

Tentative de gynogenèse induite par pollen irradié chez les bananiers *Musa acuminata*

H LEBLANC
JL MORENO
Unidad Biotecnología
CATIE
7170 Turrialba
Costa Rica

JV ESCALANT
CIRAD-FLHOR
CATIE
7170 Turrialba
Costa Rica

C TEISSON
Laboratoire BIOTROP
CIRAD
BP 5035
34032 Montpellier cedex 01
France

Reçu : octobre 1993
Accepté : janvier 1995

Tentative de gynogenèse induite par pollen irradié chez les bananiers *Musa acuminata*.

RÉSUMÉ
Afin d'obtenir des plantes homozygotes à partir de diploïdes séminifères, la gynogenèse induite par pollen irradié de *Musa balbisiana* type TANI, ou par pollen d'espèces ornementales, *M ornata* et *M becarii*, a été étudiée sur les sous-espèces *burmannicoides* et *malaccensis* de *M acuminata*. Même après une irradiation à 1000 Gy, le pollen a pu germer à plus de 50%. Le tube germinatif croît et peut atteindre l'ovule à toutes les doses d'irradiation testées. Dans le pollen irradié, la désorganisation de la structure nucléaire du noyau reproducteur a été démontrée. Le taux de graines anormales augmente avec la dose d'irradiation utilisée. Le sauvetage par la culture *in vitro* des embryons issus de graines sans endosperme a permis, dans certains cas de fécondation, d'obtenir de nombreuses plantes qui se sont révélées être des hybrides, à part deux d'entre elles présentant un nombre anormal de chromosomes ($9 < 2n < 13$).

MOTS CLÉS

Musa, gynogenèse, pollen, irradiation, haploïdie.

Induced gynogenesis using irradiated pollen in *Musa acuminata* bananas.

ABSTRACT
In order to obtain homozygous plants from wild diploid species, induced gynogenesis by irradiated pollen of *Musa balbisiana* type TANI and *Musa ornata* and *Musa becarii* ornamental species was studied in the *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* and *Musa acuminata* ssp *malaccensis* subspecies. Pollen is capable of over 50% germination even after irradiation at 1000 Gy. The pollen tubes grow and can reach the ovule at all of the irradiation doses tested. In the case of irradiated pollen, the disorganisation of the nuclear structure of the reproductive nucleus has been demonstrated. The percentage of abnormal seeds increases with the irradiation dose used. The *in vitro* rescue of the embryos from endosperm-free seeds allowed the obtention of numerous plants, all of which were shown to be hybrids apart from two which were found to have an abnormal chromosome number ($9 < 2n < 13$).

KEYWORDS

Musa, gynogenesis, pollen, irradiation, haploidy.

Ginogénesis inducida con polen irradiado en los bananos *Musa acuminata*.

RESUMEN
Para obtener plantas homocigotas a partir de los diploides silvestres, la ginogénesis inducida con polen irradiado de *Musa balbisiana* tipo TANI y de polen de las especies ornementales *M ornata* y *M becarii* ha sido estudiada sobre las subespecies *burmannicoides* y *malaccensis* de *M acuminata*. El polen conserva más de 50% de su capacidad de germinación a ún después de una irradiación de 1000 Gy. El tubo germinativo crece y puede alcanzar el óvulo a cualquiera de las dosis de irradiación utilizada. En el polen irradiado, se demostró la desorganización de la estructura nuclear del núcleo reproductivo. Conforme aumenta la dosis de irradiación utilizada, se incrementa el porcentaje de semillas anormales. El rescate *in vitro* de los embriones procedentes de semillas sin endospermo permitió obtener numerosas plantas, todas presentando un patrón híbrido. Sin embargo, dos de ellas presentaban un número cromosómico anormal ($9 < 2n < 13$).

PALABRAS CLAVES

Musa, ginogénesis, polen, irradiación, haploïdia.

● introduction

Dans le cadre de l'amélioration génétique des bananiers et bananiers plantains, l'obtention de plantes homozygotes à partir des diploïdes séminifères est d'une grande importance (BAKRY *et al*, 1990). S'il est possible d'obtenir de telles plantes par autofécondations successives, cela reste un processus fastidieux et long (8 à 10 ans). Les techniques de biotechnologie et de culture de tissus, androgenèse et gynogenèse induite, offrent la possibilité d'obtenir de telles plantes en un temps plus court (DEMARLY et SIBI, 1989). Cependant, très peu de travaux ont été entrepris sur ces thèmes chez les bananiers, si ce n'est ceux de BAKRY et KERBELLEC sur l'androgenèse *in vitro* qui ont permis d'obtenir des plantes homozygotes après doublement spontané. Bien que ces études soient encore préliminaires, et que des recherches dans ce sens se poursuivent actuellement, il est apparu utile de les renforcer par l'utilisation d'une autre technique. La gynogenèse induite par du pollen irradié ou du pollen d'espèces ornementales est, actuellement, une technique largement employée, avec succès, chez d'autres espèces végétales (LACADENA, 1974 ; PANDEY et PHUNG, 1982 ; SAUTON ET DUMAS DE VAULX, 1987). Elle présente un avantage particulier chez les espèces qui, comme *Musa*, ont un nombre élevé d'ovules par fleur. Les premiers résultats de tels travaux menés depuis 4 ans sont présentés dans ce document.

