque Il est nécessaire de répéter les opérations d'autofécondation. Cela augmente les chances de faire coïncider un anthérozoïde et une oosphère viable. La présence de pollen indique un doublement chromosomique réussi au niveau de la panicule mais il n'y a pas d'indicateur au niveau des ovules. En l'absence de stress, une plante haploïde émet presque systématiquement des soies.

8 OBTENTION DE DESCENDANCES

Dans 20 à 60% des cas, il y a production de grains. Malgré un pourcentage de production de pollen identique, le taux de descendances obtenues à partir du matériel corné européen est en moyenne inférieur au matériel denté américain.

Il est souhaitable, environ 3 semaines à un mois après la dernière autofécondation d'ouvrir les spathes. Cela évite dans certains cas, notamment en cas d'attaque de pucerons, la pourriture des grains.

Remarque le nombre moyen de grains par épi est relativement faible (3 à 6), il peut varier de 1 à 50.

MATERIELS ET FOURNISSEURS (1998)

- **Plaques alvéolées 50 x 30 en PVC réutilisables blanc épais**

96 godets Ø 3.4 cm hauteur 4 cm	<i>Fournisseur : PUTEAUX</i>
51 godets Ø 4.5 cm hauteur 5.5 cm	<i>8.- 10 Place de la loi BP : 67</i>
38 godets Ø 5.5 cm hauteur 5.5 cm	<i>78 152 Le Chesnay Cedex</i>
Environ 300 fr les 25 plaques	

- **Vermiculite**

72 fr le sac de 100 litres	<i>Fournisseur : magasins de matériaux de construction</i>
----------------------------	--

- **Colchicine**

228fr le gramme	<i>Fournisseur : SIGMA ALDRICH CHIMIE</i>
	<i>L' isle d 'Abeau Chesnes BP : 701</i>
	<i>38 297 St quentin Fallavier</i>

- **Matériel de serre**

Pots pour repiquage en polypropylène noir 9 x 9 x 10 cm	<i>Fournisseur : DURANTIN</i>
Conteneurs drainés 11 litres	<i>1368 , Route du Bas Privas</i>
1 / 2 Tourbe blonde (55 fr / 250 l)	<i>69 390</i>
<i>CHARLY</i>	

1 / 2 Pouzzolane (60 fr / m3)	<i>Fournisseur : Pouzzolane des Dômes</i>
1 / 2 Terreau + 1 / 2 Tourbe blonde	<i>Le Vauriat</i>
	<i>63 230 St Ours les Roches</i>

- **Tunnels (Durantin)**

7 m x 18 m (capacité de 450 plantes environ)

- * Structure métallique, toile, éléments de montage (16 000fr tarif 92)
- * Baches noires (inter lignes) ou toile hors sol 700fr le rouleau de 160m2 (*Durantin*)

- **Irrigation**

Tuyaux + asperseurs pour tunnel	<i>Fournisseur : France. Irrigation</i>
Tuyaux + goutteurs pour serre	<i>Z A C Les Fresnes n°5</i>
	<i>13 109 SIMIANE COLLONGUE</i>

- **Apport nutritif** solution maison ou solution du commerce

- **Traitements insecticides**

Appareil de traitement : Diffuseur pour serre : (30.000 fr)

Fournisseur : Mr JOST JP
Rue des Remparts BP : 3
67 120 DORLISHEIM

Title: Generation of doubled haploid maize lines through induced gynogenesis: improvement of the method and integration in selection schemes.

SUMMARY

The intraspecific crossing technique used to induce the in situ gynogenesis in maize was improved to make reliable the production of doubled haploid (DH) lines. The theoretical and practical interest of DH line integration in a breeding programme was compared to the conventional methods.

The development of more efficient inductive genotypes was the main improvement of the technique. Thus, the average percentage of haploid plants obtained in a progeny, increased from approximately 2.5 per 100 for the control inductor WS14 to approximately 5 for PK6 and 7 for FIGH3, the new selected inductors. The introduction of dominant characters, as cherry and purple embryo markers, into the new inductors, makes much easier the identification of haploid plants in the progenies. The mating design varying the number of recombination generations before production of doubled haploid lines (DH), allows to detect linkage disequilibrium and epistasis effects by comparison of means and variances from lines obtained at different generations.

