

THESE

présentée par Olivier LEBLANC
Ingénieur Agronome de l'INA-PG

**pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON**

SUJET

**Modes de reproduction dans le complexe agamique des
Tripsacum, et analyse d'hybrides maïs-*Tripsacum* en vue
du transfert de l'apomixie chez le maïs**

Soutenue le 23 mai 1995 devant la commission d'examen composée de :

M. André GALLAIS, Professeur à l'INA-PG	Président
M. Christian DUMAS, Professeur à l'ENS de Lyon	Rapporteur
M. Michel DRON, Professeur à l'Université de Paris XI	Rapporteur
M. Yves SAVIDAN, Directeur de Recherche à l'ORSTOM	Directeur de thèse
M. André CHARRIER, Professeur à l'ENSA de Montpellier	Examineur
M. Diego GONZALEZ DE LEON, Responsable Applied and Molecular Genetics Laboratory, CIMMYT	Examineur

Remerciements

C'est à Yves Savidan que je dois cette excursion dans le monde de l'apomixie, des *Tripsacum* et des "doux dingues" qui croient à son transfert chez les plantes cultivées. Merci pour la confiance que tu m'as témoignée au cours de ces trois années.

Ce travail s'est déroulé principalement au Mexique, mais il m'a aussi conduit dans l'Utah et finalement ramené à Montpellier ; ce document est l'occasion d'exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué à sa réalisation par leur accueil et leur aide, leurs conseils, et leur disponibilité,

Magdalena *Martha* Sandra *Pablo* Virginia *Don José* Nemo *Jean Marcel* Carmen *Javier* Elsa
Eva Marguarita *Suzanna* Esau *Mireille* Manilal *Martin* Diego González-de-León *David*
Hoisington Natacha Bohorova *Nurul Islam-Faridi* (CIMMYT) -- Daniel Grimanelli *Alain*
Ghesquière Mathias Lorieux *Maryse Sophy* Phil Barre *Anne Coin* Valérie Hocher *Christine*
Magnaval Fabienne Morcillo *Stéphane Dussert* Serge Hamon *Julien Berthaud* (ORSTOM) --
Véro Nardini *Alain Rival* (CIRAD-CP)
John G. Carman Mike D. Peel (Utah State University) --
Andrea Mazzucato (Université de Peruggia) --
Christian Dumas (ENS Lyon) -- André Gallais (INRA) --
André Charrier (ENSAM) -- Michel Dron (Université de Paris XI)

Merci à tous et à toutes.

Préambule

Ce travail a fait l'objet de différentes publications, annexées à la fin de chacune des parties concernées ; les conclusions sont néanmoins brièvement rappelées dans le texte afin de faciliter la compréhension du document.

Les articles relatifs à la Partie III constituent une partie des résultats obtenus au cours de cette thèse. Le manuscrit présenté dans la Partie II est une synthèse sur les techniques d'identification de l'apomixie, de leurs avantages et de leurs limites. Il sera publié dans un ouvrage sur l'apomixie, *Apomixis Handbook*, dont l'objectif est de rassembler les informations nécessaires pour tous ceux qui souhaitent l'étudier et la manipuler.

Liste des manuscrits et articles

Partie II

Leblanc O, Mazzucato A (1995) Screening procedures to identify and quantify apomixis. A paraître dans *Apomixis Handbook*, Savidan Y et Carman JG (eds), FAO, Rome.

Partie III

Leblanc O, Savidan Y (1994) Timing of megasporogenesis in *Tripsacum* species (Poaceae) as related to the control of apomixis and sexuality. *Polish Botanical Studies* 8 : 75-81.

Leblanc O, Peel MD, Carman JG, Savidan Y (1995) Megasporogenesis and megagametogenesis in several *Tripsacum* species (Poaceae). *American Journal of Botany* 82 : 57-63.

Leblanc O, Dueñas M, Hernández M, Bello S, Garcia V, Berthaud J, Savidan Y (1995) Chromosome doubling in *Tripsacum* : The production of artificial sexual tetraploid plants. *Plant Breeding* 114 (sous presse).

Leblanc O, Grimanelli D, González-de-León D, Savidan Y (1995) Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-*Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* (sous presse).

Leblanc O, Grimanelli D, Islam-Faridi N, Berthaud J, Savidan Y (1995) Can diploid cereals reproduce through sexuality? Evidence from maize-*Tripsacum* hybrids. *Journal of Heredity* (accepté pour publication).

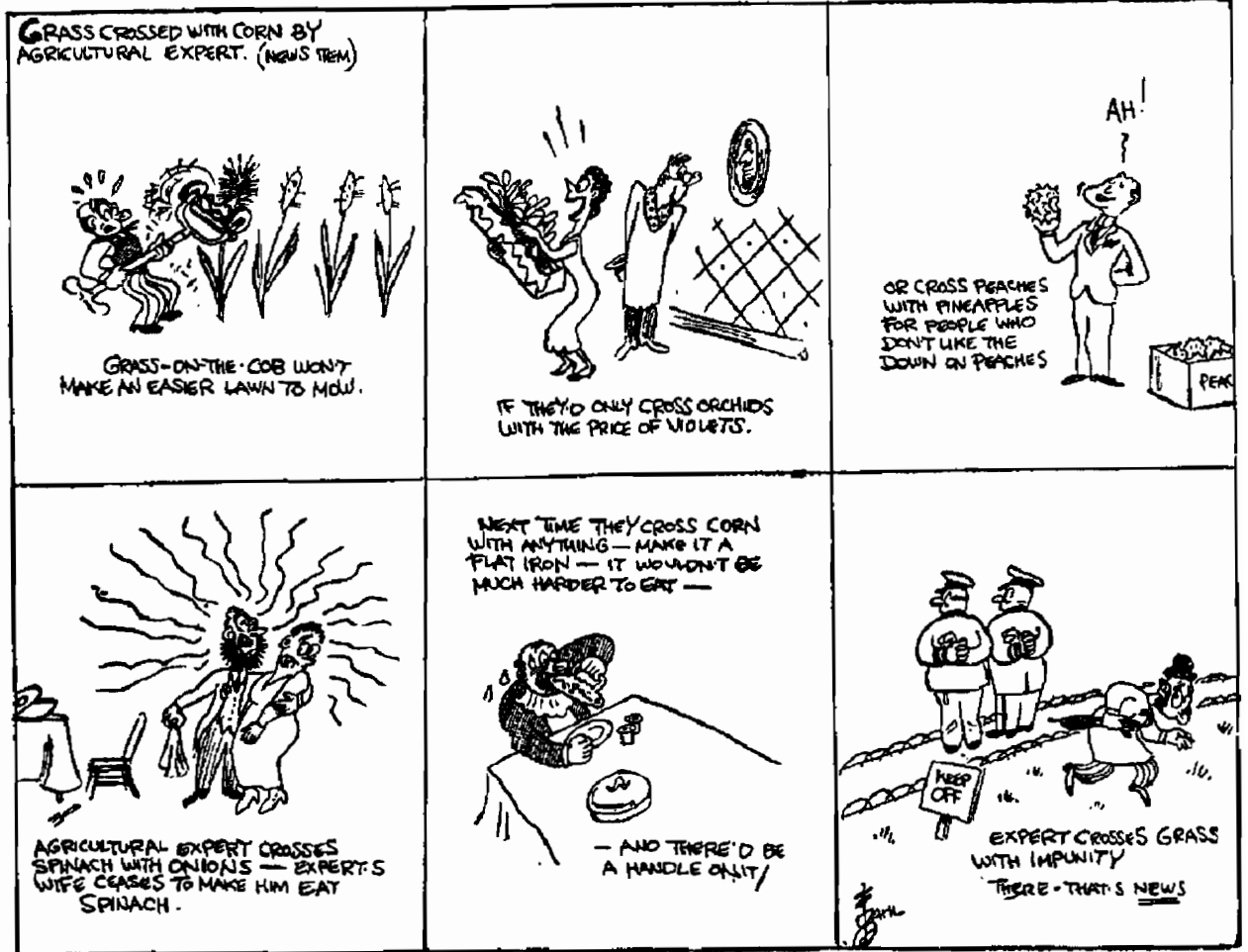
Sommaire

Avant propos

INTRODUCTION	1
PARTIE I - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
A. GENERALITES SUR L'APOMIXIE	5
1. Présentation de l'apomixie	5
2. Conséquences de l'apomixie gamétophytique sur les descendance	8
3. Contrôle génétique de l'apomixie gamétophytique	9
B. UTILISATIONS DE L'APOMIXIE EN AMELIORATION DES PLANTES ET EN AGRICULTURE : AVANTAGES ET POTENTIELS	10
1. Impacts de l'apomixie en amélioration des plantes et en agriculture	10
2. De la théorie à la pratique...	12
C. LES TENTATIVES D'INTRODUCTION DE L'APOMIXIE CHEZ LES PLANTES CULTIVEES	13
1. Le transfert chez les Triticées	14
2. Le transfert chez le mil	14
3. Le transfert chez le maïs	16
D. COMPLEXE AGAMIQUE DES <i>TRIPSACUM</i>	16
1. Description et organisation du genre <i>Tripsacum</i>	16
2. Possibilités d'introgessions entre <i>Tripsacum</i> et maïs	18
PARTIE II - MATERIEL & METHODES	21
A. MATERIEL VEGETAL	21
1. Les <i>Tripsacum</i>	21
2. Production des hybrides maïs- <i>Tripsacum</i>	22
B. ANALYSE DES MODES DE REPRODUCTION	25
1. Au sein du complexe agamique des <i>Tripsacum</i>	25
2. Chez les hybrides maïs- <i>Tripsacum</i>	26
C. PRODUCTION DE TETRAPLOIDES SEXUES : CONTRAINTES ET CHOIX DE STRATEGIES	27
1 Les contraintes	27
2 Les stratégies retenues	27
D. ANALYSES CYTOLOGIQUES	29
1. Détermination du nombre de chromosomes	29
2. Détermination des structures chromosomiques chez les hybrides maïs- <i>Tripsacum</i>	29
ANNEXE II-1	30

PARTIE III - RESULTATS & DISCUSSION	31
A. APOMIXIE DANS LE GENRE <i>TRIPSACUM</i>	31
1. Etude cytoembryologique de la non-réduction et de ses conséquences	31
2. Expression de l'apomixie	31
3. Production de matériels en ségrégation pour les modes de reproduction	32
B. IDENTIFICATION DE MARQUEURS MOLECULAIRES LIES A L'APOMIXIE	33
C. PRODUCTION DE DIFFERENTES GENERATIONS D'HYBRIDES MAIS-<i>TRIPSACUM</i>	
ET ANALYSE DES MODES DE REPRODUCTION	33
1. Production d'hybrides maïs- <i>T. dactyloides</i>	33
2. Analyse des modes de reproduction	37
3. Conséquences pour le transfert - Production de lignées d'addition à partir de BC3 apomictiques	40
 ANNEXE III	42
 PARTIE IV - SYNTHESE & CONCLUSIONS GENERALES	43
A. APOMIXIE CHEZ <i>TRIPSACUM</i>	43
1. Hérité et expression des facteurs responsables de l'apomixie	43
2. Hypothèses sur les effets des facteurs génétiques responsables de l'apomixie	45
3. Intérêts de la diplosporie	47
B. TRANSFERT DE L'APOMIXIE AU MAIS	48
1. Réalisation du schéma de transfert	48
2. Faisabilité du transfert	49
C. PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS GENERALES	50
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	51

Avant Propos



Cartoon de Francis D. Dahl paru le 12 janvier 1932 dans le Boston Herald suite à l'obtention en 1931 par Mangelsdorf et Reeves des premiers hybrides maïs x *Tripsacum*.

INTRODUCTION

“Nous sommes un peuple qui a créé ses aliments. Notre science consiste à connaître la nature et à en tirer profit sans la défigurer”
Aymara, Pérou, 1986.

La survie et la conservation de la biosphère ont été au centre des discussions du Sommet de Rio en 1992. Le Traité de Rio ouvre de nouvelles perspectives pour l'agriculture des pays en voie de développement, notamment par la remise en question des objectifs sur lesquels a été lancée la Révolution Verte : les mots clés pour l'agriculture des pays les plus démunis ne sont plus “croissance” et “développement”, mais “conservation” et “durabilité”.

La Révolution Verte avait pour objectif principal l'éradication de la faim dans le monde par la modernisation des systèmes de production les moins rentables. La redistribution des surplus dégagés, nouvelles sources de revenus et donc de prospérité, aurait alors été une conséquence de cet effort de modernisation. Celle-ci a essentiellement consisté à transférer aux pays du Tiers Monde un type de développement agricole calqué sur celui observé dans les pays industrialisés dès les années 1950, et principalement basé sur la monoculture et la mécanisation, l'introduction des variétés à hauts rendements (HYV, high-yielding varieties) et le plus souvent hybrides, et l'utilisation massive d'intrants. Bien que ce type d'approche ait obtenu de réels succès dans plusieurs régions du monde (par exemple le Pakistan, l'Inde et la Chine), elle a partiellement ou totalement échoué dans la majorité des pays d'Amérique Centrale et Latine et en Afrique : d'après le CIMMYT (Centre International pour l'Amélioration du Blé et du Maïs, Texcoco, Mexique), les variétés HYV de maïs (hybrides ou variétés à pollinisation libre améliorées) occupent seulement 20% des surfaces au Mexique, et 15% en Colombie. La situation est identique en Afrique, où mis à part le Zimbabwe, la Tanzanie et le Kenya, elles ne sont quasiment pas utilisées.

Les raisons de cet échec sont multiples, mais elles traduisent le manque de prise en compte du contexte socio-économique et de la diversité des environnements des pays en voie de développement : pour la plupart, ils ne disposent ni des équipements ni des réseaux nécessaires à la production et la distribution de semences hybrides et d'intrants, au stockage des récoltes et à leur transport pourtant indispensables à l'écoulement des surplus. Un tel système est d'une part financièrement trop lourd pour la majorité des petits paysans (coûts des semences et intrants), et d'autre part les rend très

dépendants de la distribution. De plus, les variétés traditionnelles sont issues d'un processus de sélection empirique faite par les paysans eux-mêmes. Ces derniers ont su préserver la rusticité et les capacités d'adaptation de ces variétés, qui sont en fait le résultat d'une forte hétérogénéité tamponnant les effets d'un milieu souvent très défavorable (sols pauvres, stress hydrique, forte pressions parasitaires). Les variétés à hauts rendements (base génétique moins large), proposées et largement distribuées par les centres nationaux ou internationaux, ne peuvent donc pas faire face à l'ensemble des situations rencontrées en milieu tropical ou subtropical. Leurs rendements sont très en deçà des potentiels évalués en stations ; les variétés traditionnelles locales, malgré de faibles rendements (600 à 700 kg/ha pour le maïs), sont encore largement utilisées.

Il est donc important de mettre en place de nouvelles stratégies pour assurer le nécessaire développement des agricultures de ces pays. Plutôt que de vouloir transférer un modèle, la solution réside certainement dans une transformation plus douce des systèmes existants. L'apomixie est un mode de reproduction qui assure une multiplication asexuée par graines, grâce à la non réduction des gamètes femelles et à leur développement parthénogénétique. Son introduction dans les variétés traditionnelles et améliorées pourrait ouvrir la voie à une telle "révolution", notamment par : *i*) la réduction du surcoût lié à l'achat de semences de variétés améliorées et de la dépendance vis à vis de la distribution (réutilisation de semences directement par le paysan) ; et *ii*) l'augmentation des rendements des systèmes d'agriculture basés sur l'utilisation de variétés traditionnelles de maïs, de sorgho ou de mil. L'idée est que l'introduction de l'apomixie dans ces variétés garantirait au paysan les choix réalisés lors de la constitution des stocks de semences pour le cycle suivant : l'hétérogénéité génétique résultant de la reproduction sexuée ne permet pas de reproduire au cycle suivant les génotypes sélectionnés. Au contraire, l'apomixie apparaît comme un outil puissant puisqu'il maintient d'un cycle à l'autre les génotypes les plus performants. Cette stratégie n'implique pas un bouleversement des pratiques culturales, et repose sur l'utilisation de la diversité génétique locale. Elle permettrait alors d'éviter les inconvénients liés au remplacement des variétés traditionnelles, tels que leur disparition progressive ou la dégradation de l'environnement.

L'apomixie ne s'exprime pas chez les plantes cultivées d'importance alimentaire, et notamment chez les céréales. Cependant, elle est très répandue chez les graminées sauvages apparentées. L'unité de recherche "Diversité Génétique et Amélioration des Plantes" de l'ORSTOM (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération) possède la double expérience de l'étude et la conservation des ressources génétiques des plantes tropicales, et de l'apomixie (programme *Panicum maximum* lancé par J. Pernès en 1965). La convention, signée en 1986 entre l'ORSTOM et le CIMMYT pour une période de 5 ans (1989-94), était une valorisation des ces thèmes

de recherches. Les objectifs principaux étaient l'étude de la diversité génétique du complexe agamique des *Tripsacum* et des possibilités de transfert de gènes d'intérêt agronomique au maïs. Cette convention qui a été récemment reconduite pour 3 ans (1994-1997), a aujourd'hui pour objectif la production de la première céréale apomictique. Le transfert de l'apomixie aux céréales n'est pas une idée récente ; cependant, aucune des tentatives engagées dès 1960 en URSS pour le maïs, en 1980 pour le mil à l'Université de Géorgie, en 1985 pour le blé à l'Université de Utah, n'a abouti à ce jour. De ces différentes tentatives, il ressort que les obstacles majeurs au transfert sont : *i*) la plus ou moins grande proximité génétique de l'espèce donneuse et de l'espèce cultivée (problème de stérilité lors de l'hybridation avec l'espèce cultivée) ; *ii*) les caractéristiques de l'espèce cultivée, telles que le niveau de ploïdie (l'apomixie s'exprime naturellement chez des individus polyploïdes) et les possibilités de manipulation (cartographie génétique, cytogénétique) ; *iii*) l'identification des modes de reproduction.

Le couple maïs/*Tripsacum* représente aujourd'hui un modèle idéal pour le transfert de l'apomixie : outre son importance économique et donc l'impact considérable en cas de réussite, le maïs est une des plantes les plus étudiées tant sur le plan génétique que sur les aspects de la biologie de la reproduction ; de plus, les possibilités de croisements avec les *Tripsacum*, graminées sauvages apomictiques originaires du Mexique et d'Amérique Centrale, sont connues depuis les années 1930. D'autre part, ce programme dispose d'avantages encore jamais réunis pour la réalisation d'un tel projet : *i*) un matériel sauvage important et très diversifié (plus de 1000 introductions) ; *ii*) de nouvelles techniques d'étude cytoembryologique de l'apomixie et d'analyse du génome (cytométrie de flux, marquage moléculaire, hybridation *in situ*) acquises depuis le début des années 1980 et dont la mise en oeuvre est facilitée par le contexte scientifique du CIMMYT ; *iii*) l'expérience de différents groupes en ce qui concerne l'hybridation intergénérique maïs x *Tripsacum* (URSS ; Crop Evolution Laboratory, Urbana, Illinois ; CIMMYT, Maize Wide Cross Program).

Les travaux concernant le genre *Tripsacum* ont essentiellement porté sur des aspects taxonomiques et évolutifs (débat sur l'origine du maïs), et les modes de reproduction ont fait l'objet d'études sporadiques et souvent pauvrement documentées. L'initiation d'un programme de transfert de l'apomixie de *Tripsacum* au maïs ne pouvait donc être envisagée sans une étude plus approfondie de ce caractère (génétique, nature). Les principaux objectifs de ce travail étaient de caractériser les modes de reproduction dans le genre *Tripsacum*, et de gérer et analyser différents niveaux de rétrocroisements maïs-*Tripsacum* en vue du transfert de l'apomixie. L'étude des possibilités de manipulation de l'apomixie des *Tripsacum* a constitué un premier axe de recherches. Pour cela, deux thèmes ont été développés : *i*) la compréhension des mécanismes cytoembryologiques de l'apomixie,

et la recherche d'outils fiables d'identification des modes de reproduction ; *ii*) la production de matériels en ségrégation pour l'analyse des bases génétiques de l'expression de l'apomixie. La production de différentes générations d'hybrides maïs-*Tripsacum* et le suivi de l'apomixie au cours de ces différentes générations représentent un second axe qui a largement contribué au premier.

PARTIE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Apomixie, Utilisations, et Présentation du genre *Tripsacum*

A. APOMIXIE - GENERALITES ET DEFINITIONS

1. Présentation de l'apomixie

11. Définitions générales

Chez les végétaux supérieurs, la reproduction sexuée (ou **amphimixie**) est caractérisée par la double fécondation découverte à la fin du siècle dernier (Nawaschin 1898, Guignard 1899) : le gamétophyte femelle (ou sac embryonnaire) est une structure pluricellulaire composée d'une cellule centrale renfermant deux noyaux polaires, trois ou plusieurs cellules antipodes, deux synergides et une oosphère. Le gamétophyte mâle, ou grain de pollen, assure le transport de deux noyaux (reproducteur et végétatif) jusqu'au sac embryonnaire. Ces gamétophytes se différencient à partir de cellules qui sont des produits de la méiose ; les noyaux sont donc réduits, et les stocks chromosomiques qu'ils contiennent sont le résultat de recombinaisons entre les génomes parentaux. La double fécondation est caractérisée par *i*) la fusion du noyau reproducteur mâle avec l'oosphère à l'origine du futur embryon dont le génotype est différent de celui des parents et unique, et *ii*) par la fusion du noyau végétatif avec les deux noyaux de la cellule centrale à l'origine d'un tissu triploïde nourricier, l'albumen.

Le terme d'**apomixie** (par opposition à amphimixie) a été proposé pour la première fois par Winkler (1908) pour désigner l'ensemble des modes de reproduction asexuée, regroupant aussi bien la multiplication asexuée par graines (ou **agamospermie**) que les diverses formes de multiplication végétative (stolons, rhizomes, bulbes, etc...). Cependant, cette définition très large a été par la suite restreinte aux systèmes agamospermiques (Asker 1979, Nogler 1984a), qui se répartissent en deux grands types selon l'origine de l'embryon (Gustafsson 1946, Stebbins 1950) :

i) l'**embryonie adventive**, caractérisée par la différenciation des embryons directement à partir de cellules somatiques généralement nucellaires (absence de l'alternance des phases sporophytique et gamétophytique).

ii) l'**apomixie gaméophytique**, caractérisée par la formation de gaméophytes femelles non réduits (ou **apoméiose**, Renner 1916) dont les oosphères se développent parthénogénétiquement en embryons.

L'apomixie est largement répandue chez les végétaux supérieurs (plus de 300 espèces appartenant à au moins 10 familles, Hanna et Bashaw 1987), mais selon Savidan et Dujardin (1992) ces chiffres sont sous-estimés. L'embryonie adventive est caractéristique des Rutacées, et notamment du genre *Citrus*. L'apomixie gaméophytique se rencontre surtout chez les Astéracées, les Rosacées et les Graminées. C'est un mode de reproduction très commun chez les Panicoidées, qui renferme un grand nombre de plantes fourragères tropicales et quelques céréales.

12. Les modalités de l'apomixie gaméophytique

121. Cytoembryologie de la non réduction chez les espèces apomictiques

Deux grands types d'apoméiose, qui diffèrent principalement par l'origine du gaméophyte femelle non réduit, ont été décrits (Gustafsson 1946, Nogler 1984a, Asker et Jerling 1992 ; figure I-1) :

i) l'**aposporie** : une ou plusieurs cellules somatiques, le plus souvent nucellaires, se différencient après deux (type *Panicum*) ou trois mitoses (type *Hieracium*) en gaméophytes femelles. Parallèlement, la cellule mère des mégaspoires réalise la méiose, mais les produits méiotiques avortent généralement à un stade plus ou moins avancé de la mégasporogenèse ou de la mégagamétogenèse. Différents gaméophytes femelles (plusieurs non-réduits, et parfois un réduit) peuvent donc coexister dans le nucelle. Chez différentes espèces (*Paspalum secans*, Snyder 1957 ; *Bothriochloa-Dichanthium*, Harlan *et al.* 1964 ; *Panicum maximum*, Savidan 1982), une différence de précocité entre ces deux types de gaméophytes a été observée : ceux d'origine apoméiotique sont plus précoces. Les gaméophytes réduits sont alors dans une situation défavorable (taille, situation par rapport au micropyle), qui le plus souvent ne leur permet pas d'être fécondés. Selon Harlan *et al.* (1964), l'aposporie ne représente pas une alternative allélique à la sexualité, mais se surimpose à celle-ci.

ii) la **diplosporie** : le gaméophyte femelle se différencie à partir de la cellule mère des mégaspoires, soit directement par mitoses (type *Antennaria*), soit après perturbation de la méiose (ex., noyaux de restitution ; types *Taraxacum* et *Ixeris*). Dans ce cas, un seul gaméophyte femelle non réduit est produit. De plus, cet avortement de la méiose est caractérisé chez *Elymus rectisetus* (type *Taraxacum*) par une absence de callose lors de la mégasporogenèse, alors que des dépôts de callose sont observés chez les formes sexuées apparentées (Carman *et al.* 1991).

122. Développement de l'embryon et de l'albumen

Les cas d'apomixie gamétophytique autonome, c'est à dire développement parthénogénétique de l'oosphère et des noyaux polaires, sont rares sauf chez les Astéracées (ex., *Taraxacum*, Richard 1973). Généralement, la fusion des noyaux polaires avec le noyau végétatif mâle est nécessaire à la formation de l'albumen (**pseudogamie**), et donc de la graine. Le développement des embryons peut alors être initié, comme chez les sexués, après cette fusion (ex., *Panicum maximum*, Warmke 1954), ou avant (embryonie précoce. ex., *Poa*, Tinney 1940). Dans les cas d'embryonie précoce, les premières divisions de l'embryon ont lieu avant l'anthèse, mais la fécondation des noyaux polaires reste indispensable au développement ultérieur de la graine.

13. Caractéristiques des espèces apomictiques

131. Polyploïdie

Chez la quasi totalité des espèces apomictiques, la relation entre niveau de ploïdie et modes de reproduction est très forte : mis à part de très rares cas (formes diploïdes sauvages ou dihaploïdes obtenus expérimentalement ; Nogler 1984a, Asker et Jerling 1992), l'apomixie gamétophytique ne s'exprime que chez les formes polyploïdes, alors que la reproduction sexuée est confinée au niveau diploïde. De telles espèces, qui présentent un compartiment polyploïde apomictique et un compartiment diploïde sexué, constituent des complexes agamiques (Babcok et Stebbins 1938). L'étude de certains de ces complexes agamiques a montré que des flux génétiques sont possibles entre les deux compartiments grâce à des cycles diploïdes-tétraploïdes-polyhaploïdes (*Bothriochloa-Dichanthium*, de Wet 1968 ; *Panicum maximum*, Savidan et Pernès 1978). De plus, tous les modèles mathématiques construits pour rendre compte de l'évolution des complexes agamiques montrent que l'apomixie élimine plus ou moins rapidement la sexualité quelque soit son déterminisme génétique (Pernès 1975, Williams 1975, Marshall et Brown 1981).

Les mécanismes qui protègent le niveau diploïde de l'apomixie sont encore inconnus, mais différentes hypothèses ont été formulées : *i*) le ratio allélique entre l'allèle A responsable de l'aposporie et a, l'allèle sauvage, doit être inférieur ou égal à 0.25 pour que l'apomixie s'exprime (*Panicum maximum*, Noirot 1993) ; *ii*) plusieurs copies du ou des gènes contrôlant l'apomixie sont nécessaires pour son expression (*Taraxacum*, Mogie 1988) ; *iii*) le gène responsable de l'apomixie pourrait être un facteur récessif létal pour le pollen (*Ranunculus auricomus*, Nogler 1984a). Cependant, elles n'expliquent que partiellement les observations et données dont on dispose (ex., triploïdes apomictiques ; forme trisomique apomictique et fertile chez *Ranunculus auricomus*, Nogler 1984b).

132. Hétérozygotie

Chez toutes les espèces étudiées, une grande diversité est observée chez les individus issus de croisements entre plantes sexuées et apomictiques, révélant de forts taux d'hétérozygotie (Nogler 1984a). L'apomixie agit donc comme un fixateur de l'hétérozygotie. L'un des bénéfices pour les individus apomictiques est donc le maintien de l'hétérosis qui résulte de ces structures très hétérozygotes. Cet hétérosis est aussi révélé par la faible vigueur souvent observée chez les descendants hybrides d'apomictiques après autofécondation (Savidan 1982) ou allofécondation (Nogler 1984a).

2. Conséquences de l'apomixie gamétophytique sur les descendances

La combinaison non réduction des gamétophytes femelles / développement parthénogénétique des embryons fait de l'apomixie gamétophytique un mode de reproduction asexué : les descendants sont génétiquement identiques à la plante mère.

L'apomixie est obligatoire quand l'ensemble des descendants constitue un clone de la plante mère. Cependant, il semble que cette situation soit un cas extrême (Nogler 1984a) ; en effet, la plupart du temps, l'apomixie est facultative autorisant l'apparition d'individus "hors types" dans des proportions variables. Ceux-ci résultent de la réalisation ou non de l'un ou des deux composants de l'apomixie (tableau I-1) :

- i) fécondation d'un gamète femelle non réduit (hybrides $2n+n$). Elle a pour conséquence une accumulation de génomes ;
- ii) fécondation d'un gamète femelle réduit (sexualité, hybrides $n+n$) ;
- iii) développement parthénogénétique d'un gamète réduit (polyhaploïdisation, hors types $n+0$).

Tableau I-1. Différentes classes de descendances chez une plante apomictique facultative pseudogame en fonction des événements de fécondation et de méiose.

ORIGINE DU SAC EMBRYONNAIRE	DEVELOPPEMENT DE L'OOSPHERE	
	Parthénogenèse	Fécondation
Apoméiose (non réduit)	Apomixie $2n+0$	Accumulation génomique $2n+n$
Méiose (réduit)	(Poly)haploïdisation $n+0$	Sexualité $n+n$

D'autres sources de variation sont possibles telles que les mutations ou des modifications du génome lors de la formation de noyaux de restitution (cas des espèces diplosporiques). Les mutations, souvent récessives, sont rarement exprimées d'autant plus que l'apomixie s'exprime chez des individus

polyploïdes. Les modifications génomiques peuvent correspondre soit à des autoségrégations (subsexual reproduction, Darlington 1939) résultant de la formation de bivalents avant la restitution des noyaux (*Agropyron scabrum*, Hair 1956) ; soit à des pertes de chromosome(s) lors de la restitution des noyaux (*Taraxacum*, Sørensen 1958).

3. Contrôle génétique

Les premiers croisements entre plantes sexuées et apomictiques, notamment chez *Hieracium*, suggéraient une hérédité simple de l'aposporie (Mendel 1869, Ostefeld 1910). Cependant, à la suite des travaux de Müntzing (1940) chez *Poa* (aposporie) et de Powers (1945) chez *Parthenium* (diplosporie), le déterminisme de l'apomixie a été supposé beaucoup plus complexe : Müntzing a postulé, suite à l'observation d'hybrides intraspécifiques (*P. alpina*) et interspécifiques (*P. alpina* x *P. pratensis*), qu'une "balance génétique délicate" est responsable de l'expression de l'apomixie. Cependant, la nature même du matériel utilisé (aneuploïdie chez les *Poa*, présence de chromosomes accessoires chez *P. alpina*), et l'utilisation de tests de descendance (voir annexe II, paragraphe 22) basés uniquement sur les nombres chromosomiques montrent le manque de fiabilité de ces résultats. Powers, quant à lui, a proposé un modèle faisant intervenir trois gènes récessifs à l'état homozygote, chacun d'entre eux étant impliqué dans une étape de la réalisation de l'apomixie (non réduction, absence de fécondation, et développement parthénogénétique). Cependant, chacun de ces trois gènes est individuellement défavorable, et leur association, à l'état homozygote dans des structures polyploïdes, apparaît trop complexe pour expliquer la très grande distribution de l'apomixie et son maintien ; ce modèle n'a jamais pu être vérifié par la suite (Gerstel et Mishanec 1950).

Les travaux de Harlan *et al.* (1964) marquent une rupture dans l'étude du déterminisme génétique de l'apomixie : les résultats obtenus chez *Bothriochloa-Dichanthium* (Panicoïdées) montrent que l'aposporie est déterminée par un allèle dominant, A. Ceux-ci seront par la suite confirmés pour différentes espèces aposporiques de la même sous-famille (*Panicum maximum*, Savidan 1982 ; *Cenchrus ciliaris*, Sherwood *et al.* 1994 ; *Brachiaria* spp., do Valle et Miles 1994), ainsi que pour deux dicotylédones (*Beta lomatogona*, Cleij *et al.* 1976 ; *Ranunculus auricomus*, Nogler 1984b). De plus, bien que dans certains cas apomixie et parthénogenèse soient totalement liées (hypothèse d'un "supergène" chez *Panicum maximum*, Savidan 1982), il semble que cette liaison soit plus ou moins forte selon les espèces (Nogler 1984a). D'autres auteurs ont proposé un modèle légèrement différent à deux locus avec épistasie : l'aposporie est déterminée par un allèle dominant au premier locus, mais la sexualité est restaurée par l'allèle dominant d'un second locus épistatique sur le premier (*Cenchrus ciliaris*, Taliaferro et Bashaw 1966). Cependant, l'observation d'hybrides apomictiques dans la descendance en autofécondation de l'individu sexué utilisé pour cette étude, révèle un choix pour le moins contestable des génotypes de départ.