● matériel et méthodes

Les espèces qui ont été utilisées comme parent femelle sont les diploïdes sauvages *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* (Calcutta 4) (AA) et *M. acuminata* ssp *malaccensis* (AA). Ces espèces, déjà très homozygotes, étaient les seules disponibles dans la collection du CATIE (Turrialba, Costa Rica). Pour être assuré, en cas de doublement spontané, que les plantes obtenues provenaient bien du développement gynogénétique de l'oosphère, le pollen de l'espèce sauvage *M. balbisiana* type TANI (BB) et d'espèces ornementales *M. ornata* ($n = 11$) et *M. becarii* ($n = 9$), très facilement discernables de *M. acuminata* par électrophorèse d'isoenzyme (HORRY, 1989), a été utilisé.

Le pollen a été inactivé par irradiation aux rayons gamma du Cobalt 60. Chez le tabac, le noyau reproducteur de tels gamètes, alors lésé, ne se divise pas et reste diploïde (GRANT *et al*, 1980). Le pollen est, cependant, toujours capable de germer et induit alors le développement gynogénétique de l'ovaire. Les haploïdes obtenus sont donc, en général, d'origine maternelle (SAUTON et DUMAS DE VAULX, 1987).

Dans le protocole expérimental suivi, les fleurs mâles ont été prélevées très tôt le matin du jour de l'ouverture de la bractée. Dans ce cas, il est en effet inutile d'utiliser des fleurs plus jeunes, car la division du noyau reproducteur ne se fait que lors de sa migration dans le tube pollinique. Les fleurs ont ensuite été irradiées dans les laboratoires de l'OIRSA (San José, Costa Rica). Les radiations proviennent d'une source débitant 100 Gy toutes les 21 minutes. Les doses d'irradiation utilisées ont été de 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 170, 200 et 220 Gy. Le même jour, puis le lendemain, les fleurs femelles, qui avaient été ensachées 48 heures avant, ont été fécondées *in situ*. Elles sont alors restées protégées jusqu'à 48 heures après le découverture de la dernière bractée femelle. Le traitement témoin « absolu » consiste à ne pas polliniser les fleurs. Un autre traitement témoin consiste à les polliniser en utilisant du pollen de *M. balbisiana* type TANI non irradié. Par ailleurs, en règle générale, tous les essais comportent le témoin auto-fécondé.

Les fruits sont prélevés entre 110 et 130 jours après la fécondation. Seuls les embryons provenant de graines sans endosperme sont prélevés et mis en culture *in vitro* sur un milieu nutritif (ESCALANT et TEISSON, 1987). Des embryons provenant de graines de type I (graines normales avec un embryon typique en forme de toupie et un endosperme très développé) des traitements témoins (autofécondation et hybridation interspécifique sans irradiation du pollen) ont aussi été mis en développement *in vitro*. Les plantes obtenues ont été transférées sur un milieu simple de croissance de MS enrichi en saccharose à la concentration de 30 g/l et en gelrite à 2 g/l (MURASHIGE et SKOOG, 1962), où elles sont restées environ 1 mois avant leur sevrage en serre.

Différentes techniques ont été testées pour suivre la germination du pollen et l'évolution du noyau reproducteur. Après différents essais infructueux,

effectués *in vitro*, pour vérifier la capacité germinative des grains de pollen après irradiation, une méthode a été retenue qui consiste à tester leur germination en conditions *in vivo*. Le pollen est alors déposé sur le stigmate de fleurs fraîchement coupées ; l'ensemble est ensuite isolé et placé en boîte de Pétri, sur du papier filtre humidifié. La germination du pollen et l'évolution du tube pollinique sont évaluées, 24 et 48 heures après, à l'aide du colorant « Z » préparé à base de bleu d'aniline (ANONYME, 1989) et appliqué sur des coupes fines, réalisées à main levée, du stigmate, du style et de l'ovaire. L'évolution du noyau reproducteur est observée de la même façon, après 48 heures, par application du colorant « DAPI » spécifique de l'ADN (ANONYME, 1989). L'évaluation de la germination du pollen a été faite au microscope. Pour chaque traitement, dix champs optiques ont été observés avec une centaine de grains de pollen par champ optique, soit un total d'un millier de grains de pollen étudiés par traitement.

L'évaluation du degré de ploïdie des plantes obtenues a été réalisée sur pointes de racine colorées au réactif de Schiff, par le comptage des chromosomes en métaphase. La méthode utilisée est celle décrite dans le *Manuel pratique d'histologie végétale* (ANONYME, 1989). Le degré d'homozygote des plantes a été évalué par électrophorèse d'isoenzyme selon les méthodes développées par HORRY (1989). Les premières analyses ont été réalisées dans le laboratoire d'électrophorèse du CIRAD-FLHOR en Guadeloupe, puis dans celui du CATIE au Costa Rica à la suite d'un transfert de technologie. Les systèmes enzymatiques retenus ont été la malate-déshydrogénase (MDH), l'isocitrate-déshydrogénase (IDH) et la peroxydase (PRX).