The DH technique was applied to genotypes belonging to a large genetic variability pool, and most of the tested material was reactive to the improved gynogenesis induction technique. DH line phenotypes are very similar to those of Single Seed Descent lines (SSD), obtained by repeated selfing.

Concerning the hybrid value, particularly grain yield, the genetic variance of DH lines is almost twice higher than genetic variance of the parental S_1 families. This result was expected. But, it was not expected the higher DH genetic variance in comparison with genetic variance of SSD lines resulting from the same S_1 families. This could mean that a selection deviation was introduced during generations of SSD lines production.

Per recurrent selection cycle, a higher genetic variance and a lower residual variance induce a higher heritability and thus, a better efficiency of DH lines compared to S_1 families. Per unit of time, and cost-unit, the efficiency of the two methods is equivalent. Applied to an integrated programme of recurring selection for variety creation, the doubled-haploids method seems very effective.

The main results from this thesis, demonstrate that the doubled-haploid method elaborated in this work, is now a very effective and interesting method for maize breeding oriented to obtain performing F_1 hybrids.

This efficiency of the DH method could be increased in combination with molecular marker-assisted selection (MAS).

Titre : Création de lignées haploïdes doublées de maïs par gynogenèse induite *in situ* : amélioration de la méthode et intégration dans les schémas de sélection

RÉSUMÉ

L'amélioration de la technique des croisements intraspécifiques, permettant d'induire *in situ* la gynogenèse afin de fiabiliser la production de lignées haploïdes doublées de maïs, a été entreprise. L'intérêt, tant théorique que pratique, de son intégration dans les schémas de sélection, par rapport aux méthodes conventionnelles a été évalué.

Les différentes améliorations ont porté notamment sur la mise au point de génotypes inducteurs plus performants. Ainsi, le pourcentage moyen de plantes haploïdes obtenues, est passé d'environ 2,5 pour WS14 à environ 5 pour PK6 et 7 pour FIGH3. L'introduction de caractères dominants, *Cherry* et *Purple embryo marker*, dans les nouveaux inducteurs, facilite l'identification des plantes haploïdes.

Les plans de croisements, faisant varier le nombre de générations de recombinaisons avant la production de lignées haploïdes doublées (HD), permettent de détecter les déséquilibres de liaison et les effets d'épistasie, par la comparaison des moyennes et variances des lignées à différentes générations.

Avec la très large variabilité génétique du matériel végétal utilisé, il n'a généralement pas été observé de génotypes ne répondant pas à l'induction de la gynogenèse. Les lignées HD ont des phénotypes très semblables à ceux des lignées SSD, obtenues par autofécondations répétées (*Single Seed Descent*).

Pour la valeur hybride, au niveau du rendement notamment, la variance génétique des lignées HD est presque deux fois supérieure à celle des familles S_1 dont elles sont issues, ce qui était attendu. En revanche, contrairement à ce qui était attendu, elle semble aussi supérieure à celle des lignées SSD issues des mêmes familles S_1 . Ceci pourrait signifier qu'un biais de sélection a été introduit au cours des générations de production des lignées SSD.

Par cycle de sélection récurrente, une variance génétique supérieure et une variance résiduelle inférieure induisent une plus forte héritabilité et donc, une meilleure efficacité des lignées HD par rapport aux familles S_1 . Par unité de temps, et par unité de coût, l'efficacité des deux méthodes est équivalente. S'il s'agit d'un programme intégré de sélection récurrente pour la création variétale, l'haplométhode semble beaucoup plus efficace.

L'ensemble des travaux menés dans cette thèse, conduit à considérer l'haplométhode, comme une méthode efficace et intéressante pour la sélection d'hybrides F_1 de maïs.

Cette efficacité pourra être accrue par l'intégration de la sélection assistée par marqueurs moléculaires (SAM), dans les schémas de sélection.