En ce qui concerne la diplosporie, peu d'espèces ont été étudiées, et les résultats suggèrent aussi un déterminisme simple. Chez *Eragrostis curvula*, l'analyse de 16 hybrides F1 indique que la diplosporie est dominante sur la sexualité (Voigt et Bashaw 1972). De plus, Mogie (1988) a montré que le ou les gènes responsables de l'expression de l'apomixie chez *Taraxacum* sont localisés sur un seul chromosome.

Quelque soit le type d'apomixie gamétophytique, les résultats obtenus chez différentes espèces phylogénétiquement très éloignées montrent que le déterminisme génétique de l'apoméiose (diplosporie et aposporie) est monogénique et dominant sur la sexualité. La liaison entre ce gène responsable de la non réduction et le ou les facteurs responsables du développement parthénogénétique semble être forte (Savidan 1982). Néanmoins, des hybrides entre plantes sexuées et apomictiques, capables de réaliser la non réduction mais sans développement parthénogénétique des oosphères en embryons ont été décrits (*Ranunculus auricomus*, Nogler 1984b ; *Allium tuberosum*, Kojima 1994). D'une façon générale, le déterminisme génétique de la parthénogenèse chez les apomictiques n'a jamais été étudié.

B. UTILISATIONS DE L'APOMIXIE EN AMELIORATION DES PLANTES ET EN AGRICULTURE : AVANTAGES ET POTENTIELS

1. Impacts de l'apomixie en amélioration des plantes et en agriculture

L'apomixie est un mode de reproduction unique car il permet le maintien et la multiplication par graines de structures génotypiques complexes (ex., autopolyploïdes, lignées d'addition ou de substitution, aneuploïdes), de caractères complexes (hétérosis), ou de génotypes stériles impossibles ou difficiles à reproduire par sexualité. Le transfert aux plantes cultivées d'un tel mode de reproduction pourrait donc avoir un impact important aussi bien pour les ressources génétiques et l'amélioration des plantes que pour l'agriculture (Bashaw 1980, Hanna et Bashaw 1987, Savidan et Dujardin 1992, Jefferson 1994).

11. Ressources génétiques et amélioration des plantes

11.1. Ressources génétiques

L'un des objectifs de l'étude des ressources génétiques est d'identifier et d'étudier au sein des espèces apparentées aux plantes cultivées des caractères d'intérêt. L'analyse des génomes et de l'expression de ces caractères pourrait être favorisée par l'apomixie ; la production de lignées d'addition combinant le stock chromosomique d'une espèce cultivée et un à plusieurs chromosomes d'une espèce sauvage apparentée est un outil précieux pour l'étude de caractères d'intérêt chez l'espèce

sauvage (Gale et Miller 1987, Miller et Reader 1987). Le problème majeur de ce type d'approche est le maintien des lignées d'addition, les taux de transmission de certains chromosomes de l'espèce sauvage pouvant être très faibles ou nuls. Ce problème peut être surmonté par la constitution de lignées disomiques par autofécondation des lignées d'addition monosomiques (Littlejohn et Pienaar 1995). L'apomixie représente une autre solution pour la gestion de tels matériels et notamment leur maintien : la répartition des chromosomes de l'espèce sauvage chez différents individus apomictiques de l'espèce cultivée permettrait la constitution de stocks "immortels".

L'apomixie permet aussi de contourner la stérilité de combinaisons génétiques provoquée par les barrières de reproduction entre les espèces cultivées et leurs pools secondaire ou tertiaire. Une exploitation plus large des ressources génétiques des plantes cultivées serait alors possible, dont la conséquence serait un choix plus important pour la sélection grâce à une augmentation des combinaisons génétiques viables.

112. Amélioration des plantes

L'introduction de l'apomixie dans les schémas d'amélioration des plantes aurait un impact immédiat sur la création variétale par l'exploitation directe de structures hétérozygotes présentant un important potentiel (ex., F2 après fécondation libre de F1) que la sexualité ne permet pas de conserver.

L'ultime phase de l'amélioration des plantes consiste à mettre à la disposition des utilisateurs les variétés issues de la sélection. Cette multiplication des semences passe par des schémas souvent complexes et coûteux dont l'un des buts essentiels est de pouvoir reproduire identiques à elles-mêmes des structures génotypiques particulières (ex., hybrides F1, génotypes triploïdes). L'apomixie présente alors l'avantage important de pouvoir s'affranchir de ces schémas.

12. Agriculture

La multiplication des semences hybrides directement par les utilisateurs serait possible grâce à l'apomixie. Ceci permettrait de réduire la dépendance de ces derniers vis à vis de la distribution, notamment dans les pays en voie de développement où les infrastructures sont souvent mal organisées (systèmes nationaux de production des semences déficients, problèmes de stockage, transports). L'une des conséquences principales de cette situation est un coût des semences trop élevé pour le paysan et des retards dans les livraisons.

Cependant, l'impact majeur de l'apomixie pourrait être de réussir là où la Révolution Verte a échoué. Ce mode de reproduction pourrait à la fois avoir un impact sur les rendements des variétés traditionnelles, et ne bouleverser ni les pratiques culturales, ni les écosystèmes. Les variétés à hauts rendements (hybrides ou à pollinisation libre) nécessitent l'emploi massif d'intrants pour atteindre leur potentiel. De plus, l'environnement souvent hostile dans lequel sont cultivées ces variétés (stress

hydrique, sols pauvres, ravageurs), ne leur permet pas d'atteindre les performances enregistrées en stations expérimentales, ni même, dans certains cas, le rendement des variétés locales non améliorées (Jaffé et Rojas 1994). L'introduction de l'apomixie dans les variétés traditionnelles garantirait aux paysans les choix réalisés pour constituer les stocks de semences pour le cycle suivant. Les semences des meilleurs épis ou chandelles constituant des clones des plantes mères, le cycle suivant sera alors constitué principalement de ces génotypes performants.

2. De la théorie à la pratique...

L'apomixie s'exprime le plus souvent en conditions polyploïdes, notamment chez les apparentés sauvages des céréales (Brown et Emery 1958). Cependant, les rares cas où ce mode de reproduction fonctionne au niveau diploïde ou en conditions aneuploïdes suggèrent qu'il est possible, au moins dans certaines conditions, de s'affranchir de la relation apomixie/polyploïdie.

Deux autres obstacles importants à l'exploitation de l'apomixie sont aussi à mentionner :

i) l'apomixie pseudogame obligatoire n'existe vraisemblablement pas, et des taux de hors types $2n+n$ trop importants en limiteraient les avantages (augmentation des niveaux de ploïdie). Les hors types $n+n$ représentent généralement une catégorie moins importante. Ils constituent cependant une source de variation non négligeable et indispensable à l'utilisation de l'apomixie dans les variétés traditionnelles.

ii) les balances génétiques entre embryon et albumen, et entre les génomes parentaux participant à la formation de l'albumen, semblent jouer un rôle important dans le développement de l'albumen et de la graine (D'Amato 1984, Lin 1984, Lopes et Larkins 1993). Les céréales sont les principales plantes alimentaires, et la partie consommée est l'albumen. Or tous les types d'apomixie (sauf l'apospore de type *Panicum*) modifient ces équilibres. Les conséquences de l'expression de l'apomixie chez une céréale pourraient donc être néfastes pour la formation et le développement des grains. Il faut cependant noter que, chez les apomictiques pseudogames, différents mécanismes restaurant des balances similaires à celles observées chez les plantes sexuées ont été observés (fécondation de chacun des noyaux polaires par un noyau mâle, Reddy et d'Cruz 1969 ; double fécondation des noyaux polaires après leur fusion, Izmailow 1967).

Pour chacun de ces obstacles d'ordre biologique, mais fondamentaux pour la faisabilité du transfert de l'apomixie et l'exploitation de génotypes apomictiques, les mécanismes sous-jacents sont encore largement inconnus (voir A-1-13 pour la polyploïdie), et demandent à être mieux compris.

Les possibilités de manipulation de l'apomixie chez les espèces cultivées soulèvent donc différents problèmes concernant la faisabilité du transfert de ce mode de reproduction. Ce travail est une contribution au transfert de l'apomixie chez le maïs et seuls les problèmes liés à l'expression de

l'apomixie et à ses conséquences ont été présentés. Cependant, il est clair que, si l'apomixie doit être dans un futur proche un nouvel outil pour le sélectionneur et le paysan, une réflexion doit être engagée en ce qui concerne :

i) l'utilisation de l'apomixie en amélioration des plantes. La conduite de schémas d'amélioration génétique impliquant des génotypes apomictiques est courante chez les espèces fourragères tropicales (ex., *Brachiaria*, *Cenchrus*) (do Valle et Miles 1992), et une adaptation de ces schémas ne présente pas de difficultés majeures.

ii) les modalités de l'introduction de l'apomixie dans les variétés traditionnelles : au contraire des variétés améliorées qui peuvent être largement distribuées, l'introduction doit être faite au niveau local, ce qui implique l'intercroisement de génotypes apomictiques et de génotypes préexistants.

iii) la structure des variétés apomictiques améliorées (monoclonale, composite) et les possibilités d'exploitation de la sexualité résiduelle pour maintenir un brassage de gènes d'un cycle à l'autre ;

iv) les risques associés à la culture de plantes apomictiques : effet de l'apomixie et de la sélection sur la structure génétique des variétés traditionnelles ; pollution des populations apparentées sauvages ou adventices par l'apomixie et effet sur leur diversité, et à plus long terme sur les ressources génétiques des espèces cultivées.

C. LES TENTATIVES D'INTRODUCTION DE L'APOMIXIE CHEZ LES PLANTES CULTIVEES

Deux stratégies sont aujourd'hui envisageables pour introduire l'apomixie chez les plantes cultivées : l'exploitation des espèces sauvages apparentées, et la synthèse à partir de plantes exprimant l'un des deux composants de l'apomixie ou directement à partir de formes sexuées par mutagenèse dirigée. La synthèse de l'apomixie *de novo* (mutagenèse) est une approche qui n'a pas encore permis de produire à partir de plantes sexuées des formes apomictiques. Elle conduit généralement à la production de mutants exprimant un des composants de l'apomixie. De même, les tentatives de synthèse de l'apomixie à partir de croisements entre génotypes produisant une forte proportion de gamètes non réduits et génotypes présentant des aptitudes à la parthénogenèse, n'ont jamais permis d'obtenir des hybrides dont le mode de reproduction soit apomictique.

Le transfert de l'apomixie aux plantes cultivées par rétrocroisement à partir d'espèces sauvages apparentées et apomictiques n'est tenté que chez les céréales. Trois céréales majeures, pour lesquelles des espèces apparentées sauvages apomictiques sont connues, sont concernées : le maïs, le mil, et le blé. Les recherches entreprises et l'état d'avancement de ces travaux sont présentés ci-dessous.

1. Le transfert chez les Triticées

Elymus rectisetus est la seule espèce apomictique (diplosporée) connue chez les Triticées (Hair 1956, Crane et Carman 1987). C'est une espèce hexaploïde ($2n=6x=42$), morphologiquement proche de l'espèce sexuée *E. scabrus*. Ces deux espèces, endémiques de l'Australie et de la Nouvelle Zélande, possèdent trois génomes S, Y et W (Carman et Wang 1992, Torabinejad et Mueller 1993a). Cette situation apparaît comme la plus complexe : les possibilités de croisement entre des blés cultivés (*Triticum aestivum*, $2n=6x=42$, AABBDD) et *E. rectisetus* sont très limitées (Carman et Wang 1992). Cinq hybrides ont récemment été obtenus (Liu *et al.* 1994), mais quatre d'entre eux sont issus de la fécondation d'un gamète réduit chez le blé par un noyau mâle non réduit ($2n=63$, ABDSSYYWW), alors que le dernier possède 42 chromosomes (ABDSYW). Les hybrides interspécifiques à 42 chromosomes obtenus à partir de *E. rectisetus* et *E. scabrus*, sont mâles stériles, et aucun descendant n'a été obtenu après rétrocroisement avec du blé (Ahmad et Comeau 1991, Liu *et al.* 1994). Cette stérilité est certainement liée aux divergences entre les différents génomes concernés, et le doublement chromosomique semble être la seule voie possible d'utilisation de ces hybrides (Liu *et al.* 1994). Finalement, deux hybrides BC1 ($2n = 54$ et 60) ont été produits à partir d'un des hybrides F1 blé x *E. rectisetus* à 63 chromosomes (Liu *et al.* 1994). Ces deux BC1 résultent vraisemblablement de la fécondation de gamètes réduits mais non équilibrés. De plus, le mode de reproduction des hybrides F1 est sexué, mais environ 5% de mégasporocytes observés ont un développement similaire à celui observé chez le parent sauvage (Peel 1993).

Torabinejad et Mueller (1993b) mentionnent aussi la production d'hybrides partiellement apomictiques entre *E. rectisetus* et *Hordeum vulgare*. Ces derniers combinent 42 chromosomes de l'espèce sauvage et 7 de l'espèce cultivée.

2. Le transfert chez le mil

Trois espèces apomictiques (apospore), appartenant au pool génétique tertiaire du mil (*Pennisetum glaucum*, $x=7$), ont été utilisées pour le transfert de l'apomixie chez l'espèce cultivée (Hanna 1987). Les hybrides obtenus entre mils diploïdes et *P. setaceum* ($2n=3x=27$) ou *P. orientale* ($2n=4x=36$) étaient tous mâles stériles, mais présentaient une relative fertilité femelle. Aucun hybride n'a été obtenu en utilisant des mils tétraploïdes (Hanna 1979, Hanna et Dujardin 1982, Dujardin et Hanna 1989a). Cependant, ces deux espèces ont été abandonnées, les auteurs de ce travail ayant toujours considéré qu'ils disposaient d'un matériel apomictique obligatoire. L'ensemble de la descendance étant un clone de la plante mère, aucun descendant issu d'un événement de recombinaison ne pouvait être espéré. Une telle hypothèse, sans qu'elle ait été vraiment vérifiée, condamnait donc la voie femelle pour le transfert, et imposait une contrainte très forte au schéma de transfert (production d'hybrides mâles fertiles dès la génération F1). La présence d'espèces sauvages apomictiques proches

des mils cultivés a permis de la surmonter grâce à un croisement complexe. Dans le cas des autres tentatives de transfert, l'espèce donneuse est beaucoup plus éloignée (pool génétique tertiaire), et seule la facultativité de l'apomixie permet de contourner la stérilité mâle des premières générations hybrides.

Le croisement mil tétraploïde x *P. squamulatum* ($2n=6x=54$) s'est révélé plus prometteur, car facile à réaliser et produisant des hybrides fertiles exprimant l'apomixie à des taux importants (Dujardin et Hanna 1983). Cependant, les descendants de ces hybrides, utilisés comme parents mâles lors de recroisement avec le mil tétraploïde, étaient mâles stériles (Dujardin et Hanna 1985). L'utilisation d'une espèce-pont sexuée, *P. purpureum* ($2n=36$), a cependant permis de surmonter ces problèmes de stérilité mâle (Dujardin et Hanna 1984). A partir d'un trihybride complexe [*(P. glaucum* x *P. purpureum*) x (*P. glaucum* x *P. squamulatum*)], un programme de rétrocroisement a été entrepris, le mil tétraploïde étant utilisé comme parent femelle. Des hybrides BC3 à 29 chromosomes et apomictiques ont ainsi été produits (Dujardin et Hanna 1989b), mais leur descendants n'exprimaient plus que quelques pourcents d'apomixie et leur fertilité a brusquement chuté (Hanna *et al.* 1993). La perte de chromosomes de l'espèce cultivée dans un tel schéma est favorisée par l'utilisation d'hybrides polyploïdes interspécifiques comme parents mâles, et aussi par la structure autopolyploïde du parent récurrent (risques de méioses mal équilibrées). Les plantes à 29 chromosomes pourraient donc être, non pas des lignées d'addition combinant 28 chromosomes de l'espèce cultivée et un chromosome *P. squamulatum* porteur du ou des gènes responsable de l'expression de l'apomixie, mais des lignées de substitution (Ozias-Akins *et al.* 1992). Les auteurs ont donc apparemment décidé de repartir de la génération BC2.

L'utilisation des hybrides interspécifiques produits au cours de cette tentative a permis d'identifier, pour la première fois, des marqueurs moléculaires RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et RAPD (Random Amplified Polymorphism of DNA) associés au mode de reproduction apomictique (Ozias-Akins *et al.* 1993). Cependant, le matériel végétal utilisé pour la recherche de ces marqueurs n'était pas une population en ségrégation pour les modes de reproduction, mais deux groupes d'hybrides (sexué et aposporique) issus du programme de transfert de l'apomixie au mil à partir de *P. squamulatum*. Leur liaison génétique avec la région d'intérêt n'a donc pas pu être estimée, et ils représentent plus des marqueurs du chromosome porteur du ou gènes de l'aposporie, qu'un marqueur de l'aposporie elle-même. En l'absence de données sur les possibilités de recombinaison de ce chromosome avec le génome cultivé, l'utilisation de tels marqueurs pour le suivi de l'aposporie dans un programme de rétrocroisement semble donc délicate.

3. Le transfert chez le maïs

Tripsacum est le seul genre apparenté sauvage apomictique (diplosporie) de la tribu des Andropogonées (Brown et Emery 1958) à laquelle appartient le maïs. Il représente donc la seule source d'apomixie exploitable par rétrocroisements en vue du transfert de l'apomixie chez cette céréale majeure.

Le projet le plus ancien a été initié en ex-URSS en 1962 par l'équipe de Petrov à Novosibirsk. Il avait pour objectif la production d'un maïs apomictique en utilisant *Tripsacum dactyloides* comme espèce donneuse ; des hybrides apomictiques maïs tétraploïde-*T. dactyloides* (F1, rétrocroisements) ont été produits (Petrov *et al.* 1984). Cependant, bien que ce projet n'ait toujours pas abouti, notamment en raison des nombreuses difficultés auxquelles sont confrontés les chercheurs de l'ex-URSS, des plantes combinant les 20 chromosomes du maïs et un stock chromosomique du *Tripsacum* ont pu être obtenues. Une partie du matériel hybride produit a cependant été récemment récupérée par un projet de transfert financé par l'USDA (United States Department of Agriculture) et mené par B. Kindiger (Station expérimentale USDA de Woodward, Oklahoma, USA).

Le second projet de transfert de l'apomixie au maïs, initié en 1989 par l'ORSTOM en collaboration avec le CIMMYT. Ce programme "Diversité génétique des *Tripsacum* et transfert de gènes au maïs" est aujourd'hui entièrement consacré au transfert de l'apomixie. Une partie des résultats présentés dans ce document en présente l'état d'avancement.

D. COMPLEXE AGAMIQUE DES *TRIPSACUM*

1. Description et organisation du genre *Tripsacum*

11. Morphologie et taxonomie

Apparenté au genre *Zea*, *Tripsacum* appartient à la tribu des Andropogonées (Poacées). Il est endémique du Nouveau Monde, et son aire de distribution s'étend du nord des Etats-Unis (Nebraska, état de New York) au sud du Brésil (42°N-26°S). Cependant, le Mexique, qui rassemble la majorité des espèces, est considéré comme le centre de diversité du genre (Berthaud et Savidan 1989). Les *Tripsacum* sont des graminées sauvages, vigoureuses et pérennes, et occupent des niches écologiques variées. Elles forment des touffes compactes, constituées de talles rhizomateux à entre-noeuds courts (figures I-2a et 2b). Les talles florifères, quant à eux, ont des entre-noeuds allongés ; ils portent une inflorescence terminale et, à chaque noeud, des inflorescences secondaires. Toutes les espèces sont allogames, monoïques, et à floraison protogyne. Cependant, contrairement au genre *Zea* où les sexes sont séparés (inflorescence terminale mâle et inflorescences secondaires femelles), les inflorescences

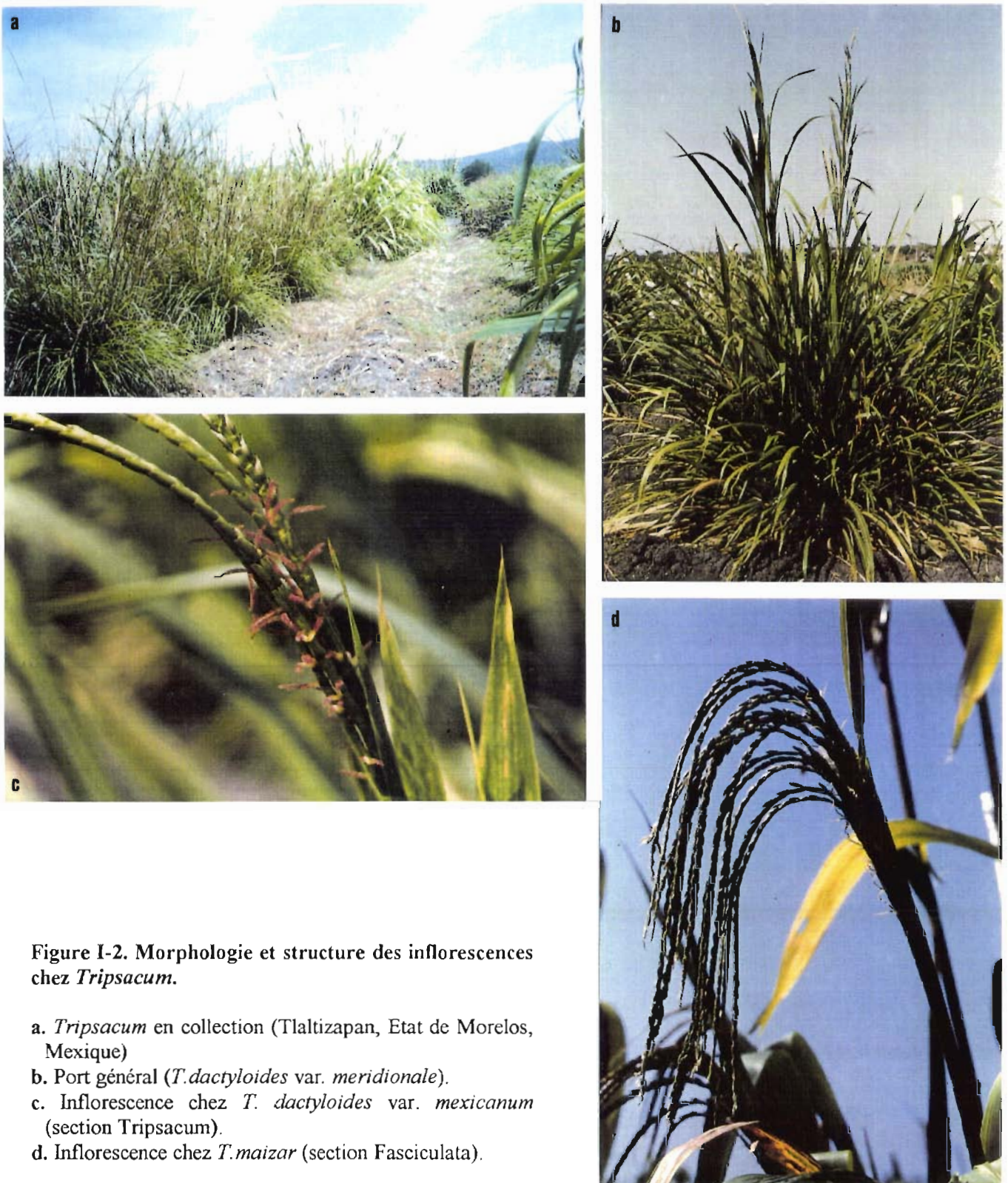


Figure I-2. Morphologie et structure des inflorescences chez *Tripsacum*.

- a. *Tripsacum* en collection (Tlaltizapan, Etat de Morelos, Mexique)
- b. Port général (*T. dactyloides* var. *meridionale*).
- c. Inflorescence chez *T. dactyloides* var. *mexicanum* (section *Tripsacum*).
- d. Inflorescence chez *T. maizar* (section *Fasciculata*).

chez *Tripsacum* portent les deux sexes (figures I-2c et 2d) : la partie basale, plus ou moins ramifiée, est composée d'articles portant une seule fleur femelle, et les fleurs mâles sont réunies dans la partie terminale de chaque ramification de l'inflorescence (une paire d'épillets par article).

Le genre présente une grande variabilité morphologique, et de nombreuses études taxonomiques ont été réalisées (Cutler et Anderson 1941, Randolph 1970, de Wet *et al.* 1976, 1981). 16 espèces, classiquement regroupées en deux sections, *Tripsacum* et *Fasciculata*, ont été décrites. La distinction entre les deux sections repose principalement sur le type de ramification de la partie basale de l'inflorescence terminale et la présence d'épillets mâles pédicellés (tableau I-2).

Tableau I-2. Espèces, nombre de chromosomes et distribution. a. Section *Tripsacum*. Les inflorescences terminales ont au plus 10 ramifications toujours dressées et les épillets mâles sont sessiles. b. Section *Fasciculata*. Les inflorescences terminales sont très ramifiées avec la partie terminale plus ou moins pendante et l'un des épillets mâles est pédicellé.

Espèces	Nombres de chr.	Distribution
a. Section <i>Tripsacum</i>		
<i>T. andersonii</i>	64	Amérique Centrale, Amérique du Sud
<i>T. australe</i>	36	Amérique du Sud
<i>T. bravum</i>	36, 72	Mexique
<i>T. cundinamarce</i>	36	Amérique du Sud
<i>T. dactyloides</i>		
var. <i>meridionale</i>	36	Amérique du Sud
var. <i>dactyloides</i>	36, 54, 72, 90,108	Etats-Unis, Mexique
var. <i>hispidum</i>	36, 54, 72, 90,108	Etats-Unis, Mexique, Amérique Centrale
<i>T. floridanum</i>	36	Floride, Cuba
<i>T. intermedium</i>	72	Mexique, Amérique Centrale
<i>T. latifolium</i>	36	Mexique , Amérique Centrale
<i>T. manisuroides</i>	36	Mexique
<i>T. peruvianum</i>	72, 90, 108	Amérique du Sud
<i>T. zopilotense</i>	36, 54, 72	Mexique
b. Section <i>Fasciculata</i>		
<i>T. jalapense</i>	72	Guatemala, Mexique
<i>T. lanceolatum</i>	72	Arizona, Mexique
<i>T. laxum</i>	36	Mexique
<i>T. maizar</i>	36, 54, 72	Mexique
<i>T. pilosum</i>	36, 72	Mexique

12. Cytologie

Les espèces du genre *Tripsacum* sont pour la plupart polyploïdes (3x, 4x, 5x, et 6x, tableau I-2), avec un nombre chromosomique de base $x=18$ (Reeves et Mangelsdorf 1935). Bien que les individus à 36 chromosomes se comportent cytologiquement comme des diploïdes, ce nombre représente une

exception chez les graminées ($x=9$ ou 7 est le plus commun), et suggère une origine polyploïde ancienne. Différentes hypothèses ont été proposées pour rendre compte de cette situation : les formes diploïdes ($2n=36$) seraient des amphidiploïdes tétraploïdes et les formes tétraploïdes ($2n=72$) des allopolyploïdes octoploïdes (Anderson 1944) ; *Tripsacum* résulterait de l'hybridation intergénérique entre *Zea* ($x=10$) et *Manisuris* ($x=9$) avec perte ultérieure d'un chromosome (Galinat *et al.* 1964) ; les formes tétraploïdes seraient des allopolyploïdes dérivant de deux espèces, *T. zopilotense* et *T. maizar* (Randolph 1955).

T. andersonii représente un cas particulier au sein du genre : cette espèce, qui résulte d'une hybridation spontanée entre *Zea* ($x=10$) et *Tripsacum*, possède 64 chromosomes (10 chromosomes provenant de *Zea* et 54 provenant de *Tripsacum*) (Talbert *et al.* 1990). Elle est totalement stérile, et sa propagation est assurée par rhizomes.

13. Modes de reproduction

T. dactyloides est la seule espèce du genre qui ait fait l'objet d'une étude des modes de reproduction (Farquharson 1955, Brown et Emery 1958, Burson *et al.* 1990). De plus, les quelques introductions étudiées sont originaires des Etats Unis, et constituent donc un échantillonnage très réduit du genre, mais aussi de l'espèce. Bien que Farquharson n'en décrive pas les mécanismes cytoembryologiques, elle mentionne une apomixie facultative et pseudogame chez les formes polyploïdes ainsi que des taux de polyembryonie élevés, alors que les formes diploïdes sont sexuées. La diplosporie est décrite pour la première fois par Brown et Emery (1958) chez une introduction tétraploïde. Cependant, alors que la diplosporie est confirmée par Laikova (1976) chez des hybrides maïs-*T. dactyloides*, de Wet *et al.* (1973) décrivent une apomixie de type aposporie dans le même type de matériel.

L'étude cytoembryologique la plus complète du mode de reproduction chez quelques polyploïdes de *T. dactyloides* ($2n=54$ et 72) montre que l'apomixie est pseudogame et diplosporique de type *Antennaria* (Burson *et al.* 1990).

2. Possibilités d'introgessions entre *Tripsacum* et maïs

21. Croisements distants maïs-*Tripsacum* et possibilités d'introgession

La faisabilité du croisement entre maïs et *Tripsacum dactyloides* a été démontrée pour la première fois par Mangelsdorf et Reeves (1931), qui ont obtenu 29 hybrides issus de croisements impliquant des individus *T. dactyloides* diploïdes et un hybride avec un *T. dactyloides* tétraploïde. Un programme de rétrocroisements a été par la suite entrepris, et des plantes à 20 chromosomes et morphologiquement identiques au maïs produites. D'autres travaux ont par la suite confirmé la faisabilité de tels croisements (Petrov *et al.* 1984, James 1979, Bernard et Jewell 1985) et les possibilités de retour vers des maïs introgressés (Harlan et de Wet 1977).

L'analyse cytogénétique de ces hybrides a permis de montrer les possibilités d'introgession du génome du maïs par des fragments d'ADN issu de *Tripsacum* : des homéologies importantes entre les deux génomes ont été détectées (Maguire 1962, Galinat 1971) confirmant les possibilités d'appariements et de recombinaison (Maguire 1960, Harlan *et al.* 1970). Ces introgressions ont récemment été observées par hybridation *in situ* chez des plantes à 20 chromosomes issues d'un programme de rétrocroisement impliquant le maïs et un *T. dactyloides* (N. Islam-Faridi, Université Texas A&M, communication personnelle). De plus, Kindiger et Beckett (1990) ont montré que des lignées de maïs particulières, les translocations B-A (Beckett 1978), peuvent être des outils efficaces pour l'introduction de segments d'ADN *Tripsacum* chez le maïs ; certaines lignées de maïs, en plus du stock chromosomique normal (A), contiennent des chromosomes B dits accessoires. La recombinaison d'un chromosome B avec un chromosome du stock A produit une lignée transloquée B-A. Il y a généralement absence de disjonction des chromosomes B à la seconde division de la méiose lors de la production du pollen ; les gamètes produits par une lignée B-A homozygote de structure (A-B A-B B-A B-A) ont donc comme génotype soit (A B-A B-A), soit (A-B). Il est donc possible de produire des lignées de maïs dont la structure est (A A-B), c'est à dire pour lesquelles il manque un segment chromosomique (Beckett 1978). De la même manière, la fécondation par un noyau mâle de type A-B d'un gamète femelle issu d'une lignée d'addition maïs-*Tripsacum*, et combinant 10 chromosomes maïs et un extrachromosome *Tripsacum*, produit des génotypes de structure chromosomique (A A-B Tr). Si la portion chromosomique manquante du génome du maïs est homéologue d'une région d'intérêt présente sur le chromosome *Tripsacum* impliqué, il devient alors possible de favoriser les recombinaisons entre le chromosome A intact et cette région. Différents stocks de lignées de translocation B-A, couvrant une grande partie du génome du maïs ont été produits. La gestion de tels stocks a été présentée par Birchler et Alfenito (1993).

22. *Tripsacum* et amélioration génétique du maïs

Le genre *Tripsacum* a principalement été étudié du point de vue taxonomique et évolutif dans le cadre du débat sur l'origine du maïs (Mangelsdorf 1983, Iltis 1983). Malgré les possibilités d'introgessions de matériel génétique chez le maïs, ce genre très diversifié et présentant des adaptations écologiques variées n'a cependant pas été vraiment exploité en amélioration génétique du maïs. Or, bien que le sélectionneur ait à sa disposition une variabilité extraordinaire au sein même de l'espèce cultivée, d'autres sources de gènes sont à rechercher pour son amélioration génétique. Peu d'études ont été réalisées dans le but d'identifier de possibles sources de caractères d'intérêt agronomique (ex., résistances aux maladies et ravageurs) et d'adaptations (ex., sécheresse) au sein du genre *Tripsacum*. Chez *T. dactyloides*, une souche de *Pseudomonas* conférant une tolérance à différents pathogènes ont pourtant été identifiées (Jayawal *et al.* 1990). Par ailleurs, des résultats préliminaires obtenus à l'IITA

(International Institute for Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria) suggèrent une tolérance de *T. bravum* à différentes races de *Striga hermonthica* (D. Berner, communication personnelle). Les rares exemples de transfert de caractères de *Tripsacum* au maïs (résistance à *Helminthosporium turcicum* et à *Puccinia sorghi*; respectivement Simone et Hooker 1976, Bergquist 1981) doivent être relativisés vu que ces caractères n'ont pas été identifiés chez les parents sauvages utilisés...

PARTIE II

MATERIELS & METHODES

A. MATERIEL VEGETAL

1. Les *Tripsacum*

11. Les collections disponibles

Différentes collections (1326 introductions) sont maintenues sur la station expérimentale du CIMMYT à Tlaltizápan, Etat de Morelos, Mexique (alt. 1000m, zone subtropicale).