● résultats

Le test de la germination des grains de pollen sur stigmate a permis de vérifier que, quelle que soit la dose d'irradiation utilisée, le pollen est capable de germer (photo 1). Les pourcentages de germination obtenus sont très variables et ne semblent pas liés à la dose d'irradiation (fig 1).

Les observations des coupes fines du style et de l'ovaire ont permis de confirmer que le tube pollinique pouvait entrer en contact avec l'ovule,

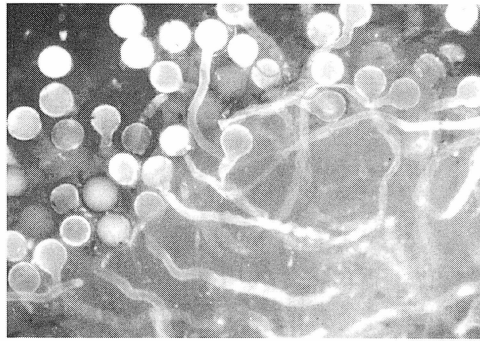


Photo 1
Germination *in situ* des grains de pollen de *M. balbisiana* type TANI après irradiation (x 50).

quelle que soit la dose d'irradiation utilisée (photos 2, 3 et 4).

L'observation des noyaux polliniques dans le tube germinatif révèle deux situations bien distinctes selon qu'il s'agit de pollen irradié ou non. Dans le cas du pollen non irradié, les deux noyaux reproducteurs sont très clairement observables après mitose (photo 5). Au contraire, avec du pollen irradié (60, 120 et 200 Gy), la chromatine apparaît sous une forme désorganisée et il n'est pas possible d'observer de noyau proprement dit (photo 6). Ces observations, conformes aux résultats obtenus chez d'autres plantes, laissent supposer que la fécondation ne se fera pas selon un processus normal (PANDEY et PHUNG, 1982).

L'évolution externe des graines 85 jours après la fertilisation est très semblable d'un traitement à

Figure 1
Pourcentages de germination du pollen de *Musa balbisiana* type TANI, soumis à différentes doses d'irradiation (Pt = pollen témoin).

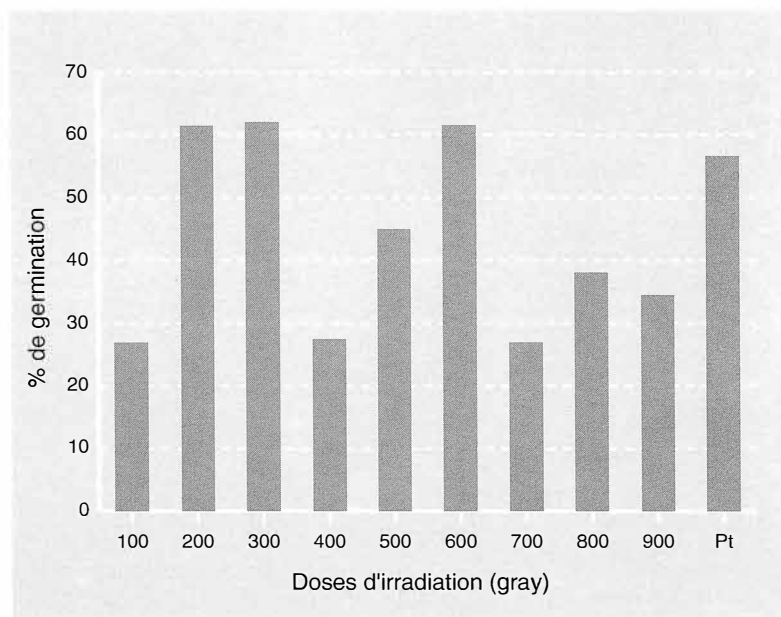


Photo 2
Croissance des tubes
polliniques dans le style d'une
fleur de *M. acuminata* ssp
burmannicoides (x 50).

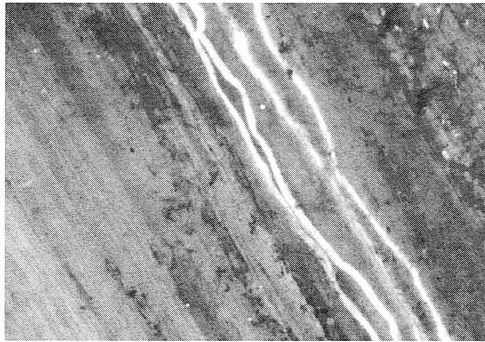


Photo 3
Tube pollinique arrivant dans la
zone pileuse entourant l'ovaire
(genre *Musa*, x 80).



Photo 4
Tube pollinique en contact avec
l'ovaire (genre *Musa*, x 100).

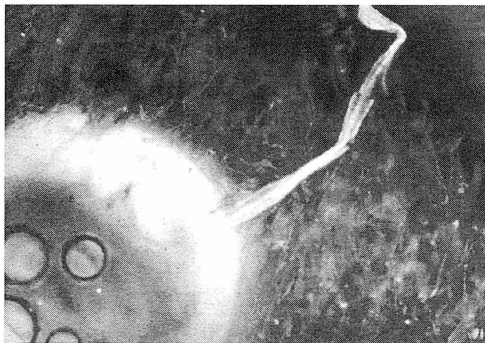


Photo 5
Observation des deux noyaux
reproducteurs dans le tube
pollinique issu de pollen non
irradié (genre *Musa*, x 200).



l'autre. Quelle que soit la dose d'irradiation utilisée, les graines obtenues présentent toutes une taille comparable à celle des autres graines issues d'autofécondation ou de fécondation par pollen de *M. balbisiana* non irradié (fig 2). En l'absence de fécondation, cependant, les ovules dégénèrent et il n'y a pas formation de graine.