La collection principale a été constituée par le programme ORSTOM “Diversité génétique des *Tripsacum* et transfert de gènes au maïs” (J. Berthaud, Y. Savidan, M. Barré, et O. Leblanc). Elle est composée d’environ 1000 introductions originaires du Mexique représentant 158 populations sauvages (16°N-25°N). Toutes les espèces mexicaines sont représentées (*T. dactyloides* var. *dactyloides* et *hispidum*, *T. maizar*, *T. bravum*, *T. pilosum*, *T. laxum*, *T. latifolium*, *T. zopilotense*, *T. intermedium*, *T. lanceolatum*, *T. jalapense*). 16.6% des accessions sont diploïdes, et la grande majorité des accessions polyploïdes sont tétraploïdes (tétraploïdes : 71.5% ; triploïdes : 8% ; pentaploïdes et hexaploïdes : 3.8%).

A cette collection, s’ajoutent : *i*) la collection CIMMYT, constituée par L.F. Randolph, Gutiérrez, J. R. Harlan, et J. M. J. de Wet dans les années 1970, et regroupant 80 introductions principalement collectées au Mexique et aux USA ; *ii*) 113 introductions originaires d’Amérique du Sud (collection de D. Timothy, Université de Caroline du Nord). Elle comporte notamment les espèces non représentées au Mexique (*T. dactyloides* var. *meridionale*, *T. australe* var. *australe* et *hirsutum*, *T. cundinamarce*, *T. peruvianum*, *T. andersonii*).

12. Le matériel analysé

Un sous échantillon représentatif des différentes collections a été choisi pour l’analyse cytoembryologique des modes de reproduction (voir annexe III-1, tableau 1 ; annexe III-2, tableau 1). Les descendances de quatre accessions tétraploïdes (65-1234, 9-569, 16-59, 120-1471) présentant un bon comportement en croisement avec le maïs (nombre d’hybrides F1 produits et possibilités de rétrocroisements) ont été testées pour quantifier l’expression de l’apomixie. Ces descendances ont été obtenues en pollinisation libre au sein des différentes collections maintenues sur la station de Tlaltizápan.

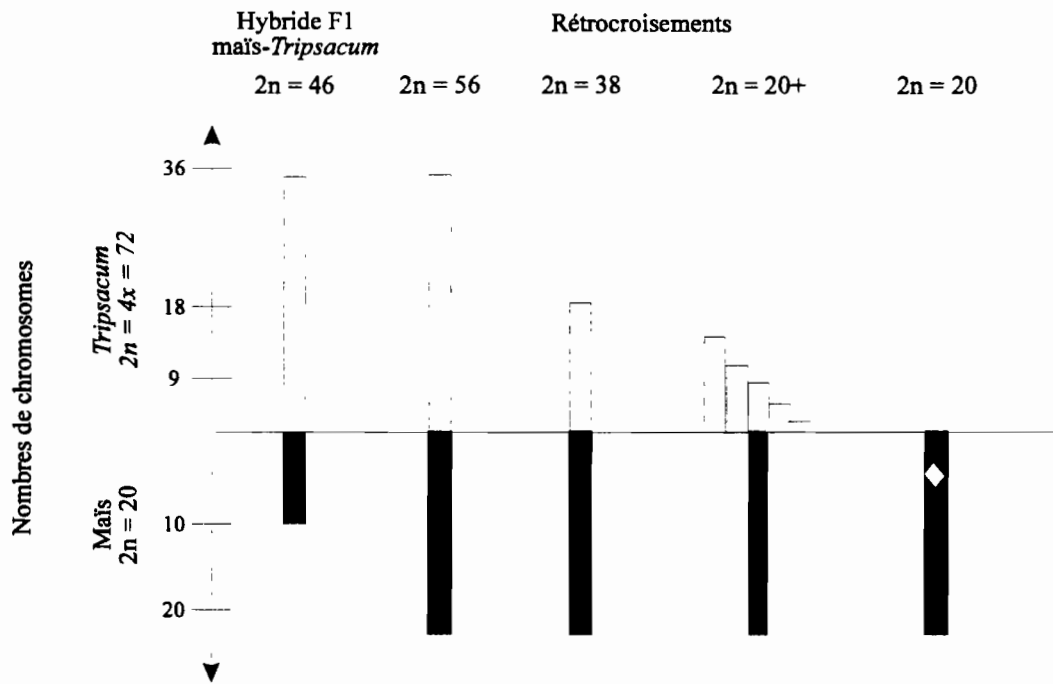


Figure II-1. Schéma simplifié du transfert de matériel génétique au maïs ($x=10$) à partir d'un *Tripsacum* tétraploïde ($x=18$) et évolution des structures chromosomiques. Les générations de rétrocroisement sont obtenues après pollinisation des hybrides maïs-*Tripsacum* par le maïs (d'après Harlan et de Wet 1977).

2. Production des hybrides maïs-*Tripsacum*

21. Schéma de production des hybrides apomictiques maïs-*Tripsacum*

Les travaux de Harlan et de Wet (1977) ont montré que cinq à six étapes sont nécessaires pour réaliser, par rétrocroisements, le transfert de matériel génétique au maïs à partir d'accessions *Tripsacum* tétraploïdes (figure II-1). Les hybrides F1 ($2n=46=10M+36Tr$) sont mâles stériles et ont une fertilité femelle nulle ou réduite, conséquences de perturbations importantes liées à l'hybridation intergénérique. La fécondation de gamètes non réduits chez les hybrides F1, qu'ils soient apomictiques ou sexués, est finalement la seule voie qui autorise l'évolution d'un tel système : elle permet l'apparition d'une structure chromosomique qui combine chacun des deux génomes, maïs et *Tripsacum*, à l'état diploïde ($2n=56=20M+36Tr$). A partir de cette situation, l'élimination des chromosomes *Tripsacum* se réalise progressivement au travers de la sexualité en trois étapes :

i) production d'hybrides à 38 chromosomes ($20M+18Tr$) issus de la fécondation par un noyau mâle maïs de gamètes réduits à 28 chromosomes ($10M+18Tr$) chez les plantes à 56 chromosomes. Bien que les gamètes réduits produits par les BC1 soient le plus souvent équilibrés (10 chromosomes de maïs et 18 de *Tripsacum*), il arrive que des plantes issues de gamètes mal équilibrés soit produites ($2n=\pm 38$).

ii) production d'hybrides maïs-*Tripsacum* combinant 20 chromosomes maïs et un nombre variable de chromosomes *Tripsacum* ($2n=20M+1-10Tr$) ou "lignées d'addition"; au cours de la méiose des

hybrides à 38 chromosomes, les chromosomes *Tripsacum* forment des univalents alors que l'appariement des chromosomes maïs a lieu. Les gamètes produits combinent alors un stock haploïde de chromosomes maïs et un nombre variable de chromosomes *Tripsacum*, résultant de l'élimination d'une partie des 18 chromosomes initiaux.

iii) production de plantes à 20 chromosomes à partir de "lignées d'addition" présentant un petit nombre de chromosomes *Tripsacum* (1 à 5).

Ce schéma est compliqué par l'introduction de l'apomixie (figure II-2). En effet, seule la voie femelle peut être utilisée en raison de la stérilité mâle qui affecte les premières générations d'hybrides. La majorité des descendances produites sont donc de type maternel, et seuls les descendants issus de sexualité résiduelle (ou hors types $n+n$) contribuent au passage d'une étape à la suivante. Celui-ci est caractérisé par un changement du nombre de chromosomes. La détermination systématique du nombre de chromosomes de chacun des hybrides est donc un moyen efficace de détecter les individus hors types qui permettent l'avancement du schéma de transfert.

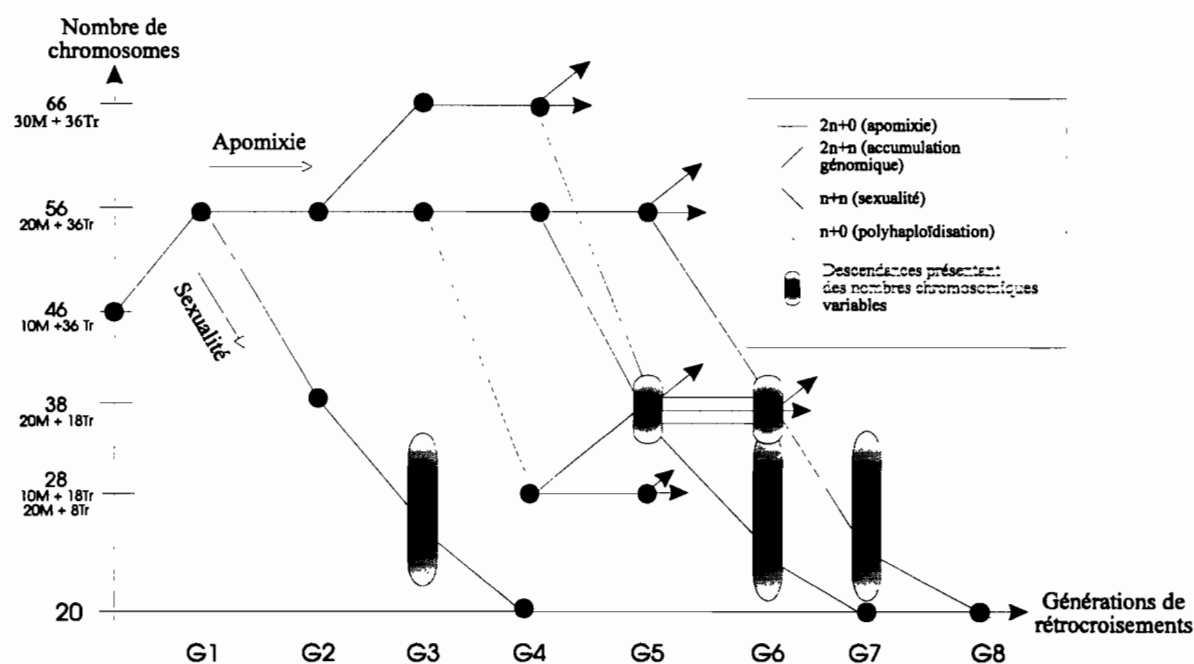


Figure II-2. Introduction de l'apomixie dans le schéma de transfert de matériel génétique de *Tripsacum* tétraploïde ($2n=4x=72$) au maïs ($2n=20$) (d'après Harlan et de Wet 1977).

22. Nomenclature des hybrides

Il y a un décalage entre générations de rétrocroisement et étapes. Plusieurs générations peuvent être produites par apomixie avant que le franchissement d'une étape se produise (production d'un hors

type). La nomenclature suivante a donc été adoptée dans le but de simplifier la gestion et la manipulation des hybrides mis en collection :

F1 : plante à 46 chromosomes issue de l'hybridation entre un maïs et un *Tripsacum* tétraploïde, ou issue d'une plante F1 par apomixie ;

BC1 : plante à 56 chromosomes issue de la fécondation d'un gamète non-réduit chez une F1 ou issue d'une plante BC1 par apomixie ;

BC2 : hors type produit à partir d'un hybride BC1. Trois types sont alors possibles, 38 chromosomes ($n+n$), 66 chromosomes ($2n+n$) et 28 chromosomes ($n+0$) ;

BC3, BC4, etc... : hors type ($n+n$, $2n+n$, ou $n+0$) produit à partir d'un hybride BC2, BC3, etc...

De plus, tout hybride possède un numéro d'introduction unique, qui associe le nombre de générations ou rétrocroisements qui ont été réalisés, et un numéro d'ordre au sein de sa génération. La combinaison [étape#génération-numéro d'ordre] donne le numéro d'introduction de tout hybride produit et introduit dans la collection. Un exemple de généalogie est présenté tableau II-1.

Tableau II-1. Exemple théorique de généalogie à partir d'un hybride F1 apomictique. L'origine et les nombres de chromosomes sont indiqués en italique.

F1	Génération de rétrocroisement par le maïs				
	G1	G2	G3	G4	G5
F1-1 (46 chr.)	F1#1-200 (2n+0)	BC1#2-300 (2n+n, 56 chr.)	BC1#3-110 (2n+0)	BC2#4-80 (n+n, 38 chr.)	BC3#5-100 (n+n, 23 chr.)
F1-1 (46 chr.)	BC1#1-49 (2n+n, 56 chr.)	BC1#2-350 (2n+0)	BC2#3-75 (n+0, 28 chr.)	BC3#4-65 (2n+n, 38 chr.)	BC4#5-80 (n+n, 25 chr.)
F1-1 (46 chr.)	BC1#1-50 (2n+n, 56 chr.)	BC1#2-400 (2n+0)	BC2#3-25 (2n+n, 66 chr.)	BC2#4-40 (2n+0, 66 chr.)	BC3#5-150 (2n+n, 76 chr.)

23. Sources d'apomixie et maïs

Le programme de transfert, discuté dans ce document, est conduit à partir de matériels hybrides BC1 produits par D. Jewell et collaborateurs (Maize Wide Cross Program, CIMMYT). Ces hybrides maïs-*Tripsacum* sont issus d'un croisement initial entre un génotype maïs (population #34, CIMMYT) utilisé comme parent femelle et *T. dactyloides* 65-1234, une accession tétraploïde apomictique originaire de Floride. A partir de l'un des hybrides F1 obtenus (F1-16), et après différentes générations de rétrocroisement avec des génotypes maïs de la population CIMMYT #21 (dérivée de la population #34), différentes plantes à 56 chromosomes ont été produites. L'analyse des nombres chromosomiques obtenus au cours de ces différentes générations montre que cet hybride, et donc ses

descendants à 56 chromosomes se reproduisent apomictiquement (tests de descendance basés sur les nombres chromosomiques). Les descendants de ces BC1 apomictiques ont constitué une collection de base pour initier le programme de transfert de l'apomixie. Ces hybrides BC1 et leur descendants par apomixie combinent donc tous les mêmes 36 chromosomes provenant de *T. dactyloides* 65-1234 et différents génomes maïs.

Le maïs choisi pour poursuivre le programme de rétrocroisements est un hybride (H1) entre deux lignées CIMMYT (CML135 et CML139) bien caractérisées au niveau agronomique et moléculaire. Le rétrocroisement par l'hybride H1 des BC1, ainsi que celui des générations plus avancées, est réalisé en déposant directement le pollen maïs sur les stigmates. Les grains obtenus sont désinfectés, et mis à germer en tube (milieu N6, Chu *et al.* 1975) en chambre de culture (27°C, 18h jour). Une fois qu'elles ont atteint une taille de 8 à 10 cm (2 à 3 semaines), les jeunes plantules sont transplantées en "Jiffy pots", et installées en serre. Après environ 3 semaines, elles sont transférées sur la station expérimentale de Tlaltizápan et mises en sacs plastiques.

De plus, une collection d'hybrides F1 maïs-*Tripsacum* est aussi disponible au CIMMYT ; ces hybrides sont issus pour la grande majorité du croisement entre génotypes tétraploïdes issus de 59 populations sauvages et l'hybride maïs H1.

B. ANALYSE DES MODES DE REPRODUCTION

Deux stratégies sont possibles pour identifier les modes de reproduction au sein des complexes agamiques : l'analyse au niveau de la plante (ex., analyse cytoembryologique de la mégasporogénèse et/ou de la mégagamétogénèse, marqueurs moléculaires) ou les tests de descendance (comparaison des descendants avec la plante-mère). Ces approches, ainsi que les différentes procédures envisageables, sont présentées et discutées annexe II (page 29) : *Screening procedures to identify and quantify apomixis*.

1. Au sein du complexe agamique des *Tripsacum*

L'analyse cytoembryologique des modes de reproduction a été réalisée en microscopie optique (contraste d'interférence et épifluorescence) après d'éclaircissement des ovaires (Crane et Carman 1987, Peel 1993). Les tests de descendance, quant à eux, sont basés sur la détermination du nombre de chromosomes de chacun des descendants (détection des hors types $2n+n$ et $n+0$), combinée avec une analyse isozymique (identification des hors types sexués) (Stuber *et al.* 1988). Différents

systèmes enzymatiques ont été préalablement testés sur environ 200 accessions de la collection ORSTOM-CIMMYT pour évaluer le niveau de polymorphisme révélé. Les systèmes MDH, ADH, PGI et PGM ont ensuite été retenus pour réaliser les tests de descendance (Berthaud 1995).

2. Chez les hybrides maïs-*Tripsacum*

Nous avons vu précédemment que chacune des étapes du transfert de matériel génétique de *Tripsacum* tétraploïdes au maïs est caractérisée par une structure chromosomique particulière. Dès lors, il devient aisé de déterminer, sur la base du nombre de chromosomes des descendants, le mode de reproduction de la plante mère. Un BC1 sexué ne produira que des descendants à 38 chromosomes. Dans le cas de descendance issues de plantes mères apomictiques, les différentes classes théoriques (voir tableau I-1) sont facilement identifiables : par exemple, un BC1 apomictique peut produire des plantes à 56 ($2n+0$), 66 ($2n+n$), 38 ($n+n$), ou 28 ($n+0$) chromosomes.

Tableau II-2. Origine des différents hybrides F1 maïs-*Tripsacum* analysés pour les modes de reproduction. * DH, *T. dactyloides* var. *hispidum* ; DM : *T. dactyloides* var. *mexicanum* ; ZP : *T. zopilotense*. ** H1 : CML139 x CML135 ; H3 : CML62 x CML135 ; H4 : CML135 x CML134 ; Pop. 34 : population développée au CIMMYT. *** Hybride F1-16.

<i>Tripsacum</i>		Maïs**	Nb. hyb.
accession	Espèce*		obs.
9-32	DH	H1	4
16-59	DH	H1	1
49-439	ZP	H1	1
49-439	ZP	H4	1
52-501	DM	H1	1
65-1234	DM	H1	50
65-1234	DM	H3	1
65-1234	DM	Pop. #34	1***
116-1430	DH	H4	1
Total			61

Cependant, ces tests de descendance sont inappropriés pour déterminer le mode de reproduction des hybrides F1 ; mis à part la forte stérilité qui affecte ces plantes, de Wet *et al.* (1973) ont montré que les hybrides F1 sexués miment les apomictiques. Il semble, en effet, qu'au cours de la méiose, le stock chromosomique maïs soit éliminé et remplacé par celui provenant du pollen lors de la fécondation. Seule l'analyse cytoembryologique (observation des ovules après éclaircissement) permet alors de déterminer de façon certaine la nature du mode de reproduction au niveau des F1s.

Elle a été réalisée pour 61 hybrides obtenus à partir de différentes accessions *Tripsacum* (tableau II-2).

C. PRODUCTION DE TETRAPLOIDES SEXUES : CONTRAINTES ET CHOIX DE STRATEGIES

1. Les contraintes

Le contrôle génétique d'un caractère donné ne peut s'apprécier qu'au travers de l'analyse de populations en ségrégation (hybrides F1, F2, rétrocroisements). La mise en place de tels matériels pour l'étude génétique de l'apomixie est compliquée par la forte relation apomixie/polyploïdie : l'apomictique doit être utilisé comme parent mâle, et seuls les diploïdes peuvent être utilisés comme parents femelles. Cependant, il est indispensable que les méioses à l'origine du pollen soit les plus régulières possibles. De plus, le niveau de ploïdie des hybrides F1 doit aussi être exploitable afin de pouvoir réaliser l'analyse de F2 (pour les sexués) ou de rétrocroisements (pour les sexués et les apomictiques). L'utilisation des niveaux tri- et pentaploïde est donc impossible (qualité des méioses du parent mâle), tout comme celle du niveau tétraploïde (les hybrides F1 triploïdes). Finalement, les seuls polyploïdes exploitables seraient les rares hexaploïdes, mais ils présentent une floraison généralement décalée de celle des diploïdes.

S'affranchir de la relation mode de reproduction/ploïdie pour permettre l'expression de l'apomixie et de la sexualité au même niveau de ploïdie représente donc le seul moyen de surmonter des problèmes précédemment exposés. Deux options sont alors possibles: produire des tétraploïdes sexués ou des diploïdes apomictiques. Cette dernière n'a pas été retenue pour deux raisons principales : *i*) les dihaploïdes obtenus à partir d'apomictiques appartenant à différents complexes agamiques sont sexués et fertiles, ou apomictiques et stériles (*Panicum maximum*, Savidan 1982 ; *Bothriochloa-Dicanthium*, de Wet 1968) ; *ii*) aucun polyhaploïde n'a été détecté chez *Tripsacum* (voir partie III-A-2).

2. Les stratégies retenues

Bien qu'un génotype tardif diploïde (*T. maizar*, 7002-3) et un hexaploïde (*T. dactyloides* var. *mexicanum*, 52-604) aient pu être hybridés, deux approches ont été testées en vue de l'obtention de génotypes tétraploïdes sexués :

i) l'exploitation des croisements distants qui tendent à favoriser la fécondation de gamètes non-réduits (Stebbins 1950, Harlan et de Wet 1975), et qui a été utilisée avec succès par Harlan *et al.* (1964) pour produire des individus tétraploïdes sexués chez *Bothriochloa-Dicanthium*. Dans ce cas,

l'obtention d'individus tétraploïdes sexués résulte de la fécondation d'un gamète non réduit chez un diploïde par un noyau mâle réduit (parent mâle tétraploïde), et ayant éliminé le ou les locus responsables de l'expression de l'apomixie ; Le tableau II-3 indique les croisements diploïdes x tétraploïdes réalisés.

ii) l'induction de doublements chromosomiques chez des cals diploïdes au moyen d'un agent chimique anti-mitotique, la colchicine.

Tableau II-3. Croisements distants réalisés entre accessions diploïdes et tétraploïdes en vue de l'obtention de génotypes tétraploïdes. * BV : *T. bravum* ; DH : *T. dactyloides* var. *hispidum* ; DM : *T. dactyloides* var. *mexicanum* ; LC : *T. lanceolatum* ; LX : *T. laxum* ; MZ : *T. maizar* ; PL : *T. pilosum* ; ZP : *T. zopilotense* ; MZPL : forme intermédiaire entre *T. maizar* et *T. pilosum* ; DHIT : forme intermédiaire entre *T. dactyloides* var. *hispidum* et *T. intermedium*.

Accessions diploïdes (2n=36)		Accessions tétraploïdes (2n=72)	
n°	Espèces*	n°	Espèces*
8-567	MZ	7002-1	ZP
39-1845	MZPL	7002-1	ZP
39-1859	PL	39-1611	DM
39-308	MZPL	103-1175	DHIT
-		55-609	BV
-		7002-1	ZP
39-310	MZPL	39-1611	DM
-		39-299	DM
-		7002-1	ZP
-		7150-8	DM
39-317	MZPL	103-1175	DHIT
-		7150-8	DM
39-820	MZPL	7150-8	DM
47-409	PL	55-608	BV
47-410	PL	28-164	MZPL
-		60-654	LC
47-418	PL	7002-1	ZP
49-431	ZP	7150-8	DM
50-1403	ZP	101-1134	DHIT
50-446	ZP	28-171	DM
51-459	ZP	7150-8	DM
51-468	ZP	55-609	BV
7207-3	MZ	103-1175	DHIT
-		55-610	BV
-		7002-1	ZP
-		7122-5	DH
76-916	LX	4-512	DT
-		7122-5	DH
542-5062	MR	60-651	LC
588-5165	MR	39-298	DM

D. ANALYSES CYTOLOGIQUES

1 Détermination du nombre de chromosomes

La réussite des différentes stratégies envisagées pour la réalisation des tests de descendance, la production de plantes tétraploïdes sexuées ou la réalisation du transfert de l'apomixie est étroitement liée à *i*) la détermination des nombres chromosomiques, et *ii*) l'analyse de grands nombres (ex., identification des individus issus de sexualité résiduelle à chaque étape du transfert, détection de doublements chromosomiques). La cytométrie de flux (Galbaith *et al.* 1983) est aujourd'hui couramment utilisée pour l'estimation de la quantité d'ADN de tissus végétaux d'origines diverses (tissus foliaires, cal). L'une des applications les plus répandues de cette technique est la détermination des niveaux de ploïdie et du nombre de chromosomes chez les végétaux (De Laat *et al.* 1987).

Cette technique, qui répond parfaitement aux exigences citées précédemment, a été utilisée pour déterminer les nombres de chromosomes chez *Tripsacum* (tissu foliaire, cal. Voir annexe III-3, *Chromosome doubling in Tripsacum : The production of artificial sexual tetraploid plants*). De même, les nombres de chromosomes des hybrides maïs-*Tripsacum* ont été systématiquement déterminés après analyse en cytométrie de flux d'un fragment de tissu foliaire prélevé au moment du repiquage en Jiffy.

2. Détermination des structures chromosomiques chez les hybrides maïs-*Tripsacum*

Les structures chromosomiques chez différents hybrides maïs-*Tripsacum* ont été déterminées par hybridation *in situ* génomique ("genome blocking") qui permet de visualiser l'ensemble des chromosomes et d'en détecter l'origine (Le *et al.* 1989, Schwarzacher *et al.* 1992). Il est indispensable de pouvoir contrôler la structure chromosomique des hybrides au cours des différentes étapes du transfert de l'apomixie au maïs, et notamment la présence de l'ensemble du stock chromosomique de l'espèce cultivée ; en effet, la perte d'un ou plusieurs chromosomes de l'espèce cultivée affecterait vraisemblablement la vigueur ou la fertilité des hybrides (voir le cas du transfert au mil, partie I-C-2). Un tel contrôle peut aussi être réalisé à l'aide de marqueurs moléculaires RFLP cartographiés chez le maïs, mais avec un certain nombre de contraintes : *i*) ces marqueurs doivent produire des fragments spécifiques du génome maïs, et *ii*) un jeu de 20 marqueurs au minimum est nécessaire (un par bras de chromosome). Les techniques de cytogénétique utilisées ont été mises au point au CIMMYT par N. Islam-Faridi (Maize Wide Cross Program) à partir de protocoles développés par Heslop-Harrison et collaborateurs (Schwarzacher *et al.* 1989, Heslop-Harrison *et al.* 1990, Jewell et Islam-Faridi 1994).

Annexe II

Screening Procedures to Identify and Quantify Apomixis

Olivier Leblanc¹ and Andrea Mazzucato²

A paraître dans *Apomixis Handbook*, Savidan Y. et Carman J. G. (eds), FAO Rome.

¹ ORSTOM-CIMMYT *Tripsacum* Project, Apartado Postal 6-641, 06600 México D. F., Mexico, and ² Istituto di Miglioramento Genetico Vegetale, Università di Perugia, Borgo XX Giugno 74.

Chapter index

1 General features of apomicts as potential screening indicators.

2 Levels of screening and related tools.

3 Choosing suitable procedures.

Mendel was certainly puzzled when he studied the progenies from crosses involving *Hieracium* species to confirm his *Pisum* experiments: F1 families were highly variable and some F1 hybrids produced homogeneous progenies (Mendel, 1869). So what about the world-famous laws of inheritance worked out on *Pisum*? In fact, the laws still held. What the great geneticist *did not know* was that he had been making the first progeny tests with apomictic species.

The term "apomixis" initially covered all the mechanisms of asexual reproduction (Winkler, 1908), but is now applied strictly to asexual reproduction through seeds (Nogler, 1984). There are two main types of apomixis, according to the origin of the embryo: adventitious embryony, when the embryo forms directly from the sporophyte (the gametophyte phase is bypassed), and gametophytic apomixis, when the embryo develops parthenogenetically from an unreduced female gametophyte (Gustafsson, 1947; Stebbins, 1950). Apomictic developments bypass meiosis and fertilization, the bases of sexual reproduction and genetic recombination. Therefore offspring are genetically identical to the mother plant.

Apomixis has been widely identified in the plant kingdom (Czapik, Chapter 8), and occurs in families of economic importance (Rutaceae, Poaceae, Rosaceae). Moreover, it appears to be a very common mode of reproduction in the Panicoideae subfamily of Poaceae (Brown and Emery, 1958), which includes several major grain crops. Although apomixis is still poorly understood, it may be of great use in agriculture (Savidan and Dujardin, 1992; Toenniessen, Chapter 1). Identifying sources of apomixis, understanding its inheritance, and breeding and manipulating apomictic species will require reliable and efficient screening procedures to screen for reproductive mode.

This chapter concentrates on identifying and quantifying gametophytic apomixis. After presenting basic features of apomixis, screening procedures for reproductive mode are described and the various problems that scientists dealing with apomixis face are discussed.

1 General features of apomicts that can be used as potential screening indicators

1.1 Genetic characteristics of apomicts

Polyploidy. Polyploidy is a characteristic of agamic complexes in which diploid forms are sexual while polyploids are generally apomictic. However, gametophytic apomixis can occur at the diploid level, as in *Potentilla argentea* (Müntzig and Müntzig, 1945; Müntzig, 1958), *Arabis holboellii* (Böcher, 1951) and *Hierochloë australis* (Weimark, 1967). In grasses apomixis is extremely rare at the diploid level; some diploid species in the *Paspalum* genus express apomixis at very low levels (Norrman et al., 1987), while apospory of the *Hieracium*-type has recently been described in the genus *Tribolium* (Visser and Spies, 1994).

Heterozygosity. Apomixis is generally considered a reproductive pathway that permits the fixation of high levels of heterozygosity and diversity (Gustafsson, 1947; Nogler, 1984; Kojima et al., 1991a; Berthaud, Chapter 2).

Self-compatibility. Few have documented the association between self compatibility and mode of reproduction in agamic complexes (Quarin, 1992; Berthaud, Chapter 2).

12 Mechanisms of apomixis

Seed production through gametophytic apomixis bypasses meiosis (unreduced female gamete production) and egg cell fertilization (parthenogenesis). The regulatory and quantitative aspects of the parthenogenetic development of unreduced embryos have been poorly documented (Asker, 1980; Nogler, 1984; Mogie, 1988). Pseudogamy is the most common method of embryo and seed development, but autonomous apomixis occurs in some cases (Nogler, 1984). By contrast, unreduced embryo sac formation is well documented and may follow different pathways. Some reviews (Nogler, 1984; Asker and Jerling, 1992; Crane, Chapter 3) describe in detail most types of apomixis that occur in the wild. The two types of gametophytic apomixis, apospory and diplospory, and their characteristics will be briefly described in this chapter to highlight differences from sexuality that are of interest for developing screening tools.

121 Types of apomixis and comparison with sexual reproduction (Fig. 9-1)

Sexual reproduction starts with the differentiation of one hypodermal archesporial nucellar cell into a megaspore mother cell (MMC). This MMC enlarges and produces a dyad of megaspores through the first meiotic division and a tetrad of megaspores through the second division. In *Polygonum*-type development, the three micropylar megaspores degenerate while the chalazal develops into an embryo sac (ES) through three mitoses. Other patterns combine different megaspore degeneration pathways with different numbers of post-meiotic divisions, producing a wide variety of ES arrangements. At least two biochemical pathways have been reported as critical to or associated with meiosis: callose synthesis throughout megasporogenesis in angiosperms that produce mono- and bisporic ESs (Rodkiewicz, 1970), and altered expression of plasma membrane arabinogalactan protein (Pennell and Roberts, 1990).

Mature, meiotic ES structure varies among taxa, but it generally shows antipodal cells, two polar nuclei within the central cell, synergid(s) and one egg cell. All nuclei from the meiotic ES are haploid (n chromosomes). Double fertilization, in which the two sperm cells from the pollen tube participate, is required for embryo and endosperm developments to begin. Each of the sperm cells is involved in different fusion events: fusion with the egg restores the sporophytic chromosome number, and fusion with the central cell produces a nutritive triploid tissue, the endosperm.

In diplospory, meiosis is totally omitted (e.g., *Antennaria* type) or perturbed (e.g., *Taraxacum* and *Ixeris* types). In both cases, ESs form through three or more mitoses, from MMCs behaving as unreduced megaspores (*Antennaria* type) or from unreduced megaspores (*Taraxacum* and *Ixeris* types). Besides the absence of the characteristic meiotic sequence (MMC, dyad, tetrad), callose deposition does not occur (Naumova et al., 1993; Leblanc et al., 1995) or is strongly disturbed (Carman et al., 1991) during diplosporous megasporogenesis. In apospory, ESs differentiate from nucellar (somatic) cells. Inside the ovule, several aposporous ESs are generally initiated. In contrast to diplospory, which seems to result from genetic lesions directly affecting meiosis, meiotic and aposporous developments seem independent (Harlan et al., 1964; Nogler, 1984). Both developments can theoretically occur at the same time within the same ovule, but usually the legitimate sexual line is eliminated in subsequent developmental stages. Degeneration may occur before or during meiosis as well as during the tetrad or young ES stages. When the meiotic functional megaspore develops, it enters in competition with aposporous initials that are usually further along in development, possibly because they are not delayed by meiosis (see paragraph 122).

Megagametogenesis in apomicts and in their sexual counterparts is usually similar, although some differences in the secondary divisions of antipodals have been reported (Chao, 1974). One exception is the aposporous ES structure in the Panicoideae and Andropogoneae sub-families

(Poaceae), which is a four-nucleate ES (*Panicum* type, after Warmke, 1954), the sexual counterparts producing ESs of the *Polygonum* type.