Cette étude préliminaire ayant eu pour objectif de juger de l'efficacité de cette technique pour le genre *Musa*, seuls trois ou quatre fruits par type de croisement ont été analysés, alors que 900 à 1000 graines par traitement avaient été observées. Quatre types de graines ont été rencontrés dans ces fruits. Les graines de « type I », considérées comme normales, contiennent un embryon typique en forme de toupie et un endosperme très développé (photo 7). Parmi les graines dites anormales, trois types ont été identifiés, le « type II » correspond à un embryon atypique aplati ou globulaire sans endosperme (photo 8), le « type III » ne contient pas d'embryon, mais présente un endosperme bien développé, le « type IV », enfin, ne présente ni embryon, ni endosperme. Les fleurs n'ayant pas été fécondées ont donné des fruits très peu développés et vides de graine (photo 9). L'étude histologique des graines de type II a mis en évidence une absence des cellules de l'endosperme, et une dégénérescence des cellules nucellaires dont seules persistent les membranes cellulaires (photo 10). L'embryon zygotique, bien que présent, est peu développé.

Bien que les comptages effectués aient été peu nombreux, certaines observations méritent d'être notées.

Si l'on se réfère aux graines obtenues après autofécondation des parents diploïdes *M. acuminata*, l'hybridation interspécifique entraîne une augmentation des graines de types II, III et IV, avec une répartition de respectivement 30, 6 et 58% du nombre de graines produites par le croisement *M. acuminata* ssp *burmannicoides* x *M. balbisiana* type TANI (tableau I). Il n'y a pas de variabilité entre *M. acuminata* ssp *malaccensis* et *M. acuminata* ssp *burmannicoides*.

L'utilisation de pollen irradié provoque une augmentation des graines de type IV et une diminution des types I et II. Plus la dose d'irradiation est élevée, plus le nombre de graines de type II diminue (tableau I). Aucune graine de types I et II n'a

été obtenue lors de traitements impliquant des doses supérieures à 200 Gy. Les graines de type II sont particulièrement intéressantes, car le développement gynogénétique du sac embryonnaire se fait en général sans développement de l'endosperme. Il peut cependant y avoir des exceptions dans le cas où deux tubes polliniques entrent dans le sac embryonnaire, l'un stimulant alors l'oosphère par injection de chromatine résiduelle et l'autre stimulant le développement de l'endosperme (ASKES, 1980). Par ailleurs, chez le bananier, il n'est pas possible d'établir une relation stricte entre une graine sans endosperme, mais avec embryon, et une graine avec embryon haploïde. En effet, ce type de graine peut apparaître au cours de croisements interspécifiques et donner des embryons hétérozygotes diploïdes (BAKRY, communication personnelle).

L'utilisation de pollen d'espèces ornementales (tableau II) fait ressortir une très nette incompatibilité entre l'espèce *M acuminata* ssp *burmannicoides* et *M ornata*, alors que les croisements avec *M becarii* ont permis l'obtention de graine de types I (7,21%) et II (14,89%). *M acuminata* ssp *malaccensis* est, en revanche, très incompatible avec *M becarii*, alors que son croisement avec *M ornata* permet d'obtenir des graines de types I (54,27%) et II (5,99%). Des résultats comparables ont pu être observés par SIMMONDS (1962), qui rapporte avoir obtenu des pourcentages de graines 49,7% dans le croisement *M acuminata* ssp *malaccensis* x *M ornata*, alors que quelques graines seulement étaient formées avec *M acuminata* ssp *burmannicoides* en parent femelle.

Le sauvetage des embryons par mise en culture *in vitro* a permis d'obtenir de nombreuses plantes. Les taux de germination observés à partir des graines de types I et II issues des différents traitements et le nombre de plantes obtenues sont présentés dans le tableau III. Dans les traitements impliquant *M acuminata* ssp *malaccensis* comme parent femelle et du pollen irradié avec des doses supérieures à 100 Gy, il n'a pas été possible d'obtenir de plante entière à partir de graine de type II. En revanche, lorsque le parent femelle est *M acuminata* ssp *burmannicoides*, des plantes ont pu être obtenues avec des doses d'irradiation de 120 Gy (quatre plantes) et 150 Gy (trois plantes). Les embryons isolés à partir des graines sans endosperme, malgré un développement plus lent