122 Consequences of unreduced embryo sac formation

Failure of egg cell fertilization. Production of maternal progeny is possible when unreduced female gametes develop parthenogenetically. However, the formation of viable seeds usually requires endosperm differentiation. This is achieved in apomicts through 1] pseudogamy (single fertilization of polar nuclei) or 2] autonomous endosperm development (polar nuclei also develop autonomously). Almost all known apomictic grasses and most apomicts are pseudogamous. The parthenogenetic development of egg cells in apomicts may result directly from the failure (diplospory) or absence (apospory) of meiosis, causing differences in timing between sexual and apomictic developments (Savidan, 1982b, 1989). Megagametogenesis in both reproductive modes seems to last the same amount of time, but times for megasporogenesis differ. Such timing differences have been documented for aposporous species (*Ranunculus auricomus*, Nogler, 1984; *Panicum maximum*, Savidan, 1982b) and two diplosporous species, *Tripsacum zopilotense* and *T. dactyloides* (Leblanc and Savidan, 1994). The complete maturation of the apomeiotic ES before the meiotic ES may contribute to the failure of unreduced egg cell fertilization: by the time the pollen tube reaches the ovule, unreduced egg cells may not be receptive. This loss of receptivity is not yet well understood, but several hypotheses may be proposed, including chemical or mechanical barriers (e.g., a complete cell wall around the egg) and time window of receptivity, among other factors.

Nature of the progeny. In sexual reproduction, the two gametes that fuse are produced through meiosis. Sexual development allows genetic recombination and segregation, enhancing genetic diversity. Aside from very specific cases, (e.g., strict autogamy, or permanent translocation heterozygosity, as in Ellstrand and Levin, 1982), offspring from sexual plants are new genotypes. Apomictic developments are characterized by the parthenogenetic development of unreduced egg cells into embryos, resulting in offspring that are exact genotypic replicas of the mother plant. However, genetic recombination may occur during apomictic reproduction in plants that show partially synaptic and restitutional meiosis or somatic DNA rearrangements (Richards, 1986). Complete (100%) maternal progenies are recovered when the mother plant reproduces through obligate apomixis. But most apomixis is facultative and progenies comprise various types, each resulting from a different combination of failure or success in meiosis and fertilization (Table 9-1). Reproductive mode in individual plants and degree of apomixis in facultative genotypes is under fairly strict genetic control in most taxa studied (Asker, 1980; Sherwood, Chapter 5).

2 Levels of screening and related tools

There are many indicators of apomixis, including high frequency of multiple seedlings, high seed fertility in plants expected to be sterile (wide crosses, polyploids, and aneuploids, for example), homogeneous progenies, etc... (Bashaw, 1980; Hanna and Bashaw, 1987; den Nijs and van Dijk, 1993). They are sometimes difficult to use in the case of wild materials and, in all cases, further investigation is required to assess apomixis type and level of expression. The relative advantages or disadvantages of the screening procedures presented here are discussed further in Part 3.

21 Analyses at the plant level

211 Cytoembryology

Cytoembryological observations to identify reproductive mode can be based on histological details within ovules or callose deposition throughout megasporogenesis (Table 9-2). Cytoembryological differences between sexual and apomictic development appear at different times, and pistils can be classed according to pollen developmental stage, if the flowers are hermaphrodite, or by size if they are monoecious. Observations to determine the origin of ESs are therefore based on differences in megasporogenesis (i.e., MMC behavior, screening for meiosis products) in the case of diplospory, on nucellar cell initiation in the case of apospory, and on differences in mature ESs for apospory of the *Panicum* type. In pseudogamous species showing early embryo divisions before

pollination and endosperm formation (proembryony), cytoembryological observations within ESs can also help identify and quantify parthenogenesis (Kojima and Nagato, 1992a; Naumova et al., 1993).

Paraffin sectioning methods combined with staining (e.g., safranin-fast green stain, Johansen, 1940; or aniline blue, Russel, 1978) have been used throughout the century for cytoembryological studies of reproductive development and in apomixis research (Snyder, 1957, Voigt and Bashaw, 1972; Burson et al., 1990). However, preparing paraffin sections is arduous and time consuming, and interpretations may be difficult and doubtful. Though sectioning is still a standard procedure, we recommend squashing or clearing techniques. Clearing methods were described more than 50 years ago (Strasburger and Hillhouse, 1900; Hillary, 1940), but have recently been rediscovered and greatly improved (Crane, Vol. 2-1). They avoid sectioning or squashing and thus allow ovules to be observed *in situ* in three dimensions, making interpretations easier than from a series of sections. Squashing techniques, generally combined with staining, were developed for studies of megagametogenesis or megasporogenesis in various species (Bradley, 1948; Saran and de Wet, 1966; Darlington and La Cour, 1966), but have provided only moderate success. Nevertheless, improved squashing techniques combined with clearing procedures provide good results when analyzing for female meiosis (Jongedijk, 1987; Kojima et al., 1991b, and Vol. 2-2).

Clearing techniques using non-aqueous fluids (Herr, 1971; Young et al., 1979; Crane and Carman, 1987) now represent the best tool for observing internal details during both megasporogenesis and megagametogenesis in aposporous and diplosporous materials. Procedures combining Mayer's hemalum staining with methyl-salicylate clearing have been successfully used for observations within whole ovules of *Solanum* (Stelly et al., 1994) and *Medicago* (Tavoletti et al., 1991). These techniques are of great interest for embryological analyses in apomicts because they do not require the use of special optics. Clearing procedures combining aqueous solution (sucrose, KI) and aniline blue have recently been developed for observation of callose deposition during megasporogenesis (Peel, 1993; Crane, Vol. 2-1).

212 Ovule aptitudes

Ovule tissue culture. In tetraploid accessions of *Allium tuberosum*, Kojima and Kawagushi (1989) reported a high frequency of tetraploid regenerated plants from unpollinated cultured ovules, suggesting apomixis expression. This indicator could be applied in screening because, in similar culture media, sexual plants would generate few haploids, whereas apomicts would grow mostly into plantlets.

Egg cell parthenogenetic capacity. Egg cells produced through apospory or diplospory should be better able to differentiate parthenogenetically than those produced through sexual development, because of the apparent linkage between the two steps of apomictic development. Matzk (1991) recently proposed a new procedure to identify and quantify parthenogenesis for a wide range of cool-season grasses. The technique, known as the auxin test, involves applying a synthetic auxin compound a few days before anthesis to induce parthenocarpic development in unpollinated ovaries. Auxin induced grains will lack endosperms, because the fusion of the sperm and polar nuclei is no longer possible, but egg cells with parthenogenetic capacities will develop into embryos (Matzk, vol.2-10). Studies in *Poa pratensis* using the auxin test to estimate the degree of parthenogenesis in various genotypes showed good reliability and low variation across years and environments (Mazzucato et al., 1994a).

213 Molecular markers co-segregating with apomixis

The identification of biochemical (isozymes) or molecular (RFLPs and RAPDs) markers strongly linked with apomixis is the only procedure to date for detecting apomixis prior to flowering.

Molecular markers have already been reported for the aposporous genera *Pennisetum* (Ozias-Akins et al., 1993) and *Brachiaria* (Miles et al., 1994). Segregating progenies or bulk segregant analyses (BSA) were used for their identification. In both cases, the bulks comprised cytologically determined plants, meaning that the markers were linked with apospory and not necessarily with the entire apomictic process in the materials used.

22 Progeny analysis

In progeny testing, one compares the mother plant with its offspring and/or evaluates heterogeneity within progeny. Offspring from apomixis are expected to be genetically identical to the mother plant; therefore phenotypic identity with the maternal type suggests apomictic reproduction, whereas variations indicate sexuality, reduction or fertilization. Progeny tests based on gross morphology have traditionally been used in apomixis research because they are easy to perform (Duich and Musser, 1959; Burton et al. 1973; Gadella, 1983), but many other characters may be useful for progeny tests and should therefore be considered. Different kinds of descriptors can reveal the nature of offspring and progeny tests can be performed on a variety of plant organs at different developmental stages, including freshly pollinated ovaries, seeds, seedlings, or fully grown plants.

221 Analysis of freshly pollinated ovaries or seeds

From freshly pollinated ovaries or seeds (albuminated), data on both egg and central cells can be collected. Although chromosome number is the only measurable character, determining ploidy level gives information on both reduction (meiosis) and fertilization events. Endosperm chromosome number in apomicts often differs from that in sexuals (Fig. 9-1), where embryos and endosperms are expected to be $2n$ and $3n$, respectively. *Panicum*-type aposporous development is the main apomictic pathway that results in similar ratios between endosperm and embryo, as well as between female and male contributions to endosperm structure. For many other apomictic pathways, these ratios differ. The endosperm/embryo ratio for autonomous apomixis, for example, is $2/1$ ($4n/2n$); for pseudogamous apomixis, $5/2$ ($4n+n/2n$); for genomic accumulation, $5/3$ ($4n+n/2n+n$); and for (poly)haploidization, $3/1$ ($2n+n/n+0$). Endopolyploidization sometimes occurs during endosperm development, but endosperm ploidy level(s) in such materials may suggest apomictic reproduction or allow the quantification of facultative apomixis. Nevertheless, it cannot reveal the precise nature of the apomictic mechanisms involved.

Ploidy level in freshly fertilized ovaries or seeds cannot easily be determined using classical chromosome counting methods, but flow cytometry now permits rapid measurement of DNA content in a variety of plant tissues (Galbraith et al., 1983). Flow cytometry does not permit the use of just one ovary or seed, but by bulking several samples from the same plant, nuclear DNA contents of embryos and endosperms can be estimated. In graphs of DNA content measured using flow cytometry, $2n$ and $4n$ peaks are not very informative (young dividing embryos as well as somatic ovule tissues may give $2n$ and $4n$ peaks), but other readings can help to determine reproductive mode and degree of apomixis: peaks corresponding to the gametophytic chromosome number indicate (poly)haploidization, $3n$ peaks indicate sexual endosperm or fertilization of unreduced embryo(s), and $5n$ peaks indicate apomictic endosperm. Flow cytometric analyses of freshly pollinated ovaries (Naumova et al., 1993) and seeds (Mazzucato et al., 1994) have already been used successfully to estimate degree of apomixis in some *Poa pratensis* accessions (apospory of *Hieracium* type). Although only rough estimations are possible, this technique is the fastest way to determine reproductive mode in progeny.

222 Adult plant-progeny analysis

Progeny tests currently available must be adapted for use in detecting mostly hybrid off-types ($n+0$ types are generally poorly represented, in general). Hybrids can be identified using 1] morphological descriptors, 2] cytological data and/or 3] marker analyses, if the origin of the progeny is appropriate.

Morphological descriptors. This the easiest way to carry out progeny tests. If the male progenitor (pollen source) differs significantly from the progeny tested plant, hybrids will vary sufficiently from the maternal type to allow detection. In the case of selfing, because apomicts are generally highly heterozygous, sexual offspring will vary sufficiently from the mother plant to be scored as off-types. (Poly)haploids are easily detected because of their particular phenotypes and the low vigor they exhibit (Asker and Jerling, 1992). What is often not possible using morphological descriptors is to distinguish between sexuality ($n+n$) and fertilization of the unreduced gamete. But

when morphological and cytological (chromosome number) data are combined, the identification of all classes is theoretically possible. The minimum recommended sample size for identifying and quantifying apomixis is 15 to 30 offspring. Analysis of seedlings has the major advantages of timeliness and saving space, but the most informative descriptors for screening purposes are usually expressed at maturity. There are few reports of successful progeny testing for morphology on seedlings (Williamson, 1981).

Chromosome number determination within progenies. The sexual or asexual origin of offspring is not detectable from crosses made at the same level of ploidy, but $2n+n$ and $n+0$ off-types are easily detected even at the seedling stage. Interploidy-level crosses could be used to detect all classes of offspring, but information can be biased by disturbances due to unstable ploidy levels or ploidy barriers. Chromosome counts can be made from root tips, microspores, or any somatic tissue using flow cytometry (Müntzig, 1940; Hignight et al., 1991; Galbraith et al., 1983).

Markers. Traits that are under simple genetic control have been described as ideal genetic markers for progeny testing by crossing recessive maternal genotypes with homozygous dominant progenitors (Hanna et al., 1970; Bashaw and Hanna, 1990). Models for estimating apomixis level by following marker segregation have been presented by Marshall and Brown (1974). When markers are used this way, though, one should still consider that recombination can occur without fertilization and that the presence of such characters in progeny tells nothing about the origin of the off-types ($n+n$ or $2n+n$), in the absence of cytological data. Moreover, identification of such "ideal" markers in apomictic species or agamic complexes is not necessarily easy, because characters in polyploid apomicts are difficult to analyze genetically.

Isozymes or molecular markers can be used to assess variation in progenies (fingerprinting analyses). Finding good, polymorphic isozyme systems, RFLP probes, or primers for PCR as candidates for fingerprint experiments is not a major obstacle. Although genetic analysis is still hindered by polyploidy, any variation in isozyme or DNA patterns indicates off-type production, provided that somatic recombination does not occur frequently in the material studied. Esterase and peroxidase were the first systems used by Smith (1972) to isolate sexual plants from *Panicum maximum*. Apomixis expression was also confirmed or quantified using isozymes in *Taraxacum* (Ford and Richard, 1985), *Arabis holboellii* (Roy and Rieseberg, 1989), *Allium tuberosum* (Kojima et al. 1991a), *Poa pratensis* (Wu et al., 1984; Barcaccia et al., 1994), and *Tripsacum* ssp.. Molecular markers have seldom been used for screening to date. Huff and Bara (1993) successfully used silver-stained RAPD markers, combined with flow cytometry, to progeny-test apomicts and to detect the genetic origin of aberrants in *Poa pratensis*. On the other hand, Mazzucato et al.'s work (1994b) showed the slightly higher capacity of RAPD markers in discriminating off-types in progenies from the same species, when compared with three polymorphic isozyme systems or with analysis of traditional morphological traits.

The use of progenies from controlled crosses is recommended. Male progenitors bearing discriminating traits (dominant traits, differing chromosome number, etc.) should be chosen when available, limiting the possible confusion between selfed and hybrid progenies. However, open-pollinated progenies can be used when mother plants are sufficiently heterozygous to detect segregation after selfing and when there is significant diversity in the surrounding field collection (as is the case for most of the apomictic species, being polyploid, polymorphic, and highly heterozygous).

3 Choosing suitable procedures

31 Analyses on the plant itself versus progeny tests

Nature of the information obtained. Apomictic developments result from apomeiotic processes (apospory or diplospory) that produce unreduced ESs and egg cell parthenogenetic development. Although no-reduction and parthenogenesis are thought to be closely linked in apomicts, observation and/or analyses of the plant itself obviously provides insights only about apomeiotic or meiotic events, not the complete process of apomixis. Data on the next generation (progeny tests) have to be collected to study fertilization and parthenogenesis events as well as the degree of apomixis. The

choice of the level of analysis (no-reduction/parthenogenesis/apomixis) depends on the objectives of the research; i.e., whether one wishes to determine only cytological processes, study parthenogenesis, or investigate apomixis as a whole.

Comparing results. Limited information is available on diplosporous developments, but analysis of the plant or the progeny generally showed good agreement in *Eragrostis curvula* (Voigt and Burson, 1983), *Allium tuberosum* (Kojima and Nagato, 1992b), and *Tripsacum* spp. (Leblanc et al., 1995). By contrast, the situation in aposporous species appears more complex: cytological analyses generally reveal higher sexual potential than do progeny tests in *Panicum maximum* (Javier, 1970; Savidan, 1982a), *Poa pratensis* (Nygren, 1951), and *Bothriochloa-Dichanthium* (Harlan et al., 1964). The same tendency was also observed by Mazzucato et al. (1994 a.) in *Poa pratensis*, where auxin tests and field data were compared. However, using progeny tests on 100 *Brachiaria* F₁s, Miles and de Valle (1991) classified 10 plants as sexual that were highly facultative apomicts according to cytological tests. Sexual potential in aposporous tropical grasses has generally been scored according to the formation of eight-nucleate ESs that may develop concomitantly with several apomeiotic (four-nucleate) ESs. The competition among ESs -- more favorable to apomeiotics (Savidan, 1982b) -- as well as the possible weakness of certain hybrids that are early eliminated early on, may explain the overestimation of sexuality in facultative apospors as measured using cytology (Clausen et al., 1947, Kojima and Nagato, 1992b). This was confirmed by Savidan (1982b) in one *Panicum maximum* accession: sexual potential was estimated using cytological tools at 22.5%, but in the open-pollinated adult progeny only 3% of the plants were off-types. Elimination of hybrid offspring occurred at germination (-7%) or after transferring plants to the field (-12.5%), because of their inbred nature (resulting from selfing or hybridization with genetically closed genotypes in the collection). On the other hand, after self- or sib-pollination, the lack of heterozygous loci in segregation may cause an over-estimation of apomixis, with progeny tests showing the presence of "apparent apomixis" (Bayer et al., 1990).

32 Screening procedures: Advantages and disadvantages (summarized in Tables 9-3 and -4)

Until recently, screening tools for mode of reproduction were limited to easy-but-late morphological progeny tests and skill-demanding/time-consuming cytological sectioning methods. In the past ten years, new tools in molecular and cytological biology have made screening for mode of reproduction more efficient, rapid, and reliable. These techniques include ovary or seed progeny testing, auxin tests, and molecular markers that co-segregate with reproductive mode. The major disadvantage of the new methods is their expense. In addition, though the methods seem to agree with cytological and/or field observations, further data are needed to confirm their reliability.

Apomixis identification and characterization. As mentioned, apomixis may be detected in various ways (see sections 212; 311), but cytoembryological observations on 15 to 25 pistils at the right stage(s) are ultimately needed to confirm the origin of the ES and to determine the type of apomixis. Clearing techniques are now quick and easy but require the use of phase-contrast or differential interference contrast optics, both entailing considerable expense. Stain-clearing techniques, which allow observations of ovule details under traditional optics, are less expensive. Molecular markers co-segregating with apomixis, which enable analyses at earlier growth stages than does cytoembryology, require the development of special plant materials and protocols, and the cost of associated supplies is often beyond the means of many research groups. Moreover, they may not be used with materials that differ in origin from the materials used to identify the markers, especially in the case of the highly-cross-specific RAPDs (Williams et al., 1993). Morphological progeny tests are time- and space-consuming -- good descriptors are usually expressed in adult plants, and a minimum of 10 to 20 offspring are needed -- but do not require any equipment or technical skill, and can thus be managed everywhere. Their drawbacks include frequent errors due mainly to the fact that facultative apomixis occurs more often than thought. Moreover, off-types may be misclassified morphologically as maternal types (no variation from the mother plant can be detected), leading to the overestimation of apomixis. The existence of this "grey area" in progeny plant classification was reported by Williamson (1976), after extensive progeny testing in *Poa* spp. This makes morphological progeny

tests unreliable when apomixis is highly facultative, but more efficient as apomixis expression increases. Early progeny tests using biochemical or molecular markers can be carried out for apomixis detection on 10-to-20 offspring (destructive extractions may be used if progenies are not needed afterwards). Only a few isozyme systems are required to indicate apomixis and determine the nature of hybrids detected. RFLPs and RAPDs can also be used in the same way, but at greater expense.

Degree of apomixis expression. Many offspring are needed to obtain a good estimate of the degree of apomixis. Both auxin tests and flow cytometric analyses of freshly pollinated ovaries or seeds provide good estimates of sexual potential, but cannot distinguish $2n+0$ from $2n+n$ offspring. In contrast, systematic chromosome counting within progenies is useful for detecting $2n+n$ and $n+0$ off-types, but does not separate $2n+0$ from $n+n$ offspring and, without flow cytometry, becomes tremendously time-consuming. Progeny tests combining cytology and marker analyses represent the best option to identify the different classes of offspring within apomictic progenies. To limit cytology work (when flow cytometry is not available), markers can be applied first to separate maternal offspring from (poly)haploids or hybrids. The origin of the latter may be determined according to the patterns they produce (i.e., $2n+n$ off-types must carry all bands from the mother plant, plus extra bands from the pollen), and then cytologically confirmed.

33 Choosing a procedure

There are three main areas of apomixis research, each with distinct constraints and objectives: 1] genetic studies in wild populations, 2] basic studies for further manipulation of apomixis (germplasm characterization), and 3] breeding of apomicts.

The characterization of individual plants from wild populations or germplasm collections is a prerequisite to understanding the genetic structure of wild populations and efficiently manipulating apomixis. In this way one can learn about the gene or genes involved, their effects, possibilities and pathways for transfer, and ways in which genes of interest can be isolated or used in breeding. Chromosome number, reproductive development, degree of expression, and (when possible) inheritance are the primary factors for which basic data must be collected to develop strategies for further research. For germplasm evaluation, a representative sample of the collection must be established (for species, chromosome number, origin, morphology, and special traits such as disease resistance), tested cytologically for chromosome number and reproductive mode, and finally progeny tested. Following that preliminary work, appropriate tools for larger-scale screening have to be developed or chosen according to the apomixis characteristics of the collection; e.g., callose patterns for diplospory, ES clearing for apospory of *Panicum* type, etc. Sexual parents involved in crosses for apomixis inheritance studies must be carefully chosen using cytoembryology: highly facultative apomicts may be misclassified as sexuals using progeny tests, and therefore cause distortions in segregation for mode of reproduction in resulting families. In the same way, looking for differences between sexual and apomictic developments at the molecular level requires the analysis of genotypes that are well characterized for mode of reproduction. This may allow the development of near isogenic lines, an important step in identifying the gene(s) controlling apomixis.

Before apomixis can be transferred into crops or used in breeding programs, researchers need procedures to identify apomictic genotypes (do Valle and Miles, Chapter 10; Savidan, Chapter 11) and to quantify apomixis in genotypes selected for varietal release. Progeny testing in such programs may help identify apomixis, because offspring are necessarily produced as part of breeding schemes, but an entire plant cycle must pass before data are obtained (a serious drawback, in the case of annual plants). Notwithstanding, in some cases -- especially when low female fertility is affecting the plants (e.g., interspecific or intergeneric hybrids) -- this may be the best way to test for mode of reproduction. Because apomixis and sexuality generally do not express at the same ploidy level, estimating chromosome number within progenies using flow cytometry allows easy identification of apomictic genotypes in early backcross generations, but becomes less effective when chromosome numbers close to that of the recurrent parent are recovered (Savidan, Chapter 11). Other ways to identify apomixis are appropriate cytological procedures or marker-assisted selection.

References

- Asker, S., 1979. Progress in apomixis research. *Hereditas* 91: 231-240.
- Asker, S., 1980. Gametophytic apomixis; elements and genetic regulation. *Hereditas* 93: 277-293.
- Asker, S., and Jerling, L. 1992. Apomixis in plants. CRC Press Boca Raton, FL, USA.
- Barcaccia, G., Mazzucato, A., Pezzotti, M., and Falcinelli, M. 1994. Comparison between isozyme and RAPD analyses to screen aberrant plants in *Poa pratensis* L. progenies. *Apomixis Newsletter* 7: 29-30.
- Bashaw, E. C., 1980. Apomixis and its implications in crop improvement. In W. R. Fehr and H.H. Hadley eds.], *Hybridization of crop plants*, 45-63, American Society of Agronomy, Madison, WI.
- Bashaw, E. C., and Hanna, W. W., 1990. Apomictic reproduction. In: *Reproductive Versatility in the Grasses*, G.P. Chapman, ed., 101-129, Cambridge University Press.
- Bayer, R. J., Ritland, K., and Purdy, B. G., 1990. Evidence of partial apomixis in *Antennaria media* (Asteraceae, Inuleae) detected by the segregation of genetic markers. *American Journal of Botany* 1078-1083.
- Böcher, T. W., 1951. Cytological and embryological studies in the amphiapomictic *Arabis Holboellii* complex. *K Dan Vidensk Selsk Biol Skr* VI7: 1-59.
- Bradley, M. V., 1948. An acetocarmine squash technique for mature embryosacs. *Stain Technology* 23: 29-40.
- Brown, W. V., and Emery, H. P., 1958. Apomixis in the Gramineae: Panicoideae. *American Journal of Botany* 45: 253-263.
- Burson, B. L. and Bennett, H. W., 1970. Cytology, method of reproduction, and fertility of Brunswickgrass, *Paspalum nicorae* Parodi. *Crop Science* 10: 184-187.
- Burson, B. L., Voigt, P. W., Sherman, R. A., and Dewald, C. L., 1990. Apomixis and sexuality in Eastern Gamagrass. *Crop Science* 30: 86-89.
- Burton, G. W., Millot, J. C., and Monson, W. G., 1973. Breeding procedures for *Panicum maximum* suggested by plant variability and mode of reproduction. *Crop Science* 13: 717-720.
- Carman, J. G., Crane, C., and Riera-Lizarazu, O., 1991. Comparative histology of cell walls during meiotic and apomeiotic megasporogenesis in two hexaploid Australasian *Elymus* species. *Crop Science* 31: 1527-1532.
- Chao, C. Y., 1974. Megasporogenesis and megagametogenesis in *Paspalum commersonii* and *P. longifolium* at two polyploid levels. *Botaniska Notiser* 127: 267-275.
- Clausen, J., Keck, D. D., and Hiesey, W. M., 1947. Partial apomixis: an evolutionary labyrinth. *Carnegie Institute of Washington Year Book* 46 (1946/47): 101-103.
- Crane, C. F., and Carman, J. G., 1987. Mechanisms of apomixis in *Elymus rectisetus* from Eastern Australia and New Zealand. *American Journal of Botany* 74: 477-496.
- Darlington, C. D., and La Cour, L. F., 1966. *The Handling of Chromosomes*. 4th ed. Allen and Unwin. London.
- Duich, J. M., and Musser H. B., 1959. The extent of aberrants produced by 'Merion' Kentucky bluegrass, *Poa pratensis* L., as determined by first and second generation progeny test. *Agronomy Jour.* 51: 421-424.
- Dumas, C., and Mogensen, H. L., 1993. Gametes and fertilization: Maize as a model system for experimental embryogenesis in plants. *The Plant Cell* 5: 1337-1348.
- Ellstrand, N. C., and Levin, D. A., 1982. Genotypic diversity in *Oenothera laciniata* (Onagraceae), a permanent translocation heterozygote. *Evolution* 36: 63-69.
- Ford, H., and Richard, A. J., 1985. Isozyme variation within and between *Taraxacum* agamospecies in a single locality. *Heredity* 55: 289-291.
- Gadella, T. W. J., 1983. Some notes on the determination of the mode of reproduction in higher plants. *Proc. Koninklijke Nederl. Akad. van Wetenschappen*, ser. C. 86: 155-166.
- Galbraith D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. A., Sharma, D. P., and Firoozaboby, E., 1983: A rapid flow cytometric analysis of cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220, 1049-1051.

- Gustafsson, Å., 1947. Apomixis in higher plants. Part III. Biotype and species formation. Lunds Universitets Årsskrift Nova Series. 43: 183--370.
- Hanna, W. W., Schertz, K. F., and Bashaw, E. C., 1970. Apospory in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Science* 170: 338-339.
- Hanna, W. W., and Bashaw, E. C., 1987. Apomixis : its identification and use in plant breeding. *Crop Science* 27:1036-1039.
- Harlan, J. R., Brooks, M. H., Borgaonkar D. S., and de Wet, J. M. J., 1964. Nature and inheritance of apomixis in *Bothriochloa* and *Dichanthium*. *Botanical Gazette* 125: 41--46.
- Herr J. M., 1971. A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. *American Journal of Botany* 58: 785-790.
- Hignight, K. W., Bashaw, E. C., and Hussey, M. A., 1991. Cytological and morphological diversity of native apomictic buffelgrass, *Pennisetum ciliare* (L.) Link. *Botanical Gazette* 152:214-218.
- Hillary, B. B., 1940. Uses of the Feulgen reaction in cytology. II. New techniques and special applications. *Botanical Gazette* 102: 225-235.
- Huff, D. R., and Bara, J. M., 1993. Determining genetics origins of aberrant progeny from facultative apomictic Kentucky bluegrass using a combination of flow cytometry and silver-stained RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 87: 201-208.
- Javier, E. Q., 1970. The flowering habits and mode of reproduction in Guinea Grass (*Panicum maximum* Jacq.). Proceedings of the XIth International Grassland Congress, 284-289.
- Johansen, D. A., 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co., Inc., NY.
- Jongedijk, E., 1987. A quick enzyme squash technique for detailed studies on female meiosis in *Solanum*. *Stain Technology* 62: 135-141.
- Kojima, A., and Kawagushi, T., 1989. Apomictic nature of Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottl.) detected in unpollinated ovule culture. *Japan Journal of Breeding*. 39: 449-456.
- Kojima, A., Nagato, Y., and Hinata K., 1991a. Degree of apomixis in Chinese Chive (*Allium tuberosum*) estimated by esterase isozyme analysis. *Japan Journal of Breeding* 41: 73-83.
- Kojima, A., Hinata K., and Noda S., 1991b. An improvement of squash method for the cytological study of female meiosis in *Allium tuberosum* , Liliaceae. *Chromosome Information Service* 50: 5-6.
- Kojima, A., and Nagato, Y., 1992a. Pseudogamous embryogenesis and the degree of parthenogenesis in *Allium tuberosum*. *Sexual Plant Reproduction* 5: 79-85.
- Kojima, A., and Nagato, Y., 1992b. Diplosporous embryo-sac formation and the degree of diplospory in *Allium tuberosum*. *Sex. Plant Reprod.* 5: 72-78.
- Leblanc, O., and Savidan, Y., 1994. Timing of megasporogenesis in *Tripsacum* species as related to the control of apomixis and sexuality. *Polish Botanical Studies* 8 : 75-81.
- Leblanc, O., Peel, M. D., Carman, J. G., and Savidan, Y., 1995. Megasporogenesis and megagametogenesis in several *Tripsacum* species (Poaceae). *American Journal of Botany*, 82 : 57-63.
- Matzk, F., 1991. A novel approach to differentiate embryos in the absence of endosperm. *Sexual Plant Reproduction* 4: 88-94.
- Marshall, R. D., and Brown, A. H. D., 1974. Estimation of the level of apomixis in plant populations. *Heredity* 32: 321-333.
- Mazzucato, A., Wagenvoort M., and Nijs den, A. P. M., 1994. Flow cytometric analyses to estimate the mode of reproduction of *Poa pratensis* L. *Apomixis Newsletter* 7: 22-24.
- Mazzucato, A., den Nijs, A. P. M., and Falcinelli, M., 1994a. Estimation of the degree of parthenogenesis in Kentucky bluegrass in auxin-induced parthenocarpic seeds. *Crop Science*, in press.
- Mazzucato, A., Barcaccia, G., Pezzotti, M., and Falcinelli, M., 1994b. Biochemical and molecular markers for investigating the mode of reproduction in the facultative apomict *Poa pratensis* L. *Sex. Plant Reprod.*, in press.
- Mendel, G., 1869. Über einige aus künstlicher Befruchtung gewonnene *Hieracium*-Bastarde. *Ostwalds Klassiker der ex. Wiss.* 121.

- Miles, J. W., and do Valle, C. B., 1991. Assessment of reproductive behavior of interspecific *Brachiaria* hybrids. *Apomixis Newsletter*. 3:9-10.
- Miles, J. W., Pedraza, F., Palacios, N., and Tohme, J., 1994. Molecular marker for the apomixis gene in *Brachiaria*. Second International Conference on the Plant Genome, January 24-27, San Diego, CL.
- Mogie, M., 1988. A model for the evolution and control of generative apomixis. *Biol. J. Lin. Soc.* 37: 127-153.
- Müntzing, A., 1940. Further studies on apomixis and sexuality in *Poa*. *Hereditas* 26: 115-190.
- Müntzig, A. and Müntzig, G., 1945. The mode of reproduction of hybrids between sexual and apomictic *Potentilla argentea*. *Botaniska Notiser* 1945: 49-71
- Müntzig, A., 1958. Further studies on interspecific polyploidy in *Potentilla argentea* (coll.). *Botaniska Notiser* 111: 209-227.
- Naumova, T., den Nijs, A. P. M., and Willemse, M. T. M., 1993. Quantitative analysis of aposporous parthenogenesis in *Poa pratensis* genotypes. *Acta Botanica Neerlandica* 42: 299-313.
- Nijs den, A. P. M., and Dijk van, G. E., 1993. Apomixis. In *Plant Breeding: Principles and prospects*, M. D. Hayward, N. O. Bosemark, and I. Romagosa eds.], 229-245, Chapman and Hall, London.
- Nogler, G., 1984. Gametophytic apomixis. In *Embryology of Angiosperms*, B. M. Johri ed.], 475-518, Springer-Verlag, Berlin.
- Norrman, G. A., Quarin, C. L., and Burson, B. L., 1987. Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. *Journal of Heredity* 80: 24-28.
- Nygren, A., 1951. Embryology of *Poa*. *Carnegie Intitute of Washington Year Book*, 50 (1950/51): 113-115.
- Ozias-Akins, P., Lubbers, E. L., Hanna, W. W., McNay, J. W., 1993. Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: Co-inheritance of the trait and molecular markers. *Theoretical Applied Genetics* 85: 632-638.
- Peel, M. D., 1993. Meicyte callose in aposporic and diplosporic grasses and in hybrids between bread wheat and *Elymus rectisetus*. M.S. thesis, Utah State University, Logan, UT.
- Pennell, R. I., and Roberts, K., 1990. Sexual development in the pea is presaged by altered expression of arabinogalactan protein. *Nature* 344: 547-549.
- Quarin, C. L., 1992. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* 5: 7-15.
- Ragot, M., and Hoisington, D. A., 1993. Molecular markers for plant breeding: comparisons of RFLP and RAPD genotyping costs. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 975-984.
- Richards, A. J., 1986. *Plant breeding systems*. University Press, Cambridge.
- Rodkiewicz, B., 1970. Callose in cell walls during megasporogenesis in angiosperms. *Planta* 93: 39-47.
- Roy, B. A., and Rieseberg, L. H., 1989. Evidence for apomixis in *Arabis*. *Journal of Heredity* 80:506-508.
- Russel, S. D., 1978. Fine structure of megagametophyte development in *Zea mays*. *Canadian Journal of Botany* 57: 1093-1110.
- Saran, S., and de Wet, J. M. J., 1966. A rapid squash method for grass embryology. *Proceedings of Oklahoma Academy of Sciences* 46: 17-19.
- Savidan, Y., 1982a. Embryological analysis of facultative apomixis in *Panicum maximum* Jacq. *Crop Science* 22: 467-469.
- Savidan, Y., 1982b. Nature et hérédité de l'apomixie chez *Panicum maximum* Jacq. *Travaux et Documents de l'ORSTOM* 153: 47-56.
- Savidan, Y., 1989. Another "working hypothesis" for the control of parthenogenesis in *Panicum*. *Apomixis Newsletter* 1: 47-51.
- Savidan, Y., and Dujardin, M., 1992. Apomixie, la prochaine révolution verte?. *La Recherche* 23: 326-334.
- Smith, R. L., 1972. Sexual reproduction in *Panicum maximum* Jacq. *Crop Science* 12: 624-627.
- Stebbins, G. L., 1950. *Variation and Evolution in Plants*. Columbia University Press. New York.

- Stelly, D. M., Peloquin, S. J., Palmer, R. G., and Crane, C. F., 1984. Mayer's hemalum-methyl salicylate: A stain-clearing technique for observation within whole ovule. *Stain Technology* 59: 155-161.
- Strasburger, E., and Hillhouse, W., 1900. *Hand book of Practical Botany*. MacMillan. New York.
- Snyder, L. A., 1957. Apomixis in *Paspalum secans*. *American Journal of Botany* 44: 318-324.
- Tavoletti, S., Mariani, A., and Veronesi, F., 1991. Cytological analysis of macro- and microsporogenesis of a diploid alfalfa clone producing male and female 2n gametes. *Crop Science* 31: 1258-1263.
- Visser, N. C., and Spies, J. J., 1994. Cytogenetics studies in the genus *Tribolium* (Poaceae, Danthoniaeae). 2. A report on embryo sac development with special reference to the occurrence of apomixis in diploid specimens. *South African Journal of Botany* 60: 22-26.
- Voigt, P. W., and Bashaw, E. C., 1972. Apomixis and sexuality in *Eragrostis curvula*. *Crop Science* 12: 843-847.
- Voigt, P. W., and Burson, B. L., 1983. Breeding of apomictic *Eragrostis curvula*. In Proceedings of the 14th International Grassland Congress, 160-163.
- Warmke, H. E., 1954. Apomixis in *Panicum maximum*. *American Journal of Botany* 41: 5-11.
- Weimark, G., 1967. Apomixis and sexuality in *Hierochloë australis* (Gramineae) and in Swedish *H. odorata* on different polyploidy levels. *Botaniska Notiser* 120: 209-235.
- Williams, J. G. K., Hanafey, M. K., and Rafalski, J. A., 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* 218: 704-740.
- Williamson, C. J., 1976. Problems in the identification and utilisation of interspecific hybrids of *Poa* in a plant breeding programme. Ph.D. thesis, University of Edinburgh.
- Williamson, C. J., 1981. Variability in seedling progenies and the effect of light regimes during seed production on interspecific hybrids of *Poa*. *New Phytologist* 87: 785-797.
- Winkler, H., 1908. Uber Parthenogenesis und Apogamie im Pflanzenreich. *Progr. Rei. Bot.* 2: 293-454.
- Wu, L., Harivandi, A. H., and Davis, J. A., 1984. Identification of Kentucky bluegrass cultivars with esterase and phosphoglucomutase isozyme markers. *Crop Science* 24: 763-768.
- Young, B. A., Sherwood, R. T., and Bashaw, E. C., 1979. Cleared-pistils and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. *Canadian Journal of Botany* 57: 1668-1672.

Tables

Table 9-1: The four theoretical offspring classes in progenies from facultative pseudogamous apomicts (after Asker, 1979).

Egg cell origin	Egg cell development	
	Fertilization	Parthenogenesis
meiosis- reduction & recombinaison	Sexuality n+n offspring new genotypes	(Poly)haploid production n+0 offspring new genotypes
apospory or diplospory- no reduction	"Genomic accumulation" 2n+n offspring new genotypes	Apomixis 2n+0 offspring Maternal genotypes

	Megaspороgenesis			Megagametogenesis	References
	Meiosis	Callose	Cytoembryology		
SEXUALITY	Completed. The chalazal megaspore of the tetrad develops into an ES. Altered expression of arabinogalactan protein was shown to be associated with sexual development in <i>Pisum</i> .	Callose deposition in Angiosperms producing mono- and bisporic ES.	Meiotic sequence (MMC, dyad, tetrad).	Mature eight-nucleate ES forms from chalazal reduced megaspore through 3 or more mitoses (Polygonum type). Mature ES are produced latter than in apomictic (meiosis delays megagametogenesis)	-Rodkiewicz, 1970. -Herr, 1971. -Russel, 1978. -Pennel and Roberts, 1990. -Dumas and Mogensen, 1993.
APOMIXIS					-Nogler, 1984. -Crane, chapter 3.
Aposporous developments	Meiosis is initiated but generally fails soon or latter.	Yes (meiotic products). Naumova et al. (1993) claimed that particular disturbed callose patterns may indicate apospory.	Concomitant development of the reproductive cell through meiosis (sexuality) and somatic cell(s) through mitoses after enlargement.	ES forms from somatic cells through mitoses. Polyembryony: Several somatic cells may develop. Sexual ES can be formed. <i>Panicum</i> type: four-nucleate ES. <i>Hieracium</i> type: ES are similar to sexuals.	-Müntzig, 1940. -Warmke, 1954. -Burson and Bennett, 1970. -Young et al., 1979. -Savidan, 1982b. -Naumova et al., 1993.
Diplosporous developments	Antennaria type: meiosis is totally overpassed. Taraxacum and Ixeris type: meiosis fails early producing a restitution nucleus.	No callose deposition in megasporocyte cell walls.	MMC enlarges (<i>Tripsacum</i> , <i>Eragrostis curvula</i>) or elongates (<i>Elymus rectisetus</i>). Relation between enlargement/Antennaria type and elongation/Taraxacum type?	ES forms from the reproductive cell. No polyembryony. Generally similar to sexuality. Bi-nucleate ES shape can be characteristic (<i>Tripsacum</i>) Four nucleate ES described in <i>Eragrostis curvula</i>	-Voigt and Bashaw, 1972. -Crane and Carman, 1987. -Carman et al., 1991 -Leblanc et al., 1994.

Table 9-2: Megaspороgenesis and megagametogenesis characteristics of sexuality and apomictic developments.

	Plant itself			Progeny test			
Procedures*	Cytology (clearing procedures)	Molecular markers co-segregating with apomixis	Auxin tests	Ovaries & seeds Chr. counting	Chr. counting	Adult Plants Morphology	Markers
Information expected	Apomixis type determination; sexual potential estimation.	Depends on the nature of the marker(s) identified (to date linkage with apomeiosis).	Indication of apomixis expression; estimation of the degree of parthenogenesis	Indication of apomixis expression; estimation of the degree of apomixis.	Off-types of 2n+n and n+0 nature detection.	Apomixis identification and quantification; off-types nature if combined with chromosome counting.	
Plant materials required	15 to 100 flowers, depending on the objectives.	RFLP: 5 to 10 µg of DNA. RAPD: 5 to 30 ng of DNA.	100 flowers.	50 to 100 ovaries/seeds.	Apomixis quantification: at least 30 offsprings Apomixis identification: 10 to 20 offsprings.		
Advantages	Easy and quick to perform after flowering.	Analyses can be performed during the early development of the plant.	Easy and quick to perform after flowering	Easy and quick to perform after pollination.	Easy if flow cytometry. Analyses on young offsprings possible.	Easy	Analyses on young offsprings possible.
Constraints	Expensive (equipment)	Preliminary work with already determined materials. Use of the markers across accessions of different origins? Expensive (equipment, analyses**)	The auxin test has been used to date only in cool-season grasses.	Flow cytometry Equipments are expensive.	Chromosome counting: time consuming (classical methods) or expensive if flow cytometry is used.	Time and space consuming. Morphological tests: unreliable if apomixis is highly facultative.	
Equipments & facilities	Microscope equipped for differential interference contrast.	Lab equipped for plant molecular biology.	Basic equipments for cytological studies.	Flow cytometer and computer for data analyses.	Greenhouses, fields. Microscope or flow cytometer.	Greenhouses, fields.	Greenhouses, fields. Lab equipped for plant molecular biology.

Table 9-3: Advantages and inconvenients of the main procedures at the plant and progeny levels to investigate modes of reproduction. Costs for the main screening procedures are detailed in Table 9-4. * for protocols see Vol. 2; ** see Ragot and Hoisington (1993) for RFLP and RAPD costs.

	COST ESTIMATIONS			WORK	ACCURACY	INFORMATIONS EXPECTED
	Plant growth	Laboratory equipment	Chemicals			
Plant level						
Co-segregating markers	VL	VH	VH	M	H	no-reduction /parthenogenesis/apomixis
Sectioning	L	M	VL	VH	M	no-reduction / polyembryony
Clearing	L	H	VL	M	M to VH	no-reduction / polyembryony
ES analysis	L	H	VL	H	L	parthenogenesis / polyembryony
Tissue culture	L	H	M	H	M	no-reduction
Auxin test	L	L	L	M	M	parthenogenesis / polyembryony
Progeny tests						
Flow cytometry (FCM) ovaries/seeds	L	VH	M	L	L	indication of apomixis / offspring origin
Chromosome counting	M	L (microscopy) VH (FCM)	L (microscopy) M (FCM)	VH (microscopy) L (FMC)	H	indication of apomixis / offtypes origin
Morphology on seedlings	M	L	N	L	L	achieved apomixis
Isozymes	M	M	M	M	M to H	achieved apomixis / offspring origin
RFLP/RAPD	M	VH	VH	H	H	achieved apomixis / offspring origin
Morphology on adults	H	L	N	M	M	achieved apomixis

Table 9-4. Cost estimation, accuracy, and informations expected for the different procedures for estimation of apomixis and its components. Accuracy may vary according to the species. Legend: N none, VL very low, L low, M medium, H high, VH very high.

Figure captions

Figure 9-1. Mechanisms of pseudogamous gemetophytic apomixis: Consequences and comparison with sexual reproduction.

Figure 9-2. Clearing techniques in *Tripsacum* ssp. a. Diplosporous enlarged megaspocyte observed under interference-phase contrast after a methyl benzoate-dibutyl phthalate clearing procedure (600x). b. callose deposition during megasporogenesis in a sexual line (250x).

Figure 9-3. Aposporous development of Hieracium type in *Poa pratensis* after sectioning and staining. Macrospore degeneration at the micropylar side (dm), enlarged functional megaspore (fm), and aposporous initial in lateral-chalazal position (ai). (800x).

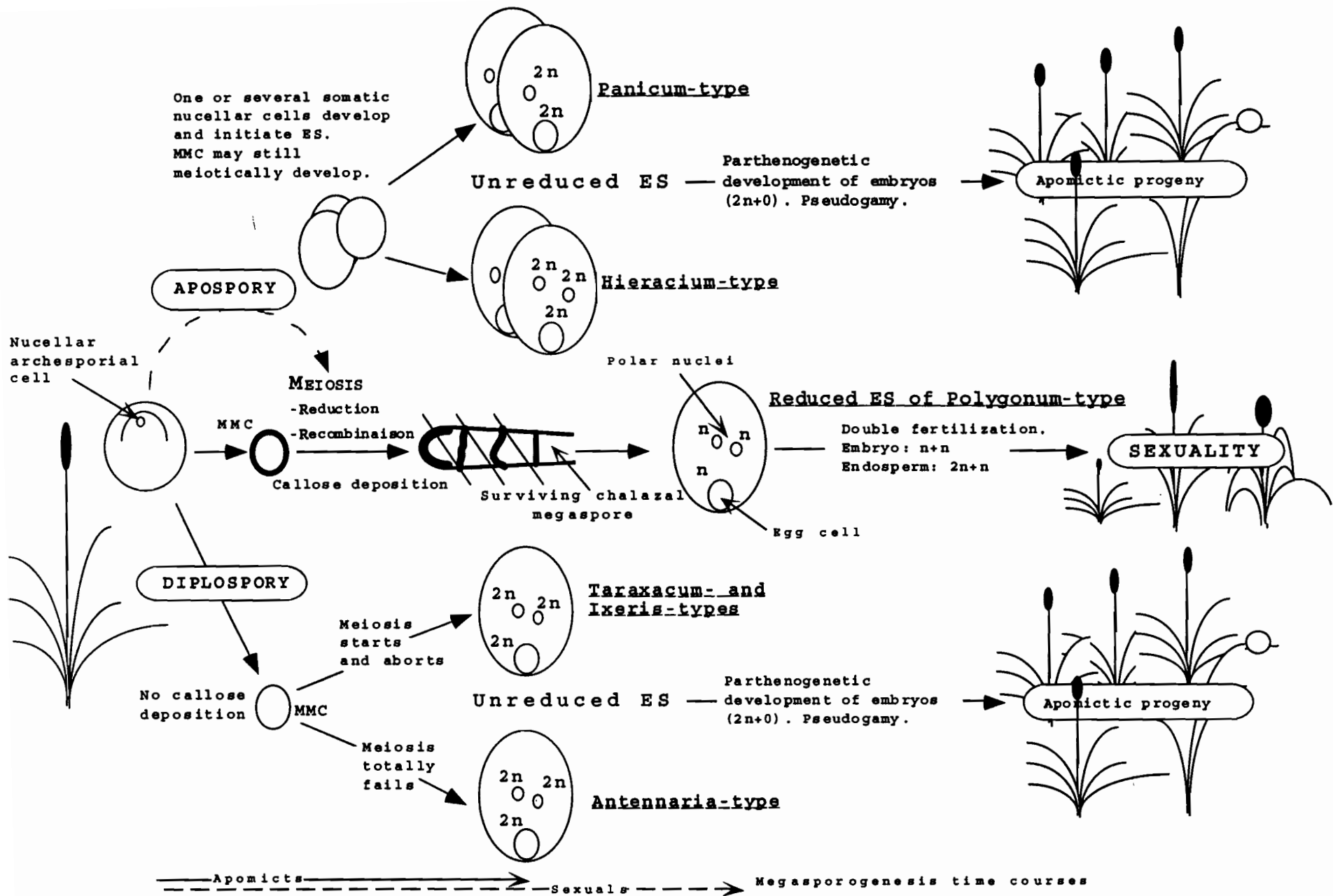


Figure 9-1: Mechanisms of pseudogamous gametophytic apomixis, consequences and comparison with sexual reproduction.



Figure 9-2

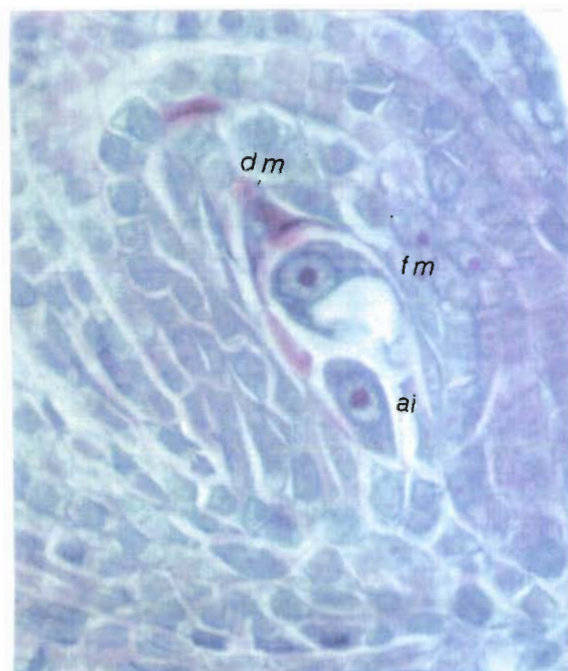


Figure 9-3.

PARTIE III

RESULTATS & DISCUSSION

A. APOMIXIE DANS LE GENRE *TRIPSACUM*

1. Etude cytoembryologique de la non-réduction et de ses conséquences

L'analyse cytoembryologique des modes de reproduction a montré :

i) que les accessions polyploïdes ($2n=54, 72, 90, \text{ et } 108$) sont apomictiques alors que les diploïdes ($2n=36$) sont sexuées ;

ii) que l'apomixie chez *Tripsacum* est de type diplosporique (absence complète de méiose), et que les taux de sexualité résiduelle chez les polyploïdes sont faibles (autour de 2%) ;

iii) que la synthèse de callose observée autour et dans les parois des mégasporocytes et de leurs dérivés lors de la mégagamétogenèse chez les sexués n'a pas lieu au cours du développement diplosporique ;

iv) qu'il existe une différence de timing au cours de la mégasporogenèse entre plantes sexuées et apomictiques : la production de sacs embryonnaires matures est plus précoce chez les diplosporiques que chez les sexués.

Ces résultats sont présentés et discutés annexe III (page 42) : *Megasporogenesis and megagametogenesis in several Tripsacum species (Poaceae)* (annexe III-1), et *Timing of development in Tripsacum species (Poaceae) as related to the control of apomixis and sexuality* (annexe III-2).

2. Expression de l'apomixie

L'analyse des descendance montre qu'une fraction non négligeable de descendants diffère du type maternel (14.8% pour l'ensemble des descendance ; tableau III-1 et figure III-1). Deux catégories de hors types sont mises en évidence :

i) des individus issus de reproduction sexuée ($n+n$).

ii) des individus présentant un nombre chromosomique ($2n=90 \text{ ou } 108$) correspondant à une accumulation génomique de type $2n+n$, clairement mise en évidence par l'analyse isozymique de ces individus (figure III-1b).

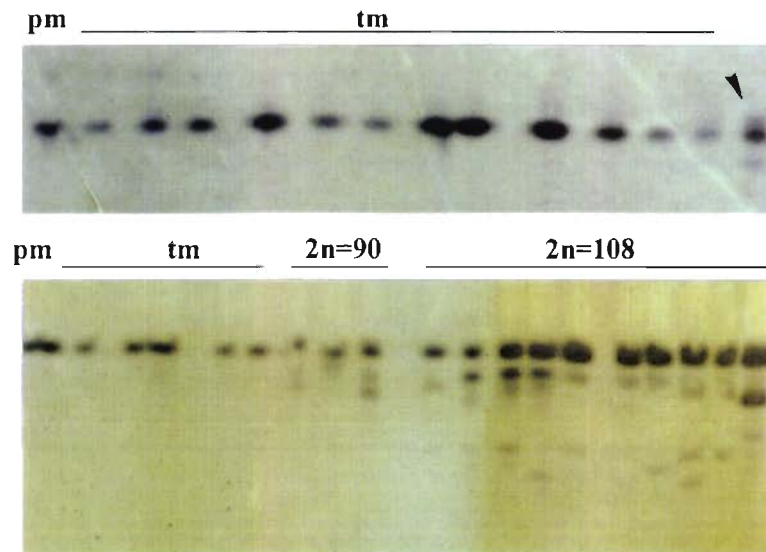


Figure III-1. Comparaison sur la base de marqueurs isozymiques (ADH) de *T. dactyloides* 65-1234 ($2n=4x=72$) et de descendants obtenus en pollinisation libre. Les nombres chromosomiques ont préalablement été estimés par cytométrie en flux. **a.** Détection d'un hors type sexué, $2n=72$ (flèche). **b.** Détection de hors types $2n+n$, $2n=90$ ou 108 . pm : plante mère (*T. dactyloides* 65-1234), tm : descendants de type maternel ($2n=72$).

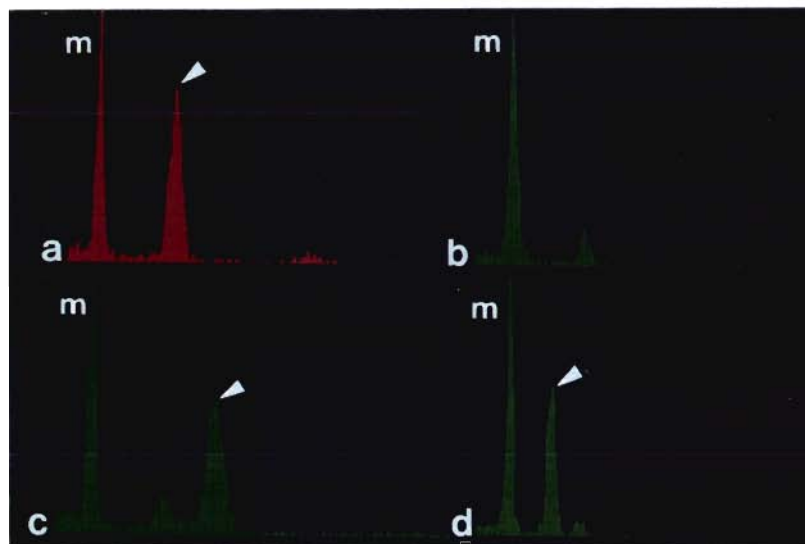


Figure III-2. Estimation des nombres de chromosomes dans les descendance de BC1 apomictiques par cytométrie en flux. La lignée de maïs CML62, dont la quantité d'ADN est similaire à celle des *Tripsacum* diploïdes (10 chromosomes de maïs sont donc équivalents à 18 chromosomes de *Tripsacum*, Leblanc *et al.* 1995b), a été utilisée comme standard interne. **a.** BC1 ($2n=56=20M+36Tr$). Un pic (flèche) dont l'index est le double de celui du pic maïs est détecté. **b.** BC2 ($2n=28=10M+18Tr$). Un seul pic est détecté. **c.** BC2 ($2n=66=30M+36Tr$). Un pic (flèche) dont l'index est 2,5 fois celui du pic maïs est détecté. **d.** BC2 ($2n=38=20M+18Tr$). Un pic (flèche) dont l'index est 1,5 fois celui du pic maïs est détecté. m : pic maïs.

Tableau III-1. Tests de descendance pour quatre accessions tétraploïdes. * nombre d'individus analysés. ** déterminé après estimation du contenu en ADN par cytométrie de flux. *** déterminée après analyse isozymique (ADH, MDH, PGI, et PGM), voir aussi figure III-1.

Accessions	Nb desc. *	Nombres de chromosomes **				Nature ***		
		2n = 54	2n = 72	2n = 90	2n=108	2n+0	2n+n	n+n
65-1234 (<i>T. dactyloides</i>)	101	-	77	5	19	74	24	3
9-569 (<i>T. dactyloides</i>)	59	-	56	-	3	56	3	-
16-59 (<i>T. dactyloides</i>)	73	-	64	2	7	62	9	2
120-1473 (<i>T. dactyloides</i>)	65	1	56	-	8	55	8	2
Totaux	298	1	253	7	37	247	44	7
%						82.9	14.8	2.3
%(65-1234)						72.3	23.7	3.9

Aucun polyhaploïde n'a été identifié, et un seul embryon double de type maternel a été détecté dans la descendance de *T. dactyloides* 65-1234. De plus, la fréquence des méioses observées par tests de descendance est similaire à celle estimée en cytoembryologie (2 à 3%, Leblanc *et al* 1995a, annexe III-1).

L'analyse de descendance confirme donc les potentialités de reproduction sexuée des accessions apomictiques révélées par l'étude de la mégasporogénèse, et met aussi en évidence des taux relativement élevés de hors types 2n+n. De plus, les mêmes tendances que celles observées au cours de cette étude ont été observées par Berthaud (1995) pour 26 accessions polyploïdes. La production de hors-types sexués est faible et constante autour de quelques pourcents, alors que la fréquence d'apparition de hors-types 2n+n est nettement plus variable (0-35%).

3. Production de matériels en ségrégation pour les modes de reproduction

Les croisements interspécifiques distants entre génotypes sexués diploïdes et tétraploïdes apomictiques ont produits 386 hybrides. Cependant, tous se sont révélés être triploïdes après analyse en cytométrie de flux. Environ 250 plantes tétraploïdes sexuées ont été obtenues après régénération de cals diploïdes traités à la colchicine (voir *Chromosome doubling in Tripsacum : The production of artificial sexual tetraploid plants*, annexe III-3).

Sur ces 250 plantes tétraploïdes sexuées régénérées, une centaine a été transférée au champ. Durant les mois de septembre et octobre 1994, les premiers croisements ont été réalisés entre ces plantes et diverses accessions tétraploïdes apomictiques. 24 hybrides F1 ont ainsi été obtenus (tableau II-2). A ces 24 plantes, s'ajoutent 12 hybrides tétraploïdes issus du croisement 7002-3 (diploïde) par 52-604 (hexaploïde).

Tableau III-2. Nombre et origine des hybrides F1 obtenus après croisement entre génotypes tétraploïdes sexués et tétraploïdes apomictiques. * voir Leblanc *et al.* 1995c, annexe III-3, tableau 2.

Croisements		Nb. F1
Sexués*	Apomictiques	
C-14	pop. 49 (ZP)	1
C-48	pop. 47 (PL)	1
C-49	pop. 21 (DM)	22

B. IDENTIFICATION DE MARQUEURS MOLECULAIRES LIES A L'APOMIXIE : *Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-Tripsacum hybrids using maize RFLP markers (annexe III-4).*

Résumé -- L'apomixie diplosporique est un mode de reproduction asexuée par graines caractéristique des formes polyhaploïdes du genre *Tripsacum*, un apparenté sauvage du maïs. L'introduction du ou des gènes responsables de ce caractère chez les plantes cultivées ouvrirait de nouvelles perspectives pour l'amélioration des plantes et l'agriculture. Dans le cadre du programme de transfert de l'apomixie au maïs conduit au CIMMYT, différentes espèces *Tripsacum* ont été croisées avec le maïs et de nombreux hybrides F1 ont été obtenus. Une stratégie, basée sur l'analyse de bulks ségrégants, a été développée pour identifier des marqueurs moléculaires liés à la diplosporie chez *T. dactyloides*. Celle-ci a été facilitée par la grande similarité qui caractérise les génomes des différentes espèces de la sous-famille des Andropogonées. Une famille F1 maïs-*T. dactyloides*, pour laquelle les modes de reproduction ségrégent suivant un ratio 1:1, a été analysée en utilisant un jeu de sondes RFLP du maïs ; trois fragments de restriction coségrégants avec la diplosporie ont ainsi pu être identifiés. De plus, ces marqueurs appartiennent au même groupe de liaison chez le maïs (partie terminale du bras long du chromosome 6). Ces résultats suggèrent une hérédité simple de la diplosporie chez *Tripsacum*. Les possibilités de manipulation des modes de reproduction dans les générations de rétrocroisement maïs-*Tripsacum* et les implications pour le transfert de l'apomixie au maïs sont discutées.

C. PRODUCTION DE DIFFERENTES GENERATIONS D'HYBRIDES MAIS-TRIPSACUM ET ANALYSE DES MODES DE REPRODUCTION

1. Production et caractéristiques générales d'hybrides maïs-*T. dactyloides*

Environ 6100 hybrides ont été produits par rétrocroisement du niveau BC1 par le maïs, et leurs nombres de chromosomes ont été identifiés par cytométrie de flux (figure III-2). Globalement, les

taux de hors types $2n+n$ (16.1%) et $n+n$ (3.4%) sont très similaires à ceux observés chez *T. dactyloides* 65-1234, le parent sauvage (tableau III-3). Parmi les hors types $n+n$, 25% ont un nombre de chromosomes résultant probablement de méioses mal équilibrées ($2n >38$ ou <38). D'autres catégories de hors types, représentées par un petit nombre d'individus (2,2%), ont aussi été identifiées :

i) des hybrides présentant un nombre de chromosomes (ex., $2n=52-55$) certainement du à des pertes de chromosome(s) lors de restitutions de noyaux (diplosporie du type *Taraxacum*, voir III-C-21) ;

ii) 12 polyhaploïdes ($2n=28$, hors type $n+0$) ;

iii) 2 hybrides à 112 chromosomes issus de doublement chromosomique spontané.

Les nombres chromosomiques détectés dans les descendance de ces BC2 (38, 28, et 66 chromosomes) après recroisement avec le maïs sont présentés au tableau III-4. Les taux de germination observés pour les différents types d'hybrides maïs-*Tripsacum* sont de l'ordre de 80 à 90%. Les hybrides à 112 chromosomes n'ont produit aucun descendant.

Tableau III-3. Composition des descendance de *T. dactyloides* 65-1234 (101 descendants) et des BC1 issus de l'hybride F1-16 maïs-*T. dactyloides* 65-1234 (6162 descendants). * dont 25% d'hybrides $2n=\pm 38$. ** $2n=\pm 56$, $2n=28$, $2n=112$.

Nature des descendants	<i>T. dactyloides</i> 65-1234	BC1 issus de F1-16
$2n+0$	73.3%	78.3%
$2n+n$	23.7%	16.1%
$n+n^*$	3.0%	3.4%
$n+0$	0%	0.2%
autres**	0%	2.0%

Tableau III-4. Fréquences des différents nombres chromosomiques (estimés par cytométrie de flux) détectés dans les descendance d'hybrides BC2 et BC3 obtenus à partir de l'hybride F1-16 maïs-*T. dactyloides* 65-1234.

BC2	Nb.desc.	2n
66 chr.	101	66 (77.1%), 76 (17.9%), 38 ou ± 38 (5%)
38 chr.	151	20 ⁺ (100%)
28 chr.	128	28 (84%), 38 (16%)
BC3		2n
38 chr.	3589	38 (90.4%), 48 (8.2%), 76 (0.8%), 20 ⁺ (0.6%)

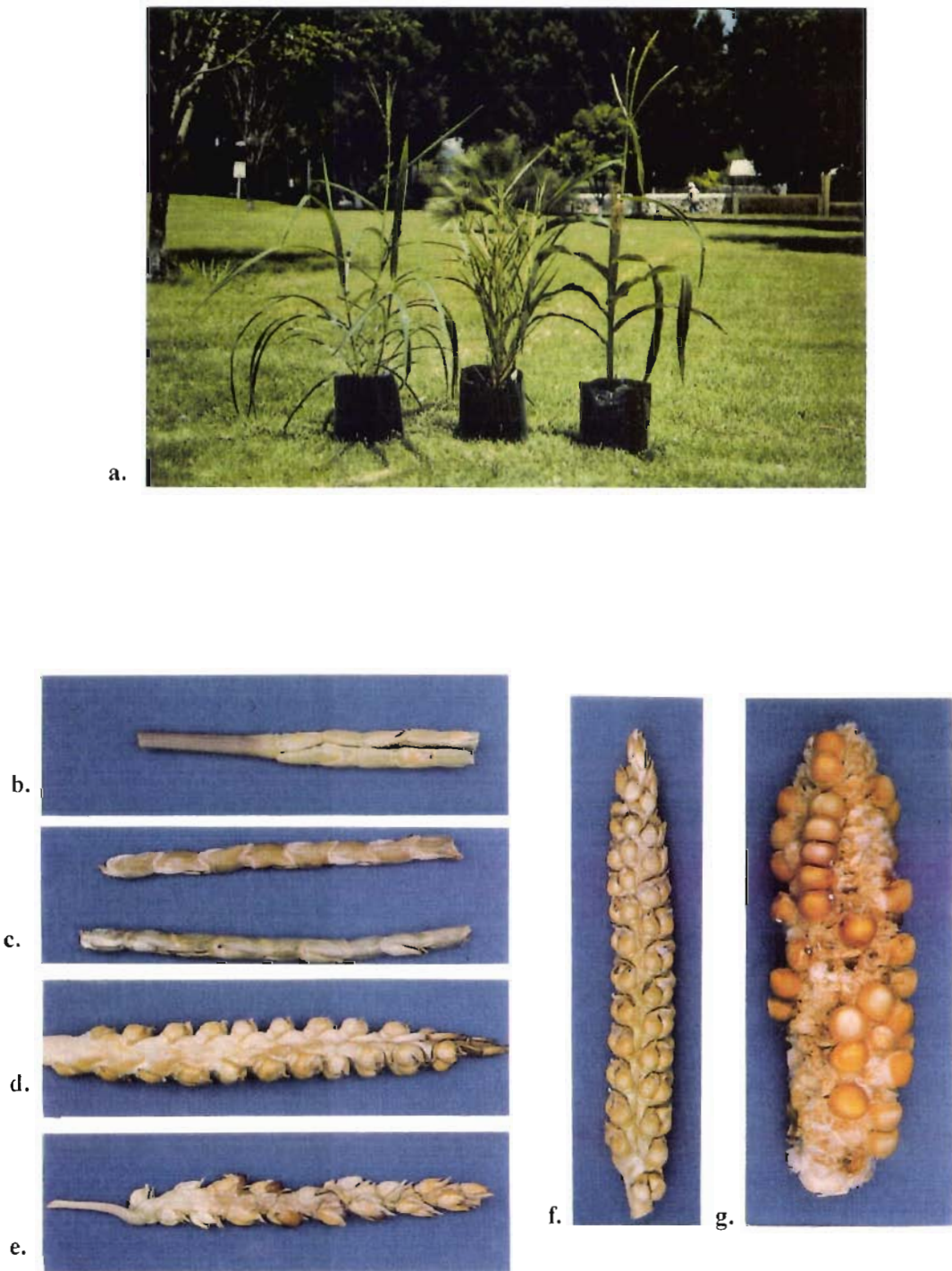


Figure III-4. Evolution de la morphologie et des inflorescences secondaires des hybrides maïs-*Tripsacum* au cours des différentes générations de rétrocroisements. **a.** Morphologie. De gauche à droite : BC1 ($2n=56$), BC2 ($2n=28$), et BC2 ($2n=38$). **b** à **g** : Inflorescences secondaires. **b.** Partie femelle de l'inflorescence de *T. dactyloides* 65-1234. **c.** Hybride F1 (partie femelle). **d.** BC1. **e.** BC2 à $2n=28$. **f.** BC3 à $2n=38$. **g.** Lignée d'addition maïs-*T. dactyloides* 65-1234 ($2n=22$).

similaires au type *Tripsacum*. De plus, bien que les formes à 28 chromosomes soient issues d'un processus de polyhaploïdisation, elles ne présentent pas de dépression en ce qui concerne aussi bien la vigueur que la fertilité femelle (Leblanc *et al.* 1995e, annexe III-5).