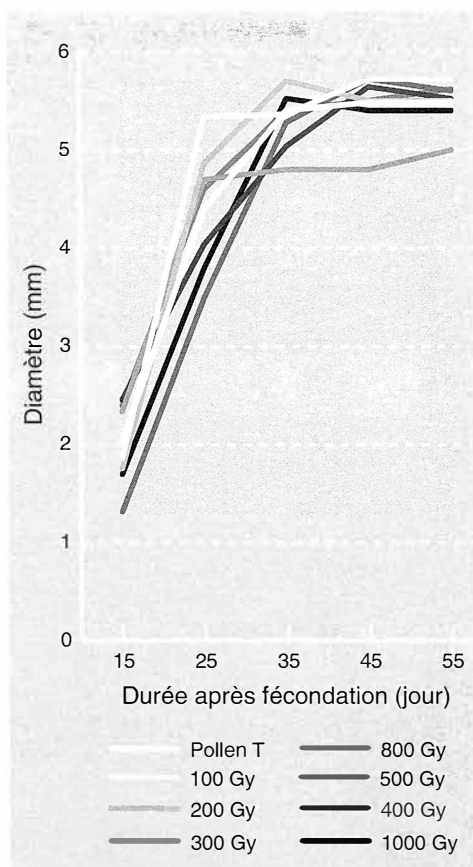


Figure 2
Taille des semences obtenues après fertilisation par du pollen irradié, lors du croisement *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* x *M balbisiana* type TANI (pollen T = pollen témoin).



Photo 6
Illustration de la désorganisation de la structure nucléaire du noyau reproducteur dans le cas de pollen irradié (genre *Musa*, x 200).

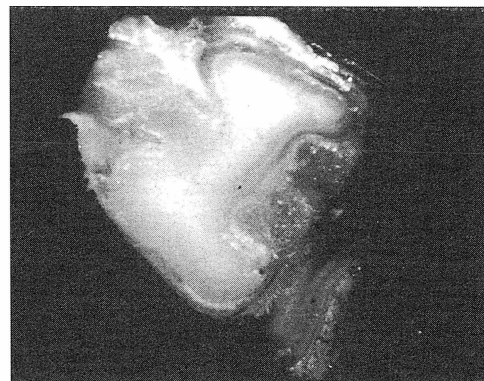


Photo 7
Graine de type I, considérée comme normale (genre *Musa*, x 10).

Photo 8

Graine de type II, considérée comme anormale. Absence d'endosperme avec présence d'un embryon de forme globulaire (genre *Musa*, x 10).

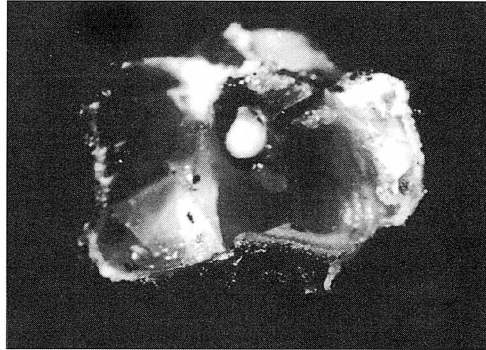


Photo 9

Coupe transversale dans un fruit immature de 50 jours, n'ayant pas été fécondé. Les ovules ne se développent pas (genre *Musa*, x 4).

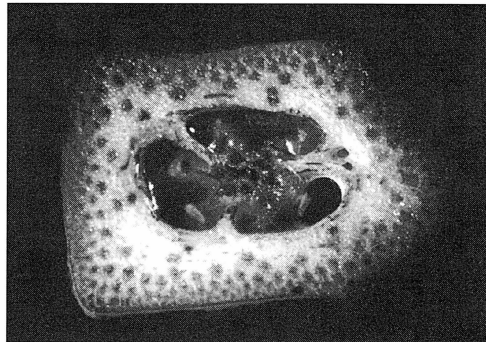
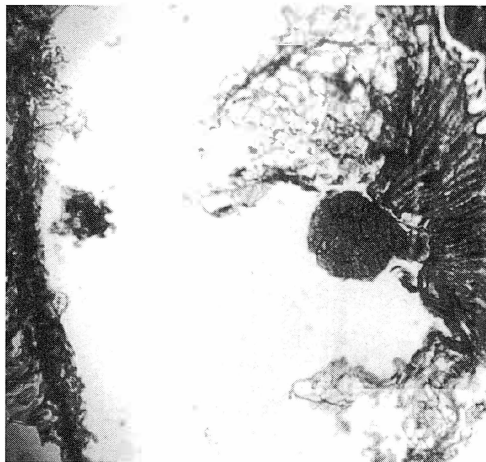


Photo 10

Coupe transversale dans une graine issue d'un fruit provenant de l'utilisation de pollen irradié à 10 Krad ; 50 jours après la fécondation, l'embryon reste peu développé, l'endosperme est absent et seules persistent les membranes cellulaires du nucelle (genre *Musa*, x 100).



que celui des embryons isolés à partir de graines normales ont, dans leur grande majorité, permis d'obtenir des plantes entières. Certaines d'entre elles conservent un aspect rachitique et, malgré la présence de racines et de feuilles, ne dépassent pas 4 cm de hauteur environ après 2 mois de culture en conditions normales de croissance.

L'analyse du caryotype des plantes obtenues à partir des graines de type II a été faite sur toutes les plantes obtenues par croisement avec pollen

irradié ou pollen d'espèces ornementales, soit au total 188 plantes. Seulement dix plantes par traitement témoin ont été analysées. Ces plantes se sont avérées diploïdes, avec, pour une majorité d'entre elles, un nombre de chromosomes tel que $2n = 22$. Chez deux de ces plantes cependant, malgré la qualité moyenne des plaques métaphasiques observées, des nombres de chromosomes variant de 9 à 13 ont été comptés. Ces plantes provenaient de croisements avec du pollen irradié à des doses de 50 et 70 Gy (*M. acuminata* ssp *burmannicoides* x *M. balbisiana* type TANI) et présentaient une croissance *in vitro* très ralentie et un aspect vitrifié. Elles sont mortes, nécrosées, après 3 mois de culture. De type aneuploïdes ou haploïdes, elles auraient sûrement mérité un traitement à la colchicine qui aurait permis de récupérer un état diploïde et de faciliter leur croissance.

La duplication spontanée du nombre de chromosomes des plantes haploïdes étant un phénomène connu et rapporté dans de nombreuses études (BAJAJ, 1983), l'homozygotie des plantes obtenues a été évaluée par électrophorèse d'isoenzymes (HORRY, 1989). L'analyse des 188 plantes disponibles, tous traitements confondus, n'a pas permis de détecter de plantes homozygotes. Toutes les plantes analysées se sont avérées hétérozygotes pour un nombre de loci variable. Pour des raisons pratiques, seul un échantillonnage représentatif des différents traitements a été représenté graphiquement (fig 3). L'analyse des zymogrammes a permis de mettre en évidence différents degrés d'hétérozygotie suivant les traitements. Ainsi, dans le cas des traitements faisant intervenir du pollen irradié, on constate que les plantes obtenues par le croisement avec *M. acuminata* ssp *burmannicoides* sont hybrides pour au moins cinq loci (B2, MB2, MB4, B4 et MB5). Dans le cas de *M. acuminata* ssp *malaccensis*, le caractère hybride est mis en évidence sur quatre loci (MB1, MB2, MB3 et MB4).

Parmi les plantes obtenues par du pollen, irradié ou non, d'espèces ornementales, celles obtenues à partir des croisements de *M. acuminata* ssp *burmannicoides* par *M. beccarii* sont hybrides pour deux loci (MB4 et B4). Les plantes issues des croisements de *M. acuminata* ssp *malaccensis* avec *M. ornata* sont hybrides pour au moins deux autres loci (MB1 et MB2).

Tableau I

Pourcentages de graines de chaque type défini, obtenus pour chacun des croisements utilisant du pollen irradié.

Croisements	Types de graines			
	I (%)	II (%)	III (%)	IV (%)
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i>	72,2	9,25	3,13	15,46
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI	6,19	30,79	5,67	57,35
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (50 Gy)	3	10		79
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (70 Gy)	1,1	16,44	9,76	72,65
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (80 Gy)	1,1	3,19	5,86	89,25
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (90 Gy)	0,76	1,52	8,47	90,01
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (100 Gy)	0,59	2,31	6,38	90,71
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (120 Gy)	0,54	0,79	13,86	87,43
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (150 Gy)	0,57	1,25	7,42	90,76
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (170 Gy)	0,66	0,42	14,18	84,74
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (200 Gy)	0,49	0,48	8,59	90,52
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (220 Gy)	0	0	5,79	94,21
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i>	93,6	10,70	2,59	2,64
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI	67,8	10,70	9,33	12,12
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (60 Gy)	40,64	7,89	35,45	16,02
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (80 Gy)	13,86	5,34	30,46	50,34
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (90 Gy)	11,41	3,7	34,61	52,28
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (100 Gy)	13,02	6,09	39,07	41,81
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (120 Gy)	15	7,42	21,88	55,7
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (170 Gy)	2,97	5,24	24,12	67,67
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (220 Gy)	0,90	0	2,78	96,32
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (250 Gy)	0	0	61,82	38,18
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (300 Gy)	0	0	65,54	34,46

Type I : graines normales, avec un embryon typique en forme de toupie et un endosperme très développé.

Type II : graines anormales, avec un embryon atypique aplati ou globulaire sans endosperme.

Type III : graines anormales, sans embryon, mais avec un endosperme bien développé.

Type IV : graines anormales sans embryon, ni endosperme.

Tableau II

Pourcentages de graines de chaque type défini, obtenus pour chacun des croisements impliquant le pollen d'espèces ornementales.

La description des graines de types I, II, III et IV est la même que dans le tableau I.

Croisements	Types de graines			
	I %	II %	III %	IV %
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M ornata</i>	2,02	0,46	25,10	72,41
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>Musa ornata</i> (120 Gy)	0	0,25	13,48	86,27
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>Musa ornata</i> (150 Gy)	0,38	0,54	5,98	93,10
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>Musa ornata</i> (170 Gy)	0	0	8,38	91,62
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>Musa ornata</i> (220 Gy)	0	0	10,76	89,23
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M becarii</i>	7,21	14,89	3,86	73,96
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M becarii</i> (70 Gy)	0	0	6,7	93,3
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M becarii</i> (80 Gy)	1,27	3,92	8,37	86,44
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M becarii</i> (90 Gy)	0	0	0	100
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M becarii</i> (120 Gy)	0	0	0	100
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M ornata</i>	54,29	6,02	24,87	14,81
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M ornata</i> (170 Gy)	0,81	0	15,71	71,29
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M ornata</i> (220 Gy)	8,94	4,55	15,21	71,29
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M becarii</i>	0	0	0	100