Tableau III-5. Principales caractéristiques chez les différentes générations d'hybrides maïs-*T. dactyloides* 65-1234.

Nb. chr.	Port général	Fertilité		Inflorescences terminales	Inflorescences secondaires
		M	F		
2n=46	- Type sauvage	-	+	- Peu ramifiées. - Articles porteurs de quelques fleurs femelles à la bases des ramifications.	- Peu ramifiées - A la base de chaque entre-noeud des talles florifères. - Articles porteurs de quelques fleurs femelles à la bases des ramifications
2n=56	- Type sauvage	-	++	- Peu ramifiées. - Articles porteurs de quelques fleurs femelles à la bases des ramifications	- Peu ramifiées. - A la base de chaque entre-noeud des talles florifères. - Articles porteurs de quelques fleurs femelles à la bases des ramifications. - Les articles "femelles" sont souvent soudés.
2n=28	- Type sauvage	-	+++	- Une ramification dont les articles de la base portent des fleurs femelles (4 à 5). Les parties terminales mâles sont très souvent atrophiées.	
2n=38	- Un talle principal avec une architecture maïs (insertion des feuilles). - Talles secondaires	-	++	- Entièrement mâle.	- Quelques articles porteurs de fleurs mâles. - Plusieurs ramifications avec les articles femelles soudés (2 à 4 rangs).
2n > 23	- Type maïs - Persistance de caractères sauvages	-	- à +++	- Entièrement mâle.	- 1 à 3 sur talle principal. - Epi.
2n ≤ 23	- Type maïs - Petite taille	- à +++	- à +++	- Entièrement mâle	- 1 à 3 sur talle principal. - Epi.

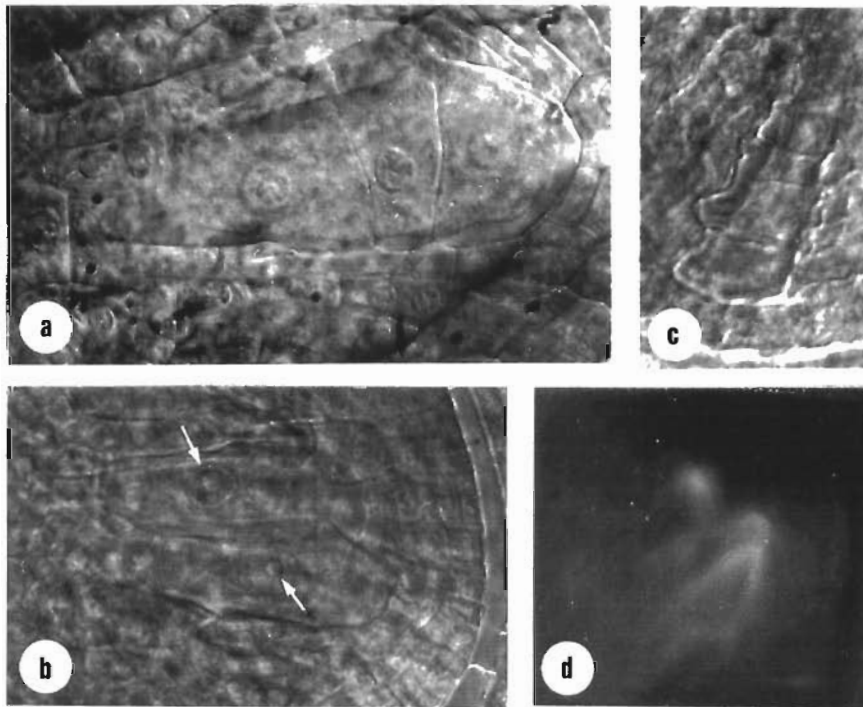


Figure III-5. Perturbation des modes de reproduction chez les hybrides F1 maïs-*Tripsacum*.

- a.** Triade chez l'hybride apomictique F1-18 (x 850, contraste d'interférence après éclaircissement au dibutyl phthalate-benzyl benzoate).
- b.** Initiation de deux mégasporocytes, dont les noyaux sont indiqués par une flèche, chez l'hybride apomictique F1-121. (x 650, contraste d'interférence après éclaircissement au dibutyl phthalate-benzyl benzoate).
- c.** Tétrade chez l'hybride sexué F1-322. Noter l'aspect plissé des parois cellulaires. (x 650, contraste d'interférence après éclaircissement au dibutyl phthalate-benzyl benzoate).
- d.** Fluorescence indiquant la présence de callose autour de plusieurs mégasporocytes chez l'hybride F1-322 (x 400, épifluorescence après éclaircissement dans une solution contenant 800g/l de sucrose et 100mg/l de bleu d'aniline).

Les hybrides à 38 chromosomes, mâles stériles, mais dont l'architecture et les inflorescences recouvrent des caractéristiques maïs, correspondent à la première étape indiquant un retour vers un phénotype maïs (figure III-4). Cependant, l'influence des chromosomes *Tripsacum* chez les "lignées d'addition" est fortement marquée : taille réduite, tallage, nombre d'épis, fertilité mâle recouvrée pour un petit nombre d'extrachromosomes *Tripsacum* (1 à 3), floraison plus ou moins perturbée. Par ailleurs, chez les formes d'addition obtenues à partir de BC2 sexués à 38 chromosomes, la dépression observée semble moins marquée que chez celles issues de BC3 apomictiques.

L'évolution des caractères morphologiques, de la structure des inflorescences et de la fertilité est résumée au tableau III-5.

2. Analyse des modes de reproduction

21. Hybrides F1

La synthèse de callose lors de la mégasporogénèse a été analysée pour l'ensemble des hybrides F1 (tableau III-6). De plus, pour une partie des hybrides issus du croisement de *T. dactyloides* 65-1234 x hybride maïs H1, l'observation des structures internes des ovaires (contraste d'interférence) a été réalisée sur le même matériel que celui utilisé pour l'étude de la callose.

Tableau III-6. Modes de reproduction (A, apomixie ; S, sexualité) chez 61 hybrides maïs-*Tripsacum* déterminés d'après l'analyse de la callose lors de la mégasporogénèse.

Accessions <i>Tripsacum</i>	Modes de reproduction	
	A	S
9-32	3	1
16-59	1	-
49-439	1	1
52-501		1
65-1234	23	29
116-1430	1	-
Total	29	32

D'une façon générale, apomixie et sexualité présentent des modalités similaires à celles observées chez *Tripsacum*, mais des perturbations ou des modifications de l'expression des deux modes de reproduction ont été observées :

i) chez les hybrides apomictiques, la majorité des mégasporocytes se différencie suivant un développement diplosporique de type *Antennaria* (tableau III-7). Cependant, une proportion plus

importante que celle observée chez *Tripsacum* (environ 2%, Leblanc *et al.* 1995a) présente un développement diplosporique de type *Taraxacum* (8%, tableau III-4). Le développement diplosporique de type *Antennaria* caractérisé par une élongation des mégasporocytes, représente une part très faible des observations (2 sur 112, tableau III-7). Une triade a aussi été observée chez l'hybride F1-18 (figure III-5a). Aucune fluorescence n'a par ailleurs été détectée indiquant vraisemblablement une origine diplosporique de type *Taraxacum* et non méiotique de cette structure. De plus, il arrive fréquemment que plusieurs cellules se différencient suivant un développement diplosporique de type *Antennaria* caractéristique (fort grossissement par vacuolisation, gros noyau, absence de callose, figure III-5b).

Tableau III-7. Analyse détaillée (contraste d'interférence) de la mégasporogénèse chez 11 hybrides F1 maïs-*T. dactyloides* 65-1234 apomictiques. * Ant. : diplosporie de type *Antennaria* ; Tarx. : diplosporie de type *Taraxacum*. ** pm : produits de méiose (callose). *** un mégasporocyte allongé.

F1	Nb. obs.	Mégasporogénèse*		
		Ant.	Tarx.	autres**
3	13	10***	3	
7	8	8		
10	14	13		pm
18	11	8	2	triade
20	11	10	1	
121	9	9		
212	8	8		
323	16	16***		
490	13	9	4	
500	11	10		pm
516	11	11		
Totaux	125	112	10	3
%		90.6	8.0	2.4

ii) chez les hybrides sexués, les parois cellulaires des produits de la méiose ont souvent un aspect plissé en accordéon (figure III-5c) qui n'a été observé ni chez *Tripsacum* ni chez le maïs. Comme chez les hybrides F1 apomictiques, plusieurs cellules au sein d'un même nucelle peuvent être induites ; de la fluorescence est généralement observée dans les parois de ces structures multiples après éclaircissement, indiquant que plusieurs cellules peuvent suivre un développement de type méiotique (figure III-5d). Par ailleurs, d'importants dépôts de callose sont fréquemment observés dans le nucelle ou au niveau d'amas cellulaires notamment au pôle micropylaire. Aucun développement correspondant à une forme d'apomixie n'a été observé.

Des doublements spontanés n'ont été détectés que dans les descendances d'hybrides apomictiques (hybrides à $2n=112$ issus de BC1 et à $2n=76$ issus de BC3). La fréquence d'apparition de ces génotypes est plus élevée chez les BC3 apomictiques que chez les BC1 (tableau III-4). Les causes de ces doublements spontanés sont discutées partie IV A-3.

22. Générations de rétrocroisements

221. Polyhaploïdes ($2n=28$) : *Can diploid cereals reproduce through sexuality? Evidence from maize-Tripsacum hybrids* (annexe III-5).

Résumé -- Chez les graminées sauvages, l'apomixie gamétophytique ne s'exprime que chez les plantes polyploïdes. Dans notre tentative de transfert de l'apomixie diplosporique des formes tétraploïdes du genre *Tripsacum* ($2n=72$) au maïs, des polyhaploïdes, combinant un jeu de chromosomes de chacun des deux genres, ont été obtenus après rétrocroisements de différentes générations d'hybrides maïs-*Tripsacum* par le maïs. Ces plantes sont totalement mâles stériles. Cependant, elles présentent une fertilité femelle élevée et se reproduisent apomictiquement. De tels polyhaploïdes représentent le premier cas d'expression de l'apomixie dans des conditions similaires au niveau diploïde chez les graminées. Ceci suggère que l'apomixie diplosporique pourrait s'exprimer dans une plante cultivée diploïde telle que le maïs ou le riz.

222. Hybrides BC2 à $2n=38$

D'après les tests de descendances, tous les hybrides BC2 à 38 chromosomes obtenus directement à partir de BC1 à 56 chromosomes sont sexués (tableau III-4) ; La cytométrie en flux a montré que les descendants de ces BC2 ont des nombres de chromosomes variables (quantités d'ADN estimées différentes) et inférieur à 38. Ceci a été vérifié par comptage chromosomique sur pointes racinaires pour une partie de ces descendants (20 à 32 chromosomes), et indique qu'ils sont issus de la fécondation de gamètes réduits constitués de 10 chromosomes maïs et d'un nombre variable de chromosomes de l'espèce sauvage. Le mode de reproduction sexué a été confirmé par l'analyse cytoembryologique de la mégasporogénèse chez ces hybrides (dépôts de callose).

223. Hybrides $2n+n$

L'accumulation des génomes ne modifie pas le mode reproduction apomictique ; les tests de descendances chez les hybrides *i*) BC1 issus de l'hybride apomictique F1-16 (tableau III-3), *ii*) BC2 à 66 chromosomes issus de BC1 apomictiques (tableau III-4), et *iii*) BC3 à 38 chromosomes obtenus dans les descendances des polyhaploïdes à 28 chromosomes (Leblanc *et al* 1995e, tableau III-4), indiquent un mode de reproduction apomictique. De plus, lorsque l'analyse cytoembryologique a été

faite ($2n=28$, $2n=38$), l'apomixie s'exprime principalement suivant le type *Antennaria* de la diplosporie.

3. Conséquences pour le transfert - Production de lignées d'addition à partir de BC3 apomictiques.

Au niveau F1, la ségrégation pour les modes de reproduction suggère une hérédité simple de l'apomixie chez *T. dactyloides* (tableau III-6). Chez les descendants des BC1 issus de méioses (hybrides à 38 et 28 chromosomes), la ségrégation observée est étroitement associée au nombre de chromosomes des hybrides : tous les hybrides à 38 chromosomes analysés sont sexués, alors que ceux à 28 chromosomes sont apomictiques.

Les polyhaploïdes apomictiques maïs-*Tripsacum* ou BC2 à 28 chromosomes sont donc la seule source de plantes à 38 chromosomes apomictiques (BC3), qui sont les plantes mères de potentielles "lignées d'addition" apomictiques. Afin de constituer rapidement une collection importante de BC3 apomictiques, des cals ont été induits et multipliés (milieu N6 + 2mg/l de dicamba) à partir d'embryons issus de grains produits par différents hybrides apomictiques à 38 chromosomes. Après vérification du niveau de ploïdie de ces cals (cytométrie de flux), environ 700 plantules ont été régénérées. L'analyse par cytométrie de flux de 3589 descendants montre des différences importantes de l'expression de l'apomixie par rapport à celle observée au niveau BC1, notamment en ce qui concerne le taux de hors types sexués (voir précédemment Partie III-C-1, tableaux III-3 et III-4). Cependant, celles-ci peuvent aussi être liées à une viabilité réduite des embryons issus de sexualité.

Le tableau III-8 présente les 22 hors types $n+n$ identifiés dans les descendance des BC3 apomictiques, qui représentent les premières "lignées d'addition" produites à partir de matériel apomictique. Les nombres de chromosomes, qui ont été confirmés par comptage sur pointe de racines, se répartissent entre $2n=20$ et $2n=34$. 14 des 18 chromosomes qui constituent le stock haploïde chez *Tripsacum* peuvent donc être relativement facilement transmis par la voie femelle. Sur la base de marqueurs moléculaires appartenant au même groupe de liaison que les marqueurs liés à l'apomixie chez *T. dactyloides* 65-1234 (D. Grimanelli, ORSTOM-CIMMYT, non publié), 6 de ces "lignées d'addition" ont été testées pour détecter la présence du chromosome responsable de l'expression de l'apomixie : il n'a été détecté que pour un seul individu, BC4#6-1275 ($2n=32$). Cependant, cet hybride n'a pas produit d'inflorescences, et son mode de reproduction n'a pu être confirmé par cytoembryologie.

Tableau III-8. "Lignées d'addition" maïs-*Tripsacum* produites à partir d'hybrides BC3 apomictiques à 38 chromosomes. 2n : nombres de chromosomes (estimés par cytométrie de flux, puis déterminés par comptages sur pointes de racines). MR : modes de reproduction identifié après analyse RFLP (A, apomixie ; S, sexualité). * les nombres de chromosomes entre parenthèses correspondent à plusieurs générations de rétrocroisement indiquées par l'exposant.

"Lignées d'addition"	2n	Nb de chromosomes des générations antérieures*	MR (RFLP)
BC4#-8-327	20	46-(56) ⁵ -28-38	?
BC4#-6-1276	22	(46) ² -56-(28) ² -38	S
BC4#-6-1336	22	(46) ² -56-(28) ² -38	?
BC4#-6-1342	22	(46) ² -56-(28) ² -38	?
BC4#-6-1267	23	(46) ² -56-(28) ² -38	?
BC4#-6-1274	23	(46) ² -56-(28) ² -38	?
BC4#-6-1229	24	(46) ² -56-(28) ² -38	S
BC4#-6-1250	24	(46) ² -56-(28) ² -38	?
BC4#-6-1340	25	(46) ² -56-(28) ² -38	?
BC4#-6-1341	25	(46) ² -56-(28) ² -38	?
BC4#-7-1492	25	46-(56) ⁴ -28-38	?
BC4#-6-1315	28	(46) ² -56-(28) ² -38	S
BC4#-6-1343	28	(46) ² -56-(28) ² -38	?
BC4#-6-1275	32	(46) ² -56-(28) ² -38	A
BC4#-6-1319	32	(46) ² -56-(28) ² -38	?
BC4#-6-1339	32	(46) ² -56-(28) ² -38	?
BC4#-6-1305	33	(46) ² -56-(28) ² -38	S
BC4#-6-1317	33	(46) ² -56-(28) ² -38	?
BC4#-6-1318	33	(46) ² -56-(28) ² -38	?
BC4#-6-1307	34	(46) ² -56-(28) ² -38	?
BC4#-6-1308	34	(46) ² -56-(28) ² -38	?
BC4#-6-1311	34	(46) ² -56-(28) ² -38	S

ANNEXE III

Annexe III-1

Leblanc O, Peel MD, Carman JG, Savidan Y (1995) Megasporogenesis and megagametogenesis in several *Tripsacum* species (Poaceae).
American Journal of Botany 82 : 57-63.

Annexe III-2

Leblanc O, Savidan Y (1994) Timing of megasporogenesis in *Tripsacum* species (Poaceae) as related to the control of apomixis and sexuality.
Polish Botanical Studies 8 : 75-81.

Annexe III-3

Leblanc O, Dueñas M, Hernández M, Bello S, Garcia V, Berthaud J, Savidan Y (1995) Chromosome doubling in *Tripsacum* : The production of artificial sexual tetraploid plants.
Plant Breeding 114 (sous presse)

Annexe III-4

Leblanc O, Grimanelli D, González-de-León D, Savidan Y (1995) Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-*Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers.
Theoretical and Applied Genetics (sous presse)

Annexe III-5

Leblanc O, Grimanelli D, Islam-Faridi N, Berthaud J, Savidan Y (1995) Can diploid cereals reproduce through sexuality? Evidence from maize-*Tripsacum* hybrids.
Journal of Heredity (accepté pour publication)

ANNEXE III-1

MEGASPOROGENESIS AND MEGAGAMETOGENESIS IN SEVERAL *TRIPSACUM* SPECIES (POACEAE)¹

OLIVIER LEBLANC,² MICHAEL D. PEEL,^{3,5}

JOHN G. CARMAN,³ AND YVES SAVIDAN^{2,4}

²The French Scientific Research Institute for Development through Cooperation (ORSTOM) and the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), *Tripsacum* Project, Apartado Postal 6-641, 06600 Mexico D. F., Mexico; and

³Plants, Soils and Biometeorology Department, Utah State University, Logan, Utah 84322-4820

The *Tripsacum* agamic complex ($x = 18$) will provide valuable characters for maize breeding, provided that apomixis can be manipulated. Apomixis in *Tripsacum* was first reported 40 years ago, but its prevalence in the genus has not been established. Reproductive development was determined for eight Mexican and two South American *Tripsacum* species by microscopic analysis of ovaries cleared in a benzyl benzoate-dibutyl phthalate solution using interference contrast optics. The occurrence and distribution of callose deposition during megasporogenesis were determined by fluorescence microscopy of ovaries optically cleared in an aqueous sucrose solution containing aniline blue. Diploid genotypes were sexual. Polyploid forms reproduced apomictically following the Antennaria type (complete meiosis abortion) of diplospory. The *Taraxacum* type (unreduced megaspore production through meiotic restitution nuclei) of diplospory also occurred but rarely. The walls of diplosporic megasporocytes lacked callose whereas the walls of sexual megasporocytes contained a normal complement of callose. The absence of callose suggests that the diplosporic forms of reproduction result from mutations affecting the normal meiotic process. Apomixis in the *Tripsacum* genus is facultative, and the production of new polyploid genotypes through genetic exchanges involving both apomictic and sexual genotypes is possible.

The *Tripsacum* Agamic Complex is widespread in the American continents (from 42° N to 24° S). *Tripsacum* is portrayed in numerous systematic studies as a complex genus generally containing 16 species with chromosome numbers ranging from $2n = 2x = 36$ to $2n = 6x = 108$ (Randolph, 1970; de Wet, Gray, and Harlan, 1976; de Wet et al., 1981). The majority of species are found in Mexico, which is considered the center of *Tripsacum* diversity (Berthaud and Savidan, 1989). It is a member of the secondary gene pool of maize (Harlan and de Wet, 1971) and is thus a potential source of valuable genes for this crop. In addition to the character of apomixis, accessions of *T. bravum* Gray may also be resistant to *Striga* ssp., a major parasitic weed of tropical cereals (Dr. D. Berner, International Institute for Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria, personal communication). A better understanding of the reproductive mechanisms occurring in the entire genus is required for efficient transfer of genes from *Tripsacum* to maize.

Apomixis was first described in polyploid strains of *T. dactyloides* (L.) L. by Farquharson (1955) who reported polyembryony and facultative apomixis without describing the cytoembryological mechanisms. Brown and Emery (1958) provided a fragmentary description of diplosporous megasporogenesis in a *T. dactyloides* clone, while de Wet et al. (1973) reported apospory in maize \times *T. dactyloides* hybrids. Diplospory in *Tripsacum* was clearly

documented by Burson et al. (1990) using sectioned and stained ovaries from two triploid and one tetraploid *T. dactyloides* accessions from the United States. Diplosporic megasporogenesis in their materials was of the Antennaria type characterized by total meiosis abortion and direct development of the megasporocyte into megagametophyte through mitoses (Nogler, 1984).

The *Tripsacum* germplasm analyzed to date (reviewed above) represents a narrow sampling of the total genetic diversity in this genus. The lack of more thorough investigations may in part be due to 1) the absence of extensive collections especially for Mexican accessions and 2) difficulties in cytologically studying diplospory in very young sectioned ovules (Bashaw, 1980; Hanna, 1991). However, optical clearing techniques to observe megasporogenesis cytologically in entire pistils have recently been developed (Crane and Carman, 1987). Furthermore, an abnormal absence or severe reduction of callose within the cell walls of megasporocytes is tightly correlated with diplospory in *Elymus rectisetus* (Nees in Lehm.) Löve et Connor (Carman, Crane, and Riera-Lizarazu, 1991), and techniques to observe this abnormality in optically cleared ovaries have been developed (Peel, 1993). These techniques greatly increase the ease with which cytological observations of diplospory are made, especially with species that do not produce extremely large seeds. In the present study, we used these techniques to characterize cytologically both apomictic and sexual megasporogenesis and megagametogenesis in a geographically diverse sampling of *Tripsacum*.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials—Accessions examined in this study were obtained from 1) the CIMMYT collection (eight of 80 accessions), which was assembled by Randolph and Gutiérrez in the 1970s; 2) a collection of Central and South

¹ Manuscript received 2 February 1994; revision accepted 5 July 1994.

The authors thank Dr. D. H. Timothy, North Carolina State University, for kindly providing *Tripsacum* accessions from Central and South America. This study was supported in part by ORSTOM, as part of the International Network for Apomixis Research (APONET) and CIMMYT, a centers of excellence grant to JGC from the State of Utah, and by the Agricultural Experiment Station, Logan, Utah.

⁴ Author for correspondence.

⁵ Current address: Agronomy and Plant Genetics Department, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108.

TABLE 1. *Tripsacum* germplasm analyzed.

Species	Accession number ^a	2n ^b	Origin ^c
<i>T. bravum</i>	6-552	72	Rancho Nuevo, Guerrero, Mexico
	10-597	72	Zuluapan, Mexico, Mexico
	39-1583, 38-1627	72	Tequila, Jalisco, Mexico
<i>T. dactyloides dactyloides</i>	57-632	36	Valle de Bravo, Mexico, Mexico
	65-1234*	72	Everglades, Florida, USA
<i>T. dactyloides mexicanum</i>	39-1614, 39-1617	72	Tequila, Jalisco, Mexico
	52-497	72	Acahuizotla, Guerrero, Mexico
<i>T. dactyloides hispidum</i>	15-53	108	Juchatengo, Oaxaca, Mexico
	16-63	72	Juchatengo, Oaxaca, Mexico
	55-607	72	Santo Tomas, Mexico, Mexico
	152-2357	36	Pozo Largo, Guerrero, Mexico
	154-2426	36	El Peral, Guerrero, Mexico
	7122-6*	72	Mazatlan, Sinaloa, Mexico
	7130-5*	72	Amacuzac, Jalisco, Mexico
<i>T. dactyloides meridionale</i>	579-5145**	36	Las Cuevas, Trujillo, Venezuela
	590-5177**	36	Quebrada La Calderera, Santander Norte, Colombia
<i>T. intermedium</i>	100-1130	72	La Trinitaria, Chiapas, Mexico
	104-1183	90	Ixtapa, Chiapas, Mexico
	150-2331	54	Agua de Obispo, Guerrero, Mexico
	7158-1*	72	El Sumidero, Chiapas, Mexico
	7160-6*	72	—, Chiapas, Mexico
<i>T. pilosum</i>	20-94	72	Chicahutla, Oaxaca, Mexico
	34-246	72	21 de Noviembre, Jalisco, Mexico
	39-1586, 39-1653	36	Tequila, Jalisco, Mexico
	47-419	36	Independencia, Jalisco, Mexico
<i>T. maizar</i>	29-183	72	El Tigre, Jalisco, Mexico
	7149-1*	54	La Herradural, Nayarit, Mexico
MZ-PL ^d	28-163	72	Puerto Los Mazos, Jalisco, Mexico
<i>T. zopilotense</i>	49-1382, 50-1410, 51-470	36	Zopilote Cañon, Guerrero, Mexico
	49-439, 7002-1*	72	Zopilote Cañon, Guerrero, Mexico
	49-1395	54	Zopilote Cañon, Guerrero, Mexico
<i>T. lanceolatum</i>	60-664	72	Ahuacatlan, Querertaro, Mexico
	72-815*	72	Sycamore Cañon, Arizona, USA
<i>T. latifolium</i>	77-1011	36	San Mateo Yetla, Oaxaca, Mexico
<i>T. cundinamarse</i>	613-5245**	36	Tamarindo, Viota, Colombia

* * Accessions from the CIMMYT collection; ** accessions from Dr. D. H. Timothy collection; others from the ORSTOM-CIMMYT collection.
^b Chromosome numbers were counted from root tip squashes.
^c Origin: locality, state, country.
^d Intermediate form between *T. maizar* and *T. pilosum*.

American accessions (three of 117 accessions); and 3) the ORSTOM-CIMMYT collection (30 of 1,481 accessions from 156 populations), which was recently collected from Mexico. These collections are maintained at the CIMMYT Experimental Station at Tlaltizapan, Morelos State, Mexico. The accessions analyzed in the present study were chosen according to species, origin, and chromosome number (Table 1), and most species and all ploidy levels (2n = 36, 54, 72, 90, and 108) found in wild populations (Farquharson, 1955; Berthaud and Savidan, 1989) are represented. A total of 1,317 pistils was analyzed; 944 from polyploids and the rest from diploids.

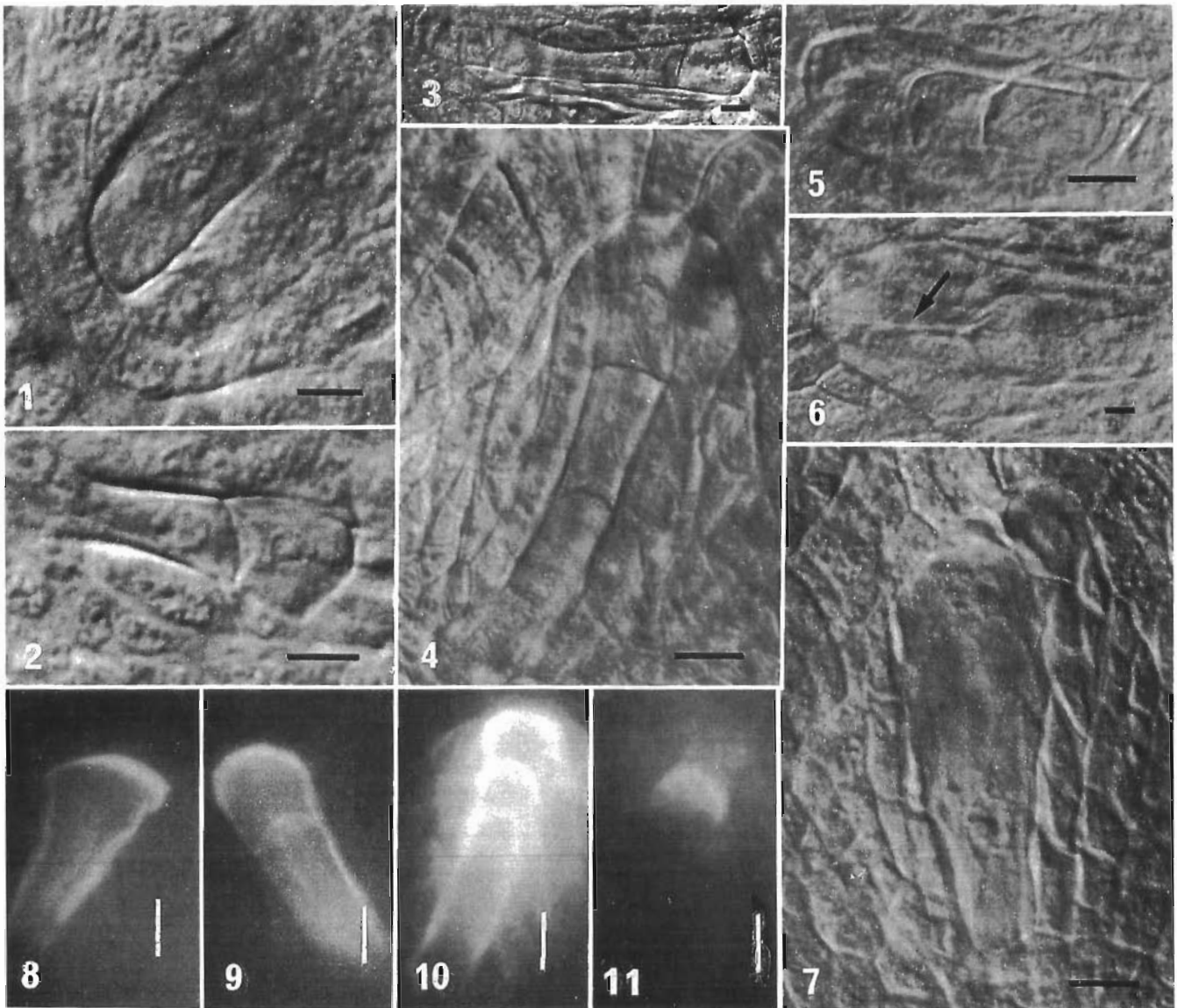
Clearing procedures—Young inflorescences were fixed in Carnoy's 6:3:1 (v:v:v) 95% ethanol : chloroform : acetic acid for 24 hr and stored in 70% ethanol at 4 C. After dissection, pistils were stored either in 70% ethanol or directly cleared according to Crane and Carman (1987), except that the final clearing solution was adjusted to 2.1:1 benzyl benzoate : dibutyl phthalate. Pistils were mounted on a slide in sagittal section between two doubled #1 coverslips. Air spaces were filled with clearing solution and a third coverslip applied. Observations were made

with differential interference-contrast optics (Leitz Aristoplan equipped with a universal condenser UKO or Olympus BH-2 equipped with a Nomarski condenser).

Callose analysis—Pistils stored in 70% ethanol were hydrated using standard procedures and successively transferred to one-third, two-thirds, and full strength clearing solution (136 μM aniline blue, 2.46 M sucrose, pH adjusted to 9.5 with 1 M sodium bicarbonate). Pistils were kept in each clearing series solution for at least 30 min and were mounted as above. Observations were made by UV vertical epifluorescence microscopy (Leitz Aristoplan, BP 355-425 exciter filter, RKP 455 dichroic mirror, LP 460 barrier filter; or Olympus BH-2, UG-1 exciter filter, Y-455 dichroic mirror, L-435 barrier filter).

RESULTS

All diploid accessions (2n = 36, Table 1) were sexual. The megasporocytes in these accessions arose by direct enlargement of a hypodermal archesporial cell. Young sexual megasporocytes were frequently free of vacuoles or poorly vacuolate, were rectangular in shape, and had



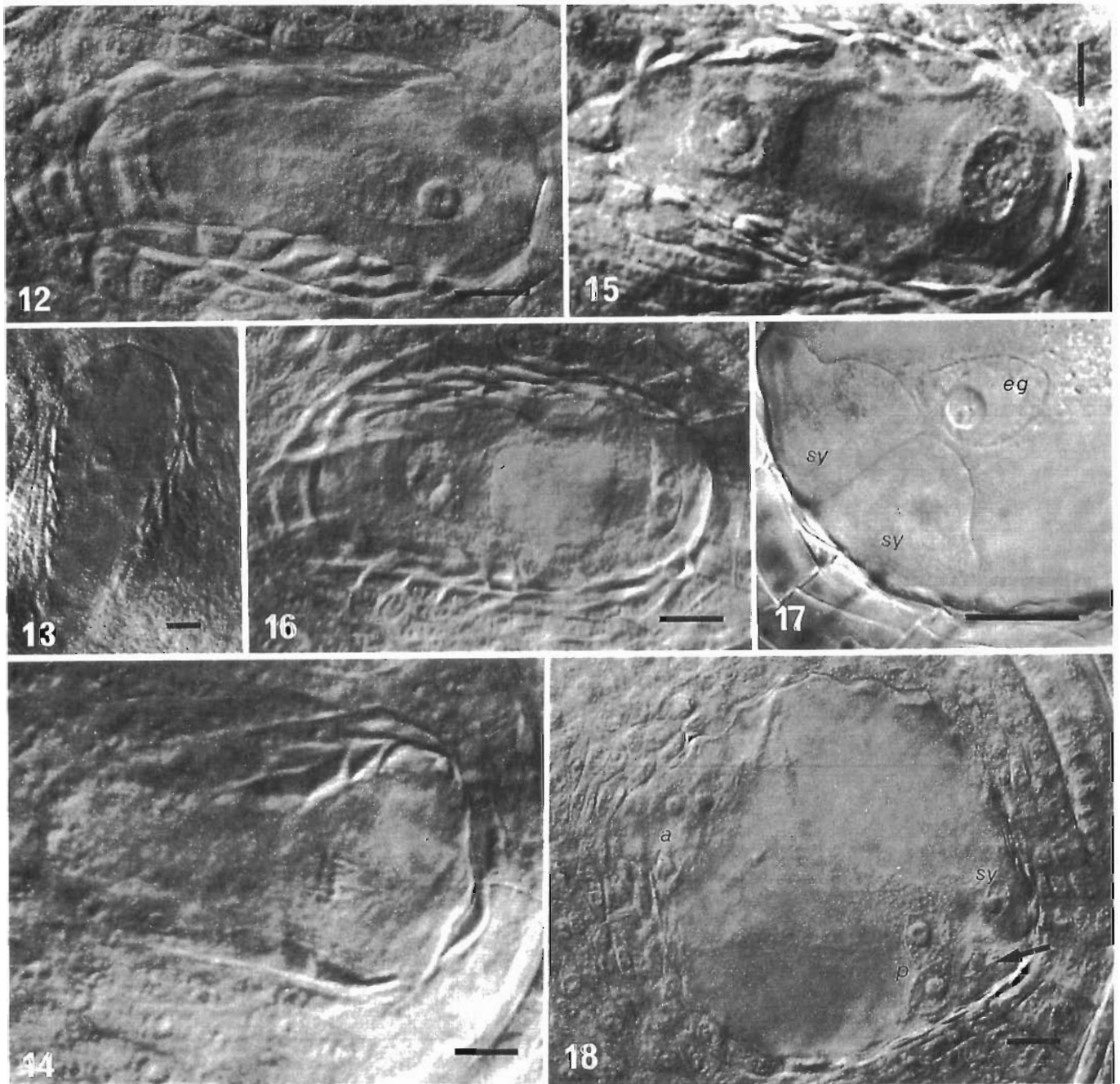
Figs. 1–11. Sexual development (Figs. 1–7) and callose deposition during meiosis observed under UV illumination (Figs. 8–11) in *Tripsacum*. 1. Meiotic megasporocyte surrounded by callose. Note prominent cell walls and abundant callose deposition at the micropylar end (see also Fig. 8). 2, 3. Dyads surrounded by callose. Note elongated chalazal megaspore in Fig. 3. 4. Linear tetrad of megaspores surrounded by callose. 5. T-tetrad of megaspores. 6. Remaining chalazal megaspore after tetrad degeneration. The arrow points to the remnants of the three degenerated micropylar megaspores. 7. Young binucleate embryo sac. 8. Megasporocyte. Note absence of callose at the chalazal end. 9. Dyad. 10. Linear tetrad. 11. Micropylar callose cap in a tetrad: callose is restricted to the micropylar wall of the micropylar megaspore, indicating termination of callose degradation. The three micropylar megaspores will soon degenerate. Bars = 50 μ m.

thick cell walls especially at the micropylar end (Fig. 1). Prophase nuclei were dense, centrally located in the micropylar region of the megasporocytes, and exhibited one single nucleolus.

Metaphase I occurred when the enlarging integuments had encased about 50% of the nucellus. Dyads with two square to rectangular megaspores were common (Fig. 2). However, dyads with an elongated chalazal megaspore were occasionally observed (Fig. 3). The dyad stage was short-lived. Meiosis yielded both linear and T-tetrads (Figs. 4, 5), but the linear type was more common (80% of the tetrads observed). The three micropylar members of each tetrad degenerated (Fig. 6) while the chalazal mem-

ber developed into a binucleate megagametophyte, which at first was elongate, slightly vacuolate, and had almost spherical nuclei (Fig. 7). Megasporocytes, dyads, and tetrads had thick cell walls that fluoresced brightly when stained for callose (Figs. 8–10). Callose was degraded rapidly from the chalazal megaspore but more gradually from the three micropylar members. The residual tissues of degenerate megaspores, which were compressed against the micropyle, retained callose fluorescence during the early stages of megagametophyte development (Fig. 11).

The integuments expanded during meiosis to encase about 75% of the nucellus, which left three to six epidermal nucellar cells exposed at the end of meiosis. Mature Po-

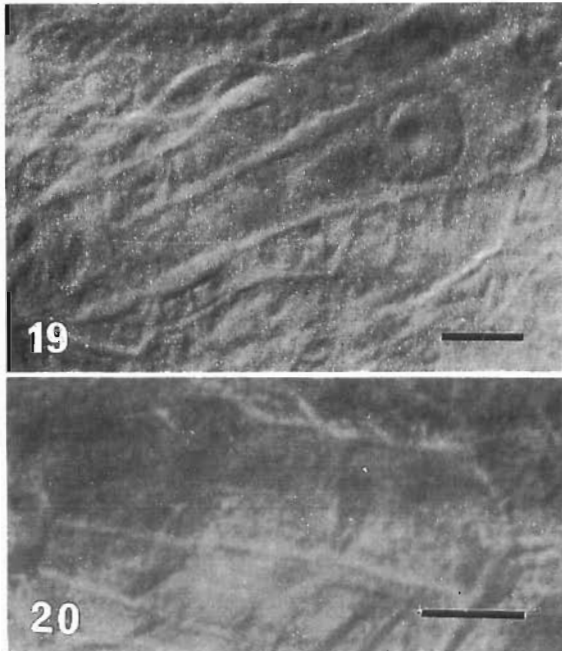


Figs. 12–18. Apomictic development in *Tripsacum*: Antennaria type of diplospory. 12, 13. Diplosporous megasporocytes. 14. Metaphase of the first mitotic division. 15, 16. Vacuolate binucleate embryo sacs with compressed nuclei. 17, 18. Eight-nucleate embryo sacs. Note detail of the micropylar apparatus in Fig. 17. eg = egg cell nucleus, sy = synergids, arrow = egg cell, p = polar nuclei, a = antipodal cells. Bars = 20 μ m.

lygonum type megagametophytes developed through vacuolation, and three mitotic divisions followed by cytokinesis. One exception to the sexual pathway was observed in one pistil of the diploid accession 579-5145 (*T. dactyloides meridionale*): a large slightly tear-shaped megasporocyte was observed that had thin cell walls. However, its nucleus was diffuse and the entire megasporocyte may have been degenerating.

All polyploid *Tripsacum* accessions were diplosporic with megasporogenesis being primarily of the Antennaria

type. No evidence of polyembryony or apospory was observed. Within each ovary, a single diplosporic megasporocyte usually formed from a hypodermal nucellar cell as occurred in sexual accessions, but some of them were positioned chalazal to that typical of sexual megasporocytes. Young diplosporic megasporocytes had thin cell walls that lacked callose fluorescence, were elongated, swollen at the micropyle, and generally lacked vacuoles. Each megasporocyte contained relatively small nucleus located in the central rather than in the micropylar region,



Figs. 19, 20. Reproductive behavior other than sexuality and Antennaria type diplospory. 19. Elongated tear-shaped megasporocyte in accession 7122-6. 20. Unreduced dyad in accession 39-1583. Typical of *Taraxacum*-type diplospory. Bars = 50 µm.

and had a single nucleolus. They became vacuolate and enlarged as the integuments closed in upon the micropyle. By the first mitotic division, the micropylar regions were extremely dilated, whereas the chalazal regions generally remained narrow (Figs. 12, 13) producing a club-shaped megasporocyte. The large nuclei often assumed a spherical or bean shape.

The first mitotic division was perpendicular to the long axis of the megasporocyte (Fig. 14). The two nuclei of the resulting megagametophyte migrated and became separated by a large, central vacuole (Figs. 15, 16). They were often found compressed by vacuoles into half moon (micropylar end) or angular (chalazal end) shapes (Fig. 16). Two nucleoli per nucleus were common at this stage, particularly on the micropylar side. Two or more additional mitotic divisions followed by cytokinesis produce mature diplosporic *Polygonum* type megagametophytes, each one containing one egg cell and two synergids on the micropylar end, two polar nuclei closer to micropylar than the chalazal end, and three or more antipodals at the chalazal end (Figs. 17, 18).

A few exceptions to Antennaria type megasporocytes were encountered. Elongated nondilated tear-shaped megasporocytes, as described by Burson et al. (1990), were only rarely observed (Table 2). Each contained a few small micropylar and central vacuoles and a slightly elongated nucleus located near the micropylar end (Fig. 19). One or two dense nucleoli per nucleus were observed, which suggests that these cells were not degenerative. Extremely elongated nuclei, such as occurs in diplosporous *E. rectisetus*, which produces unreduced dyads (Crane and Carman, 1987), were not observed.

The *Taraxacum* type of diplospory (the megagameto-

TABLE 2. Reproductive forms other than Antennaria type diplospory among apomictic *Tripsacum*.

Apomictic accessions	N ^a	Sexual development ^b	<i>Taraxacum</i> type of diplospory	Elongated tear-shaped megasporocytes
29-183	24	2	—	—
34-246	25	—	—	2
39-1583	41	—	8	4
39-1614	37	1	—	—
39-1617	41	3	—	—
49-439	32	1	3	—
55-607	33	2	—	—
65-1234	21	—	2	—
100-1130	27	1	—	—
7002-1	56	4	—	—
7122-6	62	4	11	3
7130-5	45	—	—	1
7149-1	47	—	—	1
7160-6	34	2	—	—
Others	419	—	—	—
Total	944	20	24	11
%	—	2.10	2.55	1.15

^a N, total number observed.

^b Sexual stages observed were dyads and tetrads. Callose fluorescence was checked by UV fluorescence in 39-1617, 7160-6, 29-183, and 7122-6.

phyte forms from the chalazal unreduced megaspore of an unreduced dyad that results from meiotic restitution at metaphase I of the first meiotic division; Nogler, 1984) infrequently occurred in a few accessions (Table 2). Dyads (Fig. 20) but never tetrads were observed. These generally formed at an earlier stage than in sexual meiocytes. Their cell walls were thin, and callose fluorescence was not observed. Also, their shape differed from that of meiotic dyads, which were square to rectangular. The putative *Taraxacum* type dyads had square micropylar members but triangular chalazal members (the chalazal side being narrower). Nuclei in these dyads were larger than in meiotic dyads, and each possessed a dense nucleolus.

Meiotic dyads and tetrads were observed among the diplosporous accessions at an average frequency of 2.1% (Table 2). Concomitant development of nucellar cells into embryo sacs (apospory) was not observed, which indicates that these dyads and tetrads were sexual and that apomixis is facultative at least in some of the *Tripsacum* accessions we surveyed.

DISCUSSION

Apomixis in *Tripsacum*—As in other agamic complexes (de Wet and Harlan, 1970; Savidan and Pernès, 1982), apomixis in *Tripsacum* is restricted to polyploids. *Tripsacum* polyploids are highly heterozygous (J. Berthaud, ORSTOM-CIMMYT, Mexico, unpublished data), and the low levels of sexuality within them (Table 2) should permit genetic exchange with diploids and other polyploids. New genotypes may also arise through fertilization of unreduced gametes (Harlan and de Wet, 1975; Bashaw, Hussey, and Hignight, 1992). Thus, facultative apomixis in *Tripsacum* is not viewed as the blind alley of evolution envisioned by Darlington (1939). In contrast, numerous intermediate forms and extensive natural diversity exist (J. Berthaud, unpublished data).

Diplospory was the only form of apomixis observed in the 41 *Tripsacum* accessions we analyzed. In most cases, diplosporic megasporocytes were of the Antennaria type. Taraxacum type megasporocytes were only rarely observed and were restricted to three accessions that produced primarily Antennaria type megasporocytes. These two types of diplospory are believed to be similar, and the shift from one form to the other may be influenced by environment (Gustafsson, 1947; Nogler, 1984).

The Antennaria type of diplospory in our *Tripsacum* materials was characterized by 1) enlargement of the megasporocyte through vacuolation, 2) total meiotic failure, and 3) direct development of the meiocyte into megagametophyte through mitoses. In these respects it closely resembles diplospory in the warm season grass *Eragrostis curvula* Schrad. (Voigt and Bashaw, 1972). In contrast, Burson et al. (1990) described elongated and tear-shaped megasporocytes in two triploid (1249-Santa Claus, IN, and 1459-La Grange, TX) and one tetraploid (1008-Baird, TX) *T. dactyloides* accession. Such elongated megasporocytes and nuclei are frequently observed in *Chondrilla juncea* (Bergman, 1950) and *E. rectisetus* (Crane and Carman, 1987), which commonly undergo meiotic restitution to produce unreduced dyads (Taraxacum type of diplospory). Elongated meiocytes were rarely observed in our study (34-246, 39-1583, 7122-6, 7130-5 and 7149-1, Table 2), and these were associated with the formation of unreduced dyads in two cases (39-1583 and 7122-6, Table 2).

Cytological peculiarities of diplospory—A major characteristic of diplospory is abortion or total absence of meiosis. In *Tripsacum*, diplosporic megasporocytes of the Antennaria type enlarge to more than double the size of sexual megasporocytes. They do not exhibit any typical meiocytic behavior and once vacuolation starts, development is clearly along gametophytic rather than meiotic. Distinction between megasporocyte and megagametophyte therefore is blurred, the megasporocyte functioning as an unreduced megaspore. Judging from integument growth, which varies greatly among pistils, the first megagametophyte mitosis occurs at about the same time as the end of meiosis in sexual megasporocytes. Young sexual binucleate megagametophytes are not strongly vacuolate at this stage, and their nuclei are spherical. In contrast, large vacuoles in diplosporic binucleate megagametophytes compress the nuclei into flattened shapes against the cell wall (Fig. 16).

In the present study, total absence of callose fluorescence in and around the walls of female megasporocytes distinguished diplosporic from sexual developments. Callose is typically synthesized in meiocyte cell walls of angiosperms that produce sexual monosporic or bisporic megagametophytes, and is degraded rapidly following meiosis (Rodkiewicz, 1970). Absence of callose in megasporocyte cell walls during megasporogenesis is also observed in diplosporic *E. rectisetus* (Carman, Crane, and Riera-Lizarazu, 1991), *E. curvula* (Peel, 1993), and *Poa nemoralis* L. (Naumova, den Nijs, and Willemse, 1993). In diplosporic *E. rectisetus*, unusual patterns of callose deposition in ovular tissues were infrequently observed and included deposits in the micropylar wall of megasporocyte and sporadically in nucellar cell walls. Such de-

posits were not observed in sexual meiocytes; thus they might represent a more general lesion in cell wall synthesis (Carman, Crane, and Riera-Lizarazu, 1991).

Developmental differences between diplospory and apospory—Meiosis often occurs successfully in aposporous apomicts, and both aposporic megagametophytes (from nucellar cells) and a sexual megagametophyte (from the surviving megaspore) may form within the same ovary (Nogler, 1984). The surviving sexual megaspore often is eliminated after meiosis, which suggests, as noted by Harlan et al. (1964), that the genetic lesions responsible for apospory do not affect meiosis. Furthermore, normal levels of callose deposition in female meiocytes (Peel, 1993; Naumova, den Nijs, and Willemse, 1993) have been observed in aposporous species. In contrast, diplospory appears to be caused by a different set of genetic lesions that prevent callose deposition and grossly alter meiosis. Expression of such lesions varies among the diplosporous materials we analyzed, which permits residual sexuality (up to 8%) within the polyploid genetic pool.

Absence of megasporocyte callose may be responsible for meiotic failure in diplosporic species (Carman, Crane, and Riera-Lizarazu, 1991). However, absence of callose in megasporocytes of angiosperms that produce tetrasporic megasporocytes does not interfere with meiosis, and normal meiotic divisions occur in the absence of callose deposition (Rodkiewicz, 1970). Heslop-Harrison and Mackenzie (1967) assumed that during microsporangogenesis callose acts as a molecular barrier for RNAs and proteins, avoiding their incorporation in meiocytes and allowing the insulation of the differentiating meiocytes from the maternal tissues. The relationship, if any, between meiosis and megasporocyte isolation by callose requires further investigation.

LITERATURE CITED

- BASHAW, E. C. 1980. Apomixis and its implications in crop improvement. In W. R. Fehr and H. H. Hadley [eds.], *Hybridization of crop plants*, 45–63. American Society of Agronomy, Madison, WI.
- , M. A. HUSSEY, AND K. W. HIGNIGHT. 1992. Hybridization ($N + N$ and $2N + N$) of facultative apomictic species in the *Pennisetum* complex. *International Journal of Plant Science* 153: 466–470.
- BERGMAN, B. 1950. Meiosis in two different clones of the apomictic *Chondrilla juncea*. *Hereditas* 36: 297–320.
- BERTHAUD, J., AND Y. SAVIDAN. 1989. Genetic resources of *Tripsacum* and gene transfer to maize. In A. Mujeeb-Kazi and L. A. Sitch [eds.], *Review of advances in plant biotechnology, 1985–1988*, 121–130. 2d International Symposium on Genetic Manipulation in Crops. Mexico D. F., Mexico, and Manila, Philippines: CIMMYT and IRRI.
- BROWN, W. V., AND W. H. P. EMERY. 1958. Apomixis in the Gramineae: Panicoideae. *American Journal of Botany* 45: 253–263.
- BURSON, B. L., P. W. VOIGT, R. A. SHERMAN, AND C. L. DEWALD. 1990. Apomixis and sexuality in Eastern Gamagrass. *Crop Science* 30: 86–89.
- CARMAN, J. G., C. CRANE, AND O. RIERA-LIZARAZU. 1991. Comparative histology of cell walls during meiotic and apomeiotic megasporogenesis in two hexaploid Australasian *Elymus* species. *Crop Science* 31: 1527–1532.
- CRANE, C. F., AND J. G. CARMAN. 1987. Mechanisms of apomixis in *Elymus rectisetus* from eastern Australia and New Zealand. *American Journal of Botany* 74: 477–496.
- DARLINGTON, C. D. 1939. *The evolution of genetic systems*. Cambridge University Press, Cambridge.

- DE WET, J. M. J., J. R. GRAY, AND J. R. HARLAN. 1976. Systematics of *Tripsacum*. *Phytologia* 33: 203–227.
- , AND J. R. HARLAN. 1970. Apomixis, polyploidy, and speciation in *Dichanthium*. *Evolution* 24: 270–277.
- , ———, L. M. ENGLE, AND C. A. GRANT. 1973. Breeding behaviour of maize-*Tripsacum* hybrids. *Crop Science* 13: 254–256.
- , D. H. TIMOTHY, K. W. HILU, AND G. B. FLETCHER. 1981. Systematics of South American *Tripsacum* (Gramineae). *American Journal of Botany* 68: 269–276.
- FARQUHARSON, L. I. 1955. Apomixis and polyembryony in *Tripsacum dactyloides*. *American Journal of Botany* 42: 737–743.
- GUSTAFSSON, Å. 1947. Apomixis in higher plants. Part III. Biotype and species formation. *Lunds Universitets Årsskrift Nova Series* 43: 183–370.
- HANNA, W. W. 1991. Apomixis in crop plants—cytogenetic basis and role in plant breeding. In P. K. Gupta and T. Tsuchiya [eds.], *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*, Part A, 229–242. Elsevier, Amsterdam.
- HARLAN, J. R., M. H. BROOKS, D. S. BORGAONKAR, AND J. M. J. DE WET. 1964. Nature and inheritance of apomixis in *Bothriochloa* and *Dichanthium*. *Botanical Gazette* 125: 41–46.
- , AND J. M. J. DE WET. 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon* 20: 509–517.
- , AND ———. 1975. On O. Wing and a prayer: the origin of polyploidy. *Botanical Review* 41: 361–390.
- HESLOP-HARRISON, J., AND A. MACKENZIE. 1967. Autoradiography of soluble ($2\text{-}^{14}\text{C}$)-thymidine derivatives during meiosis and microsporogenesis in *Lilium* anthers. *Journal of Cell Science* 2: 387–400.
- NAUMOVA, T., A. P. M. DEN NIJS, AND M. T. M. WILLEMSE. 1993. Quantitative analysis of aposporous parthenogenesis in *Poa pratensis* genotypes. *Acta Botanica Neerlandica* 42: 299–312.
- NOGLER, G. A. 1984. Gametophytic apomixis. In B. M. John [ed.], *Embryology of angiosperms*, 475–518. Springer-Verlag, Berlin.
- PEEL, M. 1993. Meicyte callose in aposporic and diplosporic grasses and in hybrids between bread wheat and *Elymus rectisetus*. M.S. thesis, Utah State University, Logan, UT.
- RANDOLPH, L. F. 1970. Variation among *Tripsacum* populations of Mexico and Guatemala. *Brittonia* 22: 305–337.
- RODKIEWICZ, B. 1970. Callose in cell walls during megasporogenesis in angiosperms. *Planta* 93: 39–47.
- SAVIDAN, Y., AND J. PERNÈS. 1982. Diploid-tetraploid-dihaploid cycles and the evolution of *Panicum maximum* Jacq. *Evolution* 36: 596–600.
- VOIGT, P. W., AND E. C. BASHAW. 1972. Apomixis and sexuality in *Eragrostis curvula*. *Crop Science* 12: 843–847.

ANNEXE III-2

TIMING OF MEGASPOROGENESIS IN *TRIPSACUM* SPECIES (POACEAE) AS RELATED TO THE CONTROL OF APOMIXIS AND SEXUALITY

OLIVIER LEBLANC AND YVES SAVIDAN

Abstract: In several pseudogamous aposporous species (*Panicum maximum*, *Ranunculus auricomus*, *Paspalum notatum*), different megasporogenesis time courses in sexuals and aposporous have been reported, making that apomeiosis yields mature female gametophytes more precociously than meiotic development. A main consequence of such difference in the production of mature female gametophyte might be the lost of receptivity of the unreduced egg cell by the time the pollen tube reaches the female gametophyte. In two pseudogamous diplosporous species, *Tripsacum dactyloides* and *Tripsacum zopilotense*, cytoembryological observations showed that meiosis is also delayed when compared to diplospory. Precocious embryony – embryo starts to divide before anthesis – is an effective system to prevent egg cell fertilization that do not occur in all the pseudogamous apomicts. The timing difference in sexual and apomictic developments has been observed across apomicts of different origin and nature, which do not show precocious embryony. Thus it appears to be a fundamental component of apomixis as a cause of the egg cell receptivity lost, making that egg cell fertilization is no longer possible while fusion of one sperm cell and the two polar nuclei still takes place.

Key words: apomixis, diplospory, meiosis, parthenogenesis, fertilization failure

Olivier Leblanc and Yves Savidan, The French Scientific Research Institute for Development through Cooperation (ORSTOM) and the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Tripsacum Program, Apartado Postal 6-641, 06600 México D. F., Mexico

INTRODUCTION

Gametophytic apomixis differs from sexuality by two basic events, apomeiosis (failure of both chromosome reduction and recombination) and parthenogenesis (embryo development without fertilization). Apomeiosis can be achieved through 1) diplospory when meiosis fails or aborts, or 2) apospory when, beside the legitimate sexual cell line, one or few somatic nucellar cells develop into unreduced female gametophytes. In the second step, the egg cell of the unreduced megagametophyte develops into the embryo parthenogenetically, but polar nuclei fertilization is generally required for seed development (pseudogamy). Studies of the mode of inheritance of apospory in

Bothriochloa-Dichanthium (HARLAN *et al.* 1964), *Panicum maximum* Jacq. (SAVIDAN 1982a, 1983), *Ranunculus auricomus* L. (NOGLER 1984a), *Cenchrus ciliaris* L. (SHERWOOD *et al.* 1994), and the *Brachiaria decumbens* complex (DO VALLE *et al.* 1994) have revealed that apospory is controlled by one dominant gene. A few older reports claimed a two-gene control for aposporous apomixis, but interpretations were controversial either because of the origin of the sexual material or mostly because of the relative unreliability of the screening tools used. On the other hand, though MOGIE (1988) showed that the gene(s) controlling diplospory in *Taraxacum* Wigg. are located on one

Table 1. Number of pistils analyzed per pistil class after bulking by species and reproductive nature.

Class #	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
intervals (mm)	< 0.50	[0.50;0.75]	[0.75;1.00]	[1.00;1.25]	[1.25;1.50]	[1.50;1.75]	[1.75;2.00]	[2.00;2.25]	[2.25;2.50]	> 2.50
Diploid bulks*										
<i>T. zopilotense</i>	12	15	18	22	37	36	24	24	23	27
<i>T. dactyloides</i>	6	13	17	25	33	35	23	30	28	35
Tetraploid bulks*										
<i>T. zopilotense</i>	11	17	15	26	29	35	33	21	22	21
<i>T. dactyloides</i>	13	19	30	41	66	72	52	40	23	26

* All accessions are from the ORSTOM-CIMMYT collection established at Tlaltizapán, Morelos State, Mexico. *T. zopilotense* bulks: 49-431, 49-1382, 49-1388, 51-470 (diploids); 49-439, 49-2292, 7002-1 (tetraploids). *T. dactyloides* bulks: 152-2357 and 154-2426 (diploids); 1-480, 9-569, 16-59 (tetraploids).

chromosome, no credible genetic analysis regarding the control of diplospory has been conducted.

According to NOGLER (1984b), apomeiotic hybrids that lacked parthenogenetic capacity were rarely encountered in *Parthenium argentatum* A. Gray, *Potentilla argentea* L. or *Ranunculus auricomus*. Linkage between the gene(s) controlling apomeiosis and parthenogenesis seems to be strong, given that in most apomicts the presence of the gene(s) responsible for apomeiosis generally results in maternal progenies. Therefore, as SAVIDAN (1982a) postulated, the main components of apomixis, apomeiosis and parthenogenesis, may be viewed as a dominant 'supergene' resulting from a strong genetic linkage.

Observing the timing difference in the formation of mature female gametophytes in aposporous vs sexual *Panicum maximum* accessions, SAVIDAN (1982a, 1989) proposed a second hypothesis for the control of parthenogenesis, saying that it might result basically from aposporous no-reduction. This 'egg cell wall completion' hypothesis, as it is called, holds that, as a consequence of the precocious development of unreduced female gametophytes compared with reduced ones, the egg cell may not be receptive by the time the pollen reaches the ovule, causing the failure of fertilization. Recent ultrastructural observations in aposporous *Cenchrus ciliaris* (JEAN-PHILIPPE VIELLE, University of Texas A & M, personal communication) indeed suggest the presence of a complete cell wall around the egg cell that may act as a mechanical barrier by the time of pollen tube discharge. According to MOGENSEN and NAUMOVA (personal communications), the development of such a wall may be independent of pollen tube growth. However, in the parthenogenetic *hap* barley mutant, male and female gametes remain side-by-side without any apparent cell wall to block fertilization (MOGENSEN 1982), suggesting either a chemical barrier or a specific time window of receptivity.

Developmental timing differences such as that found in *Panicum maximum* have been reported in a few other aposporous materials, such as *Ranunculus auricomus* (NOGLER 1984a) or *Paspalum notatum* Fluegge (MARTÍNEZ *et al.* 1994). Ana-

lysis of megasporogenesis and megagametogenesis in several *Tripsacum* species (LEBLANC *et al.* 1995), have shown that, regardless of species, diplospory occurs in polyploid types whereas diploids are sexual. While working on this study, we observed a difference in timing between the two reproductive pathways which closely mimicked that reported by Savidan in aposporous and sexual *Panicum maximum*. This preliminary observation led us to a more detailed cytoembryological analysis of *Tripsacum dactyloides* (L.) L. and *Tripsacum zopilotense* Hernández Xolocot & Randolph, which data are reported here.

MATERIALS AND METHODS

In contrast with apospory, where sexual and apomeiotic developments can occur concomitantly as unreduced female gametophyte(s) are initiated from somatic nucellar cells, meiosis is omitted or aborted in diplosporous types of apomixis. Diplospory in *Tripsacum* is primarily of the *Antennaria*-type, and mature *Polygonum*-type unreduced megagametophytes are directly produced through three or more mitoses after significant megasporocyte enlargement (LEBLANC *et al.* 1995). Such reproductive mechanisms make it impossible to compare sexual and diplosporous developments in a single ovule. The comparison cannot be done in single plants either, because of the low rate of residual sexuality in diplosporous *Tripsacum* accessions (LEBLANC *et al.* 1995). Finally, given that *Tripsacum* spp. are monoecious grasses, ovules cannot be classified by pollen

stage. Faced with these constraints, we chose to use interference contrast microscopy (CRANE & CARMAN 1987) to determine developmental stages in sexual and diplosporous ovules, after sorting pistil length by size. To limit the expression of species' peculiarities and because ploidy level and mode of reproduction are closely related in *Tripsacum* spp., pistils were collected from sexual diploid (2n = 36) and diplosporous tetraploid (2n = 72) accessions from *T. zopilotense* and *T. dactyloides*. Ten classes were defined (0.25 mm intervals), and bulks for each of the two species were made by mixing pistils of the same reproductive nature and from the same class (Table 1). In addition, one apomictic *T. dactyloides* triploid accession (2n = 54) was also analyzed, but not bulked. Stages of development in sexual and diplosporous bulks were then recorded, using the same definitions as LEBLANC *et al.* (1995) in their survey of reproductive mode in *Tripsacum*. In this system, both sexual reproduction and diplospory are divided in key steps from megasporogenesis initiation to the end of megagametogenesis (mature female gametophyte production; Table 2). Given that callose deposition has been associated with sexual megasporogenesis but is absent during diplospory (CARMAN *et al.* 1991; LEBLANC *et al.* 1995), we used this characteristic to distinguish between reproductive modes, especially in young megasporocytes.

RESULTS

Although we noted a few differences, such as the generation of meiotic products during apomictic development, reproductive features in the two

Table 2. Cytoembryological stages used to study megasporogenesis and megagametogenesis (based on LEBLANC *et al.* 1995) MS: megasporocyte, FG: female gametophyte

SEXUAL REPRODUCTION	DIPLOSPORY
No nucellar activity	
Young initiated MS: no difference between both developments	
Callose deposition in MS cell walls	Callose-free enlarging MS
dy.ad	
tetrad	
Degenerative tetrad- remaining megaspore	
	2n-FG
	4n-FG
	Young 8n-FG (last mitotic division not yet followed by cytokinesis)
	Mature 8n-FG (<i>Polygonum</i> -type)

Table 3. Cytoembryological stages in percentages observed in bulks from diploid *T. dactyloides* (first numbers in columns) and from diploid *T. zopilotense* (second numbers in columns) during megasporogenesis and megagametogenesis. MS: megasporocyte, FG: female gametophyte, Y. 8n-FG: young 8n-FG.

Classes	No nuc. act.	Megasporogenesis					Megagametogenesis		
		Young MS	MS	Dyad	Tetrad	Dg. tetrad	2n-FG	4n-FG	Y 8n-FG
0	71 / 79	29 / 21							
1	27 / 23	73 / 77							
2	16 / 6.5	39 / 25	45 / 68.5						
3		4.5 / -	54 / 44	54.5 / 66					
4			16 / 3	30 / 34	48.5 / 60	5.5 / 3			
5			5.5 / -	11 / 3	41.5 / 33.5	39 / 47	3 / 16.5		
6					21 / 13	62.5 / 45	16.5 / 42		
7					16.5 / -	37.5 / 20	46 / 70	- / 10	
8						8.5 / 3.5	69.5 / 67.5	22 / 29	
9						11 / -	52 / 51.5	29.5 / 37	7.5 / 11.5

Tripsacum species appeared to be very similar in nature and timing (Tables 3 & 4). The *T. dactyloides* triploid accession also showed important developmental similarities with the tetraploids, except that no meiotic event was recorded during megasporogenesis. Megasporogenesis and megagametogenesis time courses during sexual reproduction and diplospory in *T. zopilotense* were compared (data, Tables 3 & 4; Fig. 1).

Differentiation of hypodermal nucellar cells

into megasporocytes occurred in both developments at the same pistil stages (0-1). Just after initiation, sexual and diplosporous megasporocytes behaved similarly when observed using the benzyl benzoate-dibutyl phthalate clearing procedure, and differed from nucellar cells by a slight enlargement, dense nuclei and nucleoli, and granular cytoplasm. However, cytoembryological differences between both developments were readily apparent, and from stage 1 to stage 2 almost half the

Table 4. Cytoembryological stages in percentages observed in bulks from tetraploid *T. dactyloides* (first numbers in columns) and from tetraploid *T. zopilotense* (second numbers in columns) during megasporogenesis and megagametogenesis. MS: megasporocyte; FG: female gametophyte, Y. 8n-FG: young 8n-FG; M. FG: mature 8n-FG.

Classes	No nuc act	Megasporogenesis			Megagametogenesis			
		Young MS	Enl. MS	Nb of meiotic products	2n-FG	4n-FG	Y. 8n-FG	M. 8n-FG
0	37.5 / 30.5	62.5 / 61.5	- / 8					
1	- / 5	90 / 74	10 / 21					
2	- / 6	56 / 76.5	44 / 17.5					
3		20 / 44.5	69 / 37		11 / 18.5			
4		3.5 / 18.5	39 / 50.5	Dyads: 1 / 1	57.5 / 30			
5			18 / 37	Dyads: - / 3, Tetrads: - / 2	60.5 / 56	21.5 / 7		
6			6 / 17.5		48 / 60	39 / 11.5	7 / 2	
7			- / 5	Tetrads: 1 / 1; Deg tetrads: - / 1	10 / 52	45 / 34	30 / 9	- / 15
8					13.5 / 39.5	41 / 33	32 / 13	4.5 / 13.5
9				Deg tetrads: 1 / 1	- / 23	35 / 46	40 / 15.5	25 / 25.5

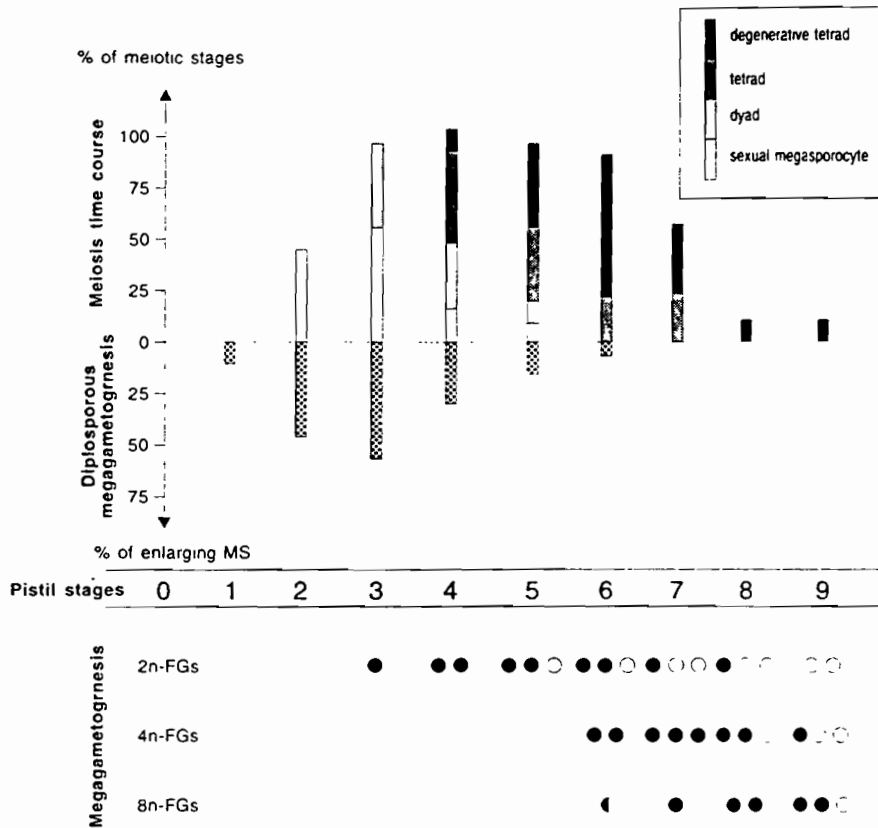


Fig. 1. Relative timing in diplosporous versus sexual development in *T. zapilotense*: meiosis time course and enlarging stage during megasporogenesis, and megagametogenesis. Black and white dots represent diplosporous and sexual materials respectively

megasporocytes exhibited characteristic reproductive features (callose deposition in sexuals or callose-free enlarging megasporocytes in diplosporous). Megasporocyte enlargement during diplosporous development (stage 2 to stage 6) took longer than usual, but still less than meiosis; as more than 50% of the sexual ovules still showed meiotic products (tetrads or degenerative tetrads) during stage 7. Tetrad degeneration and the remaining chalazal megaspore development accounted for nearly half the duration of meiosis, making this step appears to be the most significant factor in meiosis delay. First mitotic divisions in functional megaspores – i.e. the enlarged diplosporous megasporocyte or the remaining chalazal sexual megaspore – thus occurred earlier in di-

plosporous ovules than in sexual ones. These observations, performed using ovules from different plants and suggesting that megagametogenesis initiation is delayed by meiosis, were confirmed by the rare meiotic stages recorded in ovules from diplosporous accessions, all of which occurred within the meiosis time course observed for sexual accessions (Table 4).

Megagametogenesis in *Tripsacum* yields Polygonum-type, mature female gametophytes, regardless of reproductive development, and seems to take the same amount of time in both reproductive modes. Although FARQUHARSON (1955) reported precocious embryony in a tetraploid strain of *T. dactyloides*, precocious development of egg cells into young embryos neither occurred in ma-

ture unreduced female gametophytes reported in this study nor in LEBLANC *et al.*'s previous work (1995), indicating that fertilization of polar nuclei is required for parthenogenetic egg cell development into embryo and for seed production. Completely differentiated female gametophytes appear earlier in diplosporous materials than in sexuals.

DISCUSSION

The results reported here show a strong relationship between a type of reproductive development, i.e. apomixis vs sexuality, and a differential timing in the production of the mature female gametophyte that results from different megasporogenesis time courses. Factors that could cause this difference were not investigated, as the techniques used did not allow such a study, but several remarks may be made in this regard. Unreduced female gametophytes arise through 2 or 3 mitotic divisions (apospory or diplospory of the *Antennaria* type, respectively), whereas their reduced counterparts result from five (2 meiotic and 3 mitotic) divisions. The differing number of cell divisions, combined with time-consuming degeneration of the tetrad into a mitotically-dividing chalazal megaspore, may therefore bring about the meiosis delay we observed. Whatever the cause, the consequence of apomeiosis is the same in diplosporous *Tripsacum* as in aposporous *P. maximum*: mature female gametophytes are produced sooner during apomictic development than during sexual development, resulting in a gap between unreduced egg cell receptivity and the general floral development (i.e. pollen production, stigmata receptivity).

Precocious embryony, where the development of egg cells into embryos precedes anthesis, has been reported in several pseudogamous apomicts, such as *Poa* (TINNEY 1940), *Parthenium* (ESAU 1946), and *Allium tuberosum* Rottl. ex Spreng. (KOJIMA & NAGATO 1992). The obvious consequence of this phenomenon is that, by the time the sperm cells reach the female gametophyte, egg cell fertilization is no longer possible, but endosperm initiation (i.e., fertilization of the polar nu-

clei) still takes place. In our material, as in *P. maximum* and *R. auricomus* (NOGLER 1984a), most embryos start to develop after endosperm initiation. This suggests that the gene(s) involved in the regulation of parthenogenesis is (are) expressed only after the polar nuclei are fertilized. The gap between egg cell receptivity and overall floral development is observed in a wide range of pseudogamous apomicts that do not show precocious embryony (both types of gametophytic apomixis, and in di- and monocotyledonous species), and therefore appears to be a fundamental component of apomixis expression in the species analyzed. Though this gap prevents egg cell fertilization, endosperm development can still be induced for normal seed growth. Whether the failure of fertilization relates to a mechanical barrier, such as a complete egg cell wall, or to a physicochemical window of receptivity of the egg membrane, remains to be determined. However, the importance of the developmental gap that makes the egg cell unreceptive to fertilization has been astutely confirmed in *Paspalum notatum* (MARTÍNEZ *et al.* 1994), where artificial early pollinations resulted in the production of B_{III} seeds ($2n + n$), whereas the same plant produced only apomictic ($2n + 0$) progenies when pollination was natural.

REFERENCES

- CARMAN J. G., CRANE, C. F. & RIERA-LIZARAZU O. 1991 Comparative histology of cell walls during meiotic and apomeiotic megasporogenesis in two hexaploid Australasian *Elymus* species. *Crop Science* 31: 1527-1532
- CRANE, C. F. & CARMAN, J. G. 1988 Mechanisms of apomixis in *Elymus rectus* from Eastern Australia and New Zealand. *American Journal of Botany* 74: 477-496
- ESAU K. 1946. Morphology of reproduction in guayule and certain other species of *Parthenium*. *Hilgardia* 17: 61-101.
- FARQUHARSON, L. I. 1955. Apomixis and polyembryony in *Tripsacum dactyloides*. *American Journal of Botany* 42: 737-743
- HARLAN, J. R., BROOKS, M. H., BORGAONKAR, D. S. & DE WEI, J. M. J. 1964. Nature and inheritance of apomixis in *Bothriochloa* and *Dichanthus*. *Botanical Gazette* 125: 4146
- KOJIMA, A. & NAGATO, Y. 1992. Pseudogamous embryogenesis

- and the degree of parthenogenesis in *Allium tuberosum*. *Sexual Plant Reproduction* 5: 72-78.
- LEBLANC, O., PEEL, M. D., CARMAN, J. G. & SAVIDAN, Y. 1995. Megaspороgenesis and megagametogenesis in several *Tripsacum* species (Poaceae). *American Journal of Botany*, in press.
- MARTÍNEZ, E. J., ESPINOZA, F. & QUARIN, C. L. 1994. Bill progeny ($2n + n$) from apomictic *Paspalum notatum* obtained through early pollination. *The Journal of Heredity* 85: 295-297.
- MOGENSEN, H. L. 1982. Double fertilization in barley and the cytological explanation for haploid embryo formation, embryoless caryopses, and ovule abortion. *Carlsberg Research Communication* 47: 313-353.
- MOGIE, M. 1988. A model for the evolution and control of generative apomixis. *Biological Journal of the Linnean Society* 37: 127-153.
- NOGLER, G. A. 1984a. Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus* V. Conclusion. *Botanica Helvetica* 94: 411-422.
- NOGLER, G. A. 1984b. Gametophytic apomixis. In: B. M. JOHRI (ed.), *Embryology of Angiosperms*, pp. 475-518. Springer-Verlag, Berlin.
- SAVIDAN, Y. 1982a. Nature et hérédité de l'apomixie chez *Panicum maximum* Jacq. *Travaux et Documents de l'ORSTOM* 153: 47-56.
- SAVIDAN, Y. 1982b. Embryological analysis of facultative apomixis in *Panicum maximum* Jacq. *Crop Science* 22: 467-469.
- SAVIDAN, Y. 1983. Genetics and utilization of apomixis for the improvement of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) In: J. A. SMITH & V. W. HAYS (eds), *Proceedings of the XIV International Grassland Congress, Lexington KY, 15-24 June 1981*, pp. 182-184. Westview Press, Boulder, CO.
- SAVIDAN, Y. 1989. Another 'working hypothesis' for the control of parthenogenesis in *Panicum*. *Apomixis Newsletter* 1: 47-51.
- SHERWOOD, R. T., BERG C. C. & YOUNG, B. A. 1994. Inheritance of apomixis in buffelgrass. *Crop Science* 34, in press.
- TINNEY, F. W. 1940. Cytology of parthenogenesis in *Poa pratensis*. *Journal of Agronomy Research (Washington)* 60: 351-360.
- DO VALLE, C.B., GLIENKE, C., & CAMPOS LEGUIZAMON, G. O. 1994. Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. *Apomixis Newsletter* 7: 42-43.

Received 20 October 1994

ANNEXE III-3

Plant Breeding 114, 00–00 (1995)

© 1995 Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin
ISSN 0179-9541

Chromosome doubling in *Tripsacum*: the production of artificial, sexual tetraploid plants

O. LEBLANC², M. DUEÑAS¹, M. HERNÁNDEZ¹, S. BELLO¹, V. GARCIA¹, J. BERTHAUD^{1,2} and Y. SAVIDAN¹¹The French Scientific Research Institute for Development through Cooperation (ORSTOM) and the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), *Tripsacum* Project, Apartado Postal 6–641, 06 600 Mexico D. F., Mexico;²ORSTOM, Laboratoire de Ressources Génétiques et d'Amélioration des Plantes Tropicales, BP 5045, F-34032 Montpellier Cedex, France

With 4 figures and 2 tables

Received September 22, 1994 Accepted December 5, 1994

Communicated by H. Lörz

Abstract

A collection of embryogenic diploid calli of *Tripsacum* was established and treated with colchicine to induce chromosome doubling. Sections containing duplicated cells in calli were identified using flow cytometry and ploidy level was determined in the regenerated plantlets. Tetraploid plants from several origins were obtained. In contrast to wild polyploid plants, which show apomictic development, the regenerated tetraploid plants reproduced sexually. By hybridizing these plants with wild tetraploid apomicts, various populations were established; these will allow a study of the inheritance of apomixis in *Tripsacum*.

Key words: *Tripsacum* — apomixis — callus culture — chromosome doubling — colchicine — flow cytometry — sexual tetraploid.

Gametophytic apomixis, that is, asexual reproduction through seeds (Nogler 1984), could greatly improve grain crop production in the tropics and simplify breeding if transferred to major crops (Bashaw 1980, Savidan and Dujardin 1992). The ORSTOM-CIMMYT *Tripsacum* project is attempting the transfer of apomixis into maize from *Tripsacum*, maize's closest apomictic wild relative, via the conventional backcross pathway (Savidan and Berthaud 1994). Simple inheritance is one prerequisite for transferring genes of interest through wide crosses from wild relatives into crops. Apomixis results from two basic events non-reduction (i.e. apospory or diplospory) followed by egg cell parthenogenesis, which have been reported to be genetically linked (Savidan 1982, Nogler 1984). Studies in a few tropical forage grasses and dicotyledons clearly demonstrated that apospory has a monogenic inheritance (Nogler 1984, Asker and Jerling 1992), but the inheritance of diplospory has still to be elucidated.

The mode of reproduction in species of the *Tripsacum* agamic complex is closely related to ploidy level. Diploid accessions ($2n = 36$) are sexual, whereas the polyploids ($2n = 54, 72, 90$ and 108) reproduce through diplosporous, gametophytic apomixis (Leblanc et al. 1995). For genetic analyses of the inheritance of apomixis, apomixis and sexuality must be expressed at the same ploidy level to avoid meiotic disturbances or sterility; these may result from unstable meiotic ploidy levels (e.g. a triploid resulting from diploid \times tetraploid crosses) in populations that segregate for the mode of reproduction. Because apomixis is commonly expressed at the tetraploid level in the wild and because apomictic polyhaploid plants have been gen-

erally described as weak and sterile (Nogler 1984), the production of artificial sexual tetraploid plants through colchicine chromosome doubling of diploid calli was attempted. Flow cytometry, allowing easy and quick estimation of chromosome number in plant tissues (Galbraith et al. 1983, Delaat et al. 1987), was used to estimate DNA content in untreated and treated calli and in regenerated plantlets.

Materials and Methods

Establishing diploid callus cultures

Calli were induced using mature embryos obtained from open-pollinated diploid accessions and from controlled crosses between diploid accessions from the ORSTOM-CIMMYT collection maintained at the CIMMYT experiment station at Tlaltizapán, Morelos State, Mexico. For callus induction, 45 mature embryos were carefully removed from sterilized seeds and transferred to flasks containing 30 ml of agar-solidified N_6 medium (Chu et al. 1975) supplemented with dicamba (2 mg/l). After 3 weeks in the dark at 26°C, embryo-like structures were removed and subcultured for multiplication on the same callus induction medium in the dark at 26°C at 3-week intervals. The ploidy and regeneration capacity of the callus were checked after 6 cycles of subculture, the former using flow cytometry.

Colchicine treatments:

A stock solution of colchicine was filter-sterilized and added to the autoclaved agar- N_6 medium before solidification. Three levels of colchicine treatment, 0.05, 0.1 and 0.2%, were applied for each selected callus line. Embryogenic calli were divided into small pieces (0.5 to 1 mm²) and the pieces were sprayed in flasks containing 30 ml of the agar-solidified- N_6 medium supplemented with colchicine. After 72 h of incubation at 26°C in the dark, the calli were removed and subcultured twice (at 1-week and 3-week intervals) on N_6 medium supplemented with dicamba (2 mg/l) before checking ploidy levels. Each callus was divided in to two to four sections and each section analysed using flow cytometry. Sections that showed signs of chromosome doubling were subcultured three times (at 3-week intervals) before regeneration.

Plant regeneration:

Regeneration was initiated by transferring calli to a medium containing MS salts (Murashige and Skoog 1962) supplemented with 20 g/l of sucrose, 0.15 g/l of L-asparagine, 0.5 mg/l of IAA (indol 3-acetic acid), 1 mg/l of BAP (6-benzylaminopurine), and 0.4 mg/l of thiamine. The medium was then adjusted to pH 5.7 with 1M NaOH. Calli were incubated with 18 h light per day at 26°C. Once leaf shoots developed (5–10 cm), they were transferred to a rooting medium containing MS

salts supplemented with 20 g/l of sucrose and 1 mg/l of NAA (α -naphthaleneacetic acid). After 10–15 days, plantlets were transplanted to soil in pots and transferred to the greenhouse. Finally, each regenerated plant was analysed for ploidy level using flow cytometry, before transfer to the field. In addition, root tips from 5–10 tetraploid regenerated plants per duplicated callus line were prefixed at 4°C in saturated 8-hydroxyquinoline for 4 h, transferred to fresh Carnoy's solution (6:3:1, v/v/v, 95% ethanol:chloroform:acetic acid), fixed for 24 h and stored at –4°C in 70% ethanol. Chromosome counts, to confirm flow cytometry analyses, were made on metaphase cells from squashed root tips and observed by phase-contrast microscopy.

Flow cytometry

A Partec CA II cytometer equipped with the DAPI staining filter combination and with DPAC software for data analyses (Partec GmbH, Otto-Hahn Straße 32, D-4400 Münster, Germany) was used for DNA content estimations. Small pieces of both calli and leaves were chopped using a razor blade in 10 ml of the chopping buffer described by Galbraith et al. (1983) containing 2 µg/ml of bis-benzimidine, a fluorochrome that binds to DNA. The solution was then passed through a nylon filter (pore size, 40 µm) and the stained nuclei in the filtrate analysed by flow cytometry. The fluorescence measured is correlated with the DNA content of the stained nuclei. For each peak detected, an index can be calculated using a given reference (e.g. a peak corresponding to a cell mixture of known DNA content); therefore the comparison of the index gives the relationship between the DNA contents in the stained nuclei that produced those peaks.

Prior to carrying out experiments with treated calli and regenerated plantlets, the DNA contents of maize CIMMYT line CML 62 and diploid *Tripsacum* (untreated calli and leaves) were estimated to determine whether this line could be used as an internal control by chopping its leaves together with the *Tripsacum* samples.

Determining the mode of reproduction

In species that produce mono- and bisporic embryo sacs, sexual megasporogenesis is characterized by callose deposition in megasporocyte and megaspore cell walls (Rodkiewicz 1970). In the *Tripsacum* agamic complex, callose is also critical for meiosis, but diplosporous megasporocytes lack callose deposition throughout megasporogenesis (Leblanc et al. 1995). For callose analysis, pistils were dissected from young female parts of inflorescences, optically cleared and stained using three sucrose solutions (250, 500 and 800 g/l successively) supplemented with aniline blue (100 mg/l), and finally examined using ultraviolet vertical

epifluorescence microscopy according to Leblanc et al. (1995). Ovules from 10–25 flowers from each regenerated tetraploid genotype were analysed.

Results

The DNA contents of the maize line and the diploid *Tripsacum* samples, either from leaf tissue or callus, were similar when estimated using flow cytometry (Fig. 1a, b) However, peaks from maize and *Tripsacum* generally did not overlap perfectly; coefficients of variation (CV) were around 5% for *Tripsacum* and maize cell mixtures, but only 3% in pure maize cell mixtures (Fig. 1c). Therefore, a peak at about twice the index of the peak corresponding to the maize cells was expected in cases of chromosome doubling.

From the 45 mature embryos used for callus induction, 31 callus cultures were established of which 26 were diploid (Table 1). Although tissue culture may induce endoreplication, the polyploid cultures recovered may also come from fertilization of a reduced female gamete by 2 × pollen (tetraploid parent), or from fertilization of an unreduced female gamete by 1 × or 2 × pollen. Among the 26 diploid cultures previously identified, 17 were found to be highly regenerative and selected for chromosome doubling experiments (Table 1). All the regenerated plants from the selected calli were diploid, as determined by flow cytometry (Fig. 1a).

There were two principal signs of chromosome doubling in calli when cell mixtures were prepared from maize and treated calli tissues and analysed using flow cytometry. The first was a high percentage of tetraploid cells more than 20%). In that case, the peak corresponding to the tetraploid cells in the mixture (peak 2, Fig. 2) represented maize cells or diploid cells from the callus in phase of the cell cycle (about 15–20%, peak 2, Fig. 1b), and *Tripsacum* tetraploid cells resulting from chromosome doubling. The second indicator of chromosome doubling was small peaks of 8x DNA content, representing *Tripsacum* tetraploid cells in phase G2 (peak 3, Fig. 2). Two subcultures after the colchicine treatment, six callus lines had one or more sections containing cells affected by the colchicine treatment. Three subcultures later, in all sections previously selected except two

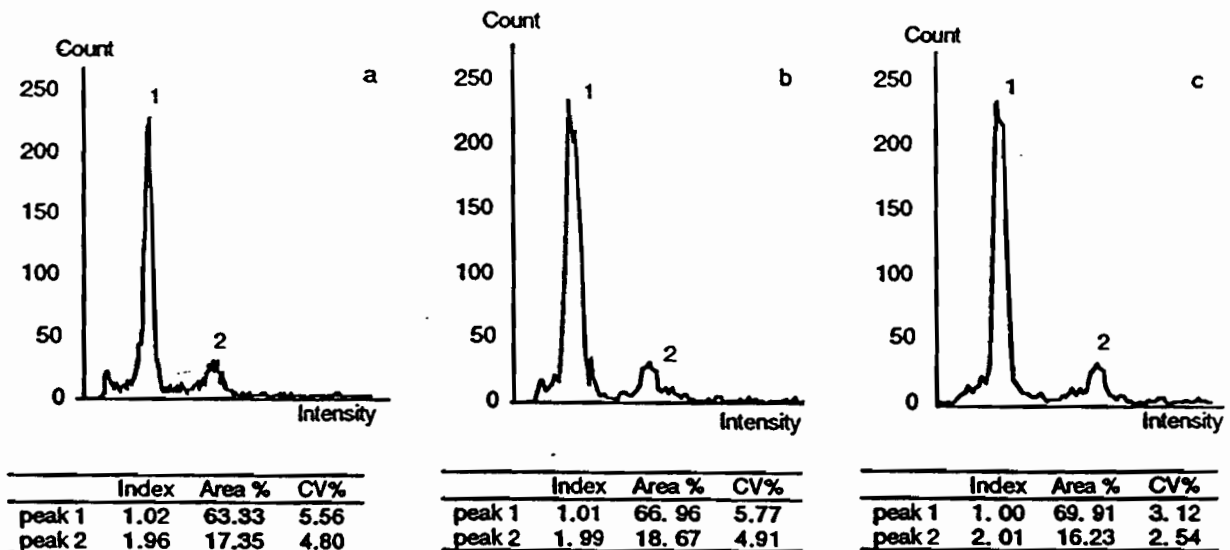


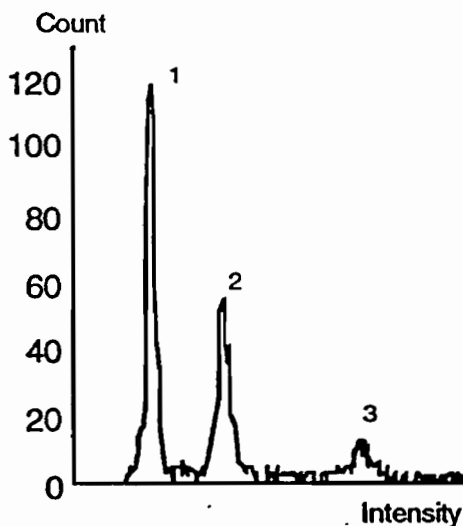
Fig. 1: Relative DNA contents in maize (CIMMYT line CML62) and *Tripsacum* estimated by flow cytometry. (a) Cell mixture prepared from leaf tissues of both maize and a diploid regenerated plant from untreated callus line C-48. (b) Cell mixture prepared from untreated callus line C-48 and leaf tissue from maize. (c) Cell mixture of pure maize. Peak 1: diploid cells. Peak 2: diploid cells in G2

Table 1: Main characteristics of the induced *Tripsacum* calli. All the *Tripsacum* accessions except those from population #111, seeds of which were collected in situ, are from populations belonging to collections maintained at the CIMMYT experiment station, Tlaltizapán, Morelos State, Mexico. Species designations are DM: *T. dactyloides mexicanum*; DH: *T. dactyloides hispidum*; MR: *T. dactyloides meridionale*; MZ: *T. maizar*; PL: *T. pilosum*; ZP: *T. zopilotense*

Mature embryo origin	Induced callus ploidy level			Highly regenerative diploid lines	
	2n =	2n =	2n = 72		
Open-pollinated accessions					
<i>Tripsacum</i> accessions					
39-1569	PL	2	1	2	
46-404	PL	2		1	
51-470	ZP	1	1	1	
population #111	DH	2		-	
Controlled crosses					
<i>Tripsacum</i> accessions					
39-1569 × 8-559	PL, MZ	2		1	
39-310 × 47-410	PL, PL	3		2	
47-410 × 49-1389	PL, ZP	1		1	
75-911 × 39-1830	DH, PL	1		1	
76-916 × 47-415	DM, PL	6	1	5	
99-1099 × 575-5136	MZ, MR	3		1	
7203-3 × 47-410	MZ, PL	2		2	
575-5136 × 8-559	MR, MZ	1		-	
Total		26	4	1	17

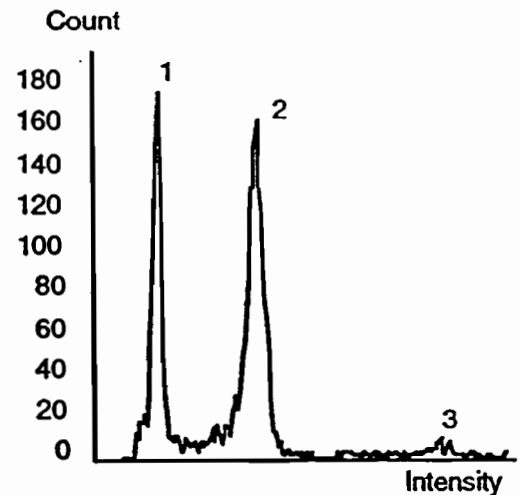
(from C-14 and C-62), such cells were detected in varying proportions (Table 2). When effective, colchicine treatment of diploid calli yielded tetraploid cells, except in one section from line C-48 (0.1%) in which a high proportion of octoploid cells was observed. However, when chromosome doubling was detected, the CV values of the 'control' peaks from mixtures prepared from treated calli were similar to those prepared from untreated calli (e.g. peak 1, Fig. 1b and Fig. 2). This indicated that all the treated calli showing chromosome doubling were certainly mixoploid. Altogether, 1109 plants from three of the six lines showing duplicated cells at the fifth subculture after treatment were regenerated (Table 2); 249 (22.5%) were tetraploid (Fig.

3), confirming the mixoploid nature of the calli affected by the colchicine treatment. Of these, 237 survived and were transferred to pots. No octoploid plants were obtained either from partial tetraploid calli or from the octoploid section from callus line C-48. Of the 249 tetraploid plants we recovered, 11 (4.5%) were regenerated from callus treated with 0.05% colchicine. All others came from 0.2% colchicine-treated calli, suggesting that high concentrations of colchicine are required for mitotic arrests in *Tripsacum*. In contrast to the treated calli, analyses of leaves from regenerated plants showed lower CVs for the 'control' peak (e.g. around 3%, peak 1, Fig. 3) suggesting that the regenerated plants were tetraploid and not chimaeric. Root tip counts confirmed the tetraploid nature of the plantlets selected using flow cytometry (5-10 for each genotype).



	Index	Area %	CV%
peak 1	1.00	42.91	5.00
peak 2	1.94	32.87	4.55
peak 3	3.76	8.99	2.66

Fig. 2: Estimation of the ploidy levels in one section of callus line C-48 five subcultures after 0.2% colchicine treatment. Callus tissue was analysed together with CIMMYT maize line CML62. Peak 1: diploid cells from both the maize and the callus. Peak 2: maize cells in G2 and tetraploid cells from callus. Peak 3: Tetraploid cells from callus in G2



	Index	Area %	CV%
peak 1	1.23	30.74	3.19
peak 2	2.41	49.70	3.23
peak 3	4.58	1.99	1.69

Fig. 3: Estimation of the chromosome number in a tetraploid plant regenerated from colchicine-treated callus line C-48. Leaf tissue was analysed together with CIMMYT maize line CML62. Peak 1: maize cells. Peak 2: tetraploid cells from the regenerated plant. Peak 3: tetraploid cells from the regenerated plant in G2

Table 2: Levels of polyploidy in calli of *Tripsacum* spp. five subcultures after colchicine treatment (all of them showed signs of chromosome doubling two subcultures after treatment) and in their respective regenerated plants, as determined by flow cytometry. ND, not determined; NR, callus line survived but did not regenerate plantlets

#	Callus line embryo origin	Colchicine treatment	Polyploid levels detected (% of cells analysed)		Number of regenerated plants		
			4x	8x	Total	4x	8x
C-12	76-916 × 47-415	0.05%	24.5	traces	29	-	-
C-14	76-916 × 47-415	0.05%	19.1	-	197	11	-
C-48 ¹	47-410 × 49-1389	0.2%	15.02	-	26	-	-
		0.1%	20.32	traces	NR	-	-
		0.1%	traces	44.64	NR	-	-
		0.2%	ND	ND	24	23	-
C-49 ²	75-911 × 39-1830	0.2%	32.87	8.99	55	37	-
		0.2%	39.15	4.23	248	107	-
		0.2%	42.26	6.48	173	48	-
		0.2%	45.23	traces	246	23	-
		0.1%	37.13	6.56	84	-	-
C-62	99-1099 × 575-5136	0.1%	37.13	6.56	84	-	-
		0.2%	15.00	-	27	-	-
Total of regenerated plants					1109	249	-

¹Two sectors showed duplications at 0.1 and 0.2% colchicine

²Three sectors showed duplications at 0.2% colchicine

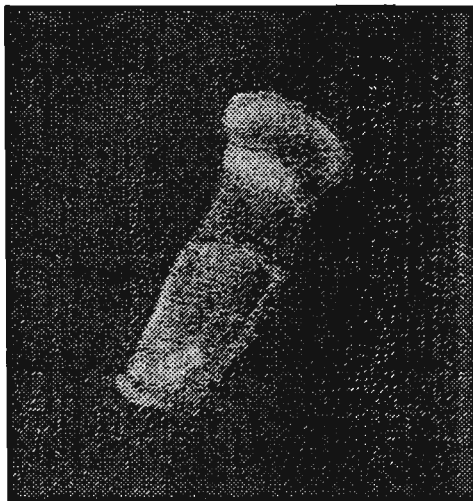


Fig. 4: Callose fluorescence during meiosis in a tetraploid regenerated plant: Tetrad of megaspores with fluorescing cell walls ($\times 650$)

Callose fluorescence around megaspore mother cells and their derivatives was observed both in diploid plants regenerated from untreated calli and in tetraploid plants regenerated from colchicine-treated calli (Fig. 4). These observations are typical of sexual development in *Tripsacum* spp. (Leblanc et al. 1995), and clearly indicate sexual reproduction at the tetraploid level.

Discussion

Flow cytometry greatly increased the efficiency of screening ploidy levels at critical steps in the experiment — diploid callus selection, identification of polyploid sections in calli, and determination of ploidy level in regenerated plants. Conventional chromosome counting involves staining mitotic cells at metaphase, a time-consuming procedure which greatly limits the number of counts. Moreover, the effects of colchicine treatment can only be appreciated after plantlet regeneration. Using flow cytometry, ploidy is quickly estimated whatever the plant tissue and promising materials can be detected before regeneration and transfer into pots.

Sexuality in grass agamic complexes is restricted to the dip-

loid gene pool and the interrelationship between polyploidy and gametophytic apomixis is strong (Stebbins 1950). Changes in mode of reproduction after chromosome doubling from colchicine treatment of sexual diploids related to polyploid apomicts has rarely been reported (*Camalagrostis*, Nygren 1948; *Paspalum*, Quarin and Hanna 1980), but at least in *Paspalum*, low levels of apomixis expression (up to 5%) have been reported in several diploid species (Normann et al. 1989). In contrast, chromosome doubling in many sexual diploids belonging to agamic complexes did not affect the mode of reproduction (Asker and Jerling 1992), and such was the case for the *Tripsacum* materials whose chromosomes were duplicated. This may indicate that polyploidy alone is not sufficient to cause a breakdown in the sexual reproduction of autotetraploids recovered from diploids related to apomicts.

The sexual tetraploid *Tripsacum* plants reported here will be used as pistillate parents in crosses with tetraploid apomictic accessions that produce fertile reduced pollen. The resulting populations are expected to segregate for the mode of reproduction (sexuality vs. apomixis) allowing the genetic study of apomixis components (diplospory, parthenogenesis) in *Tripsacum*. The inheritance of gametophytic apomixis has generally been studied in aposporous materials. Although evidence of simple inheritance of diplospory has been reported in *Eragrostis curvula* (Voigt and Bashaw 1972), no comprehensive analysis of the inheritance of apomixis in diplosporous materials exists.

References

- Asker, S., and L. Jerling, 1992: Apomixis in Plants. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Bashaw, E. C., 1980: Apomixis and its implications in crop improvement. In: Fehr, W. R., and H. H. Hadley (eds), Hybridization of Crop Plants, 45—63. Am. Soc. Agr., Madison, USA.
- Chu, C. C., C. C. Wang, C. S. Sun, C. Hsu, K. C. Yin, and C. Y. Chu, 1975: Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 18, 659—668.
- Delaat, A. M. M., W. Gohde, and M. J. D. C. Vogelzang, 1987: Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. *Plant Breeding* 99, 303—307.
- Galbraith, D. W., K. R. Harkins, J. M. Maddox, N. A. Ayres, D. P.

- Sharma, and E. Firoozabady, 1983: A rapid flow cytometric analysis of cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220, 1049—1051.
- Leblanc, O., M. D. Peel, J. G. Carman, and Y. Savidan, 1995: Megasporeogenesis and megagametogenesis in several *Tripsacum* species (Poaceae). *