● discussion et conclusion

On a pu montrer que le pollen de *M balbisiana* TANI pouvait conserver une capacité de germination d'environ 50% après avoir subi de fortes doses d'irradiation, et que le tube germinatif pouvait entrer en contact avec l'ovule. Il a aussi été vérifié que la mitose permettant la division du noyau reproducteur du pollen était perturbée par l'irradiation. L'utilisation de pollen irradié entraîne de fortes perturbations dans les phénomènes liés à la fécondation, qui se traduit par une augmentation très importante du nombre de graines anormales. Beaucoup des embryons obtenus à partir de graines de type II, provenant des traitements par pollen irradié, n'ont pas permis d'obtenir de plantes. Ces résultats sont similaires à

ceux obtenus sur le pommier (ZHANG et LESPINASSE, 1991). La majorité des plantes obtenues se sont révélées diploïdes, avec la présence d'allèles de *M balbisiana* TANI, mais deux de ces plantes présentaient un nombre de chromosomes très nettement inférieur à 22 et pourraient donc résulter d'un développement gynogénétique.

Dans le cadre de ces travaux, il a été choisi d'utiliser du pollen irradié à des doses comprises entre 50 et 220 Gy. Bien que les résultats obtenus montrent qu'à des doses supérieures à 200 Gy, très peu de graines et de plantes sont obtenues, il serait peut-être important de travailler à des doses d'irradiation situées légèrement au-delà du seuil de 200 Gy, en augmentant le nombre de régimes fertilisés et de graines observées. En effet, en

Tableau III

Pourcentages de germination des graines issues des différents croisements et nombre de plantes obtenues (seuls les croisements ayant permis d'obtenir des plantes sont mentionnés).

Croisements	Graines de type I		Graines de type II	
	Graines germées %	Nombre de plantes	Graines germées %	Nombre de plantes
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i>	16	58	32	64
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI	30	24	40	109
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (70 Gy)	0	0	58	18
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (80 Gy)	10	1	65	24
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (90 Gy)	100	6	38	5
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (100 Gy)	36	9	37	18
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (120 Gy)	78	7	12	4
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (150 Gy)	0	0	16	3
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M becarii</i>	16	17	25	39
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> x <i>M becarii</i> (80 Gy)	100	5	0	0
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i>	42	19	0	0
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI	80	72	43	20
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (60 Gy)	25	35	46	13
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (80 Gy)	69	46	48	12
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (90 Gy)	22	22	23	6
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (100 Gy)	45	30	6	2
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (120 Gy)	26	6	0	0
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M balbisiana</i> type TANI (170 Gy)	25	1	0	0
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>malaccensis</i> x <i>M ornata</i>	41	11	34	30

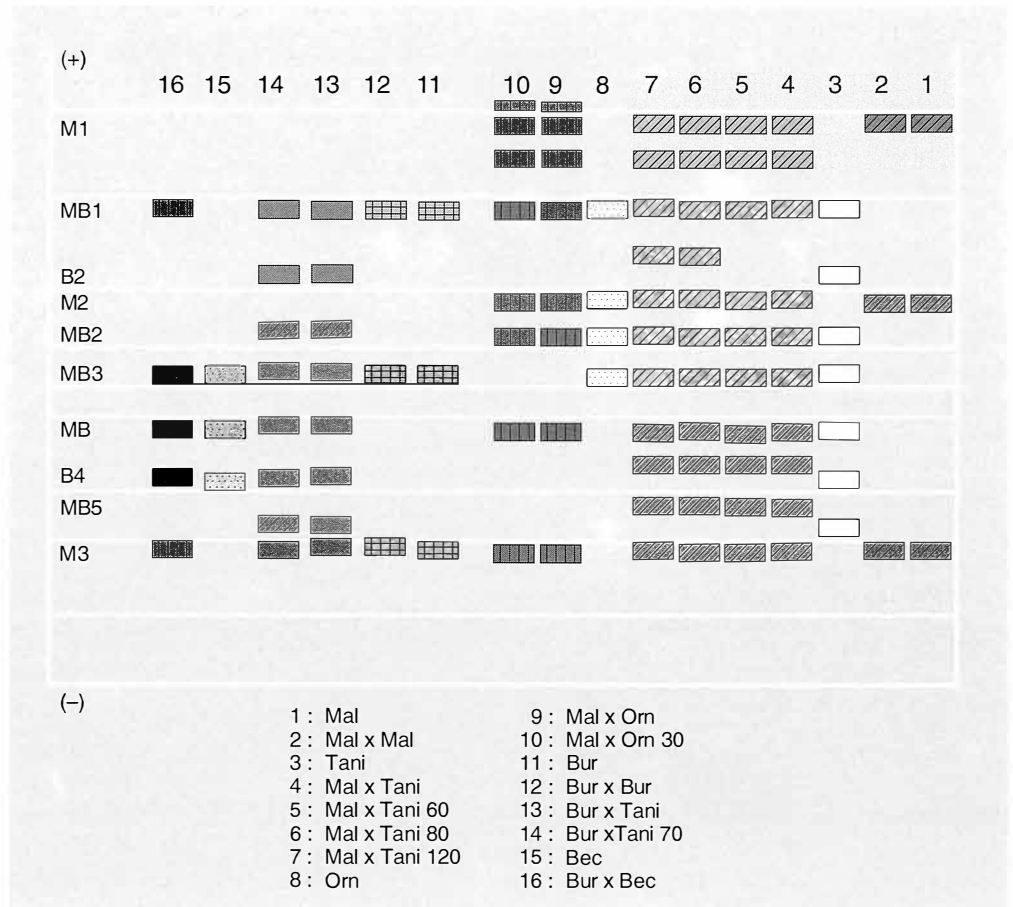


Figure 3
Illustration des zymogrammes obtenus par électrophorèse en malate-déshydrogénase (MDH), de plantes issues des croisements *M acuminata* ssp *burmannicoides* (*Bur*) x *M balbisiana* type *TANI*; *M acuminata* ssp *malaccensis* (*Mal*) x *M balbisiana* type *TANI*; *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* x *M beccarii* (*Bec*); *M acuminata* ssp *malaccensis* x *M ornata* (*Orn*).

accord avec VASSILEVA-DRYANOVSKA (1966), il s'avère que plus la dose d'irradiation est élevée et plus la désorganisation de la chromatine est grande, entraînant un désordre d'autant plus important dans les phénomènes de fécondation. Des travaux sur pommier (ZHANG et LESPINASSE, 1991) et sur melon (SAUTON et DUMAS DE VAULX, 1987) ont permis l'obtention de plantes haploïdes, avec des traitements compris entre 200 et 500 Gy. Les hybridations interspécifiques avec les espèces ornementales (*M beccarii* et *M ornata*) pourraient aussi être envisagées. Sur d'autres espèces, il a été en effet démontré que ce type de croisement pouvait permettre l'obtention d'embryons résultant d'un développement gynogénétique (PANDEY et PHUNG, 1982).

La maîtrise de la méthode du doublement chromosomique par utilisation de la colchicine sur apex de plante *in vitro* devra être aussi acquise.

À partir des résultats de ces 4 années d'études, il semblerait que la gynogénèse, induite par pollen irradié, ne soit pas la plus appropriée pour l'obtention de plantes dihaploïdes dans le genre *Musa*. Les résultats obtenus à partir de travaux d'androgénèse *in vitro* ont permis d'obtenir des plantes haploïdes (BAKRY et KERBELLEC, communications personnelles). Si l'on considère d'une part le travail et les contraintes liés à l'hybridation interspécifique avec du pollen irradié ou celui des espèces ornementales, et d'autre part la relative simplicité de l'androgénèse *in vitro*, il serait plus judicieux de concentrer les efforts à venir dans cette dernière voie.

remerciements

Ces travaux ont pu être réalisés grâce à une collaboration entre le CIRAD-FHLOÏR, le CATIE et l'UE. Nous remercions particulièrement M JP Horry, du CIRAD-FHLOÏR, pour la réalisation des études électrophorétiques.

● références

- Anonyme (1989) Manuel pratique d'histologie végétale. Montpellier, France, CIRAD, 61 p
- Asker S (1980) Gametophytic apomixis: elements and genetic regulation. *Hereditas* 93, 277-293
- Bajaj YPS (1983) *In vitro* production of haploids. In: *Handbook of plant cell culture, 1. Techniques for propagation and breeding*. New-York, USA, ed Evans (DA), Macmillan publishing company, 228-287
- Bakry F, Horry JP, Teisson C, Tezenas du Montcel H, Ganry J (1990) L'amélioration génétique des bananiers à l'IRFA-CIRAD. *Fruits* 45, numéro spécial banane, 25-40
- Demarly Y, Sibi M (1989) *Amélioration des plantes et biotechnologies*. Montrouge, France, ed John Libbey Eurotext, 152 p
- Escalant JV, Teisson C (1987) Comportement *in vitro* de l'embryon isolé du bananier (*Musa species*). *Fruits* 42 (6), 333-342
- Grant JE, Pandey KK, Williams EG (1980) Pollen nuclei after ionising irradiation for egg transformation in *Nicotiana*. *New Zealand JBot* 18 (3), 339-341
- Horry JP (1989) Chimiotaxonomie et organisation génétique dans le genre *Musa*. II : Synthèse des résultats. *Fruits* 44 (10), 509-520
- Lacadena JR (1974) Spontaneous and induced parthenogenesis and androgenesis. In: *Haploids in Higher Plants*. Ontario, Canada, University of Guelph, ed Kasha KJ, 13-22
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physio Plant* 15, 473-479
- Pandey KK, Phung M (1982) « Hertwig effect » in plants: induced parthenogenesis through the use of irradiated pollen. *Theor App Genet* 62 (4), 295-300
- Sauton A, Dumas de Vaulx R (1987) Obtention de plantes haploïdes chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogenèse induite par pollen irradié. *Agronomie* 7, 141-148
- Simmonds NW (1962) *The evolution of bananas*. New York, USA, Wiley J, 170 p
- Vassileva-Dryanovska OA (1966) Development of embryo and endosperm produced after irradiation of pollen in *Tradescantia*. *Hereditas* 55 (9), 129-147
- Zhang YX, Lespinasse Y (1991) Pollination with gama-irradiated pollen and developpment of fruits, seeds and parthenogenetic plants in apple. *Euphytica* 54, 101-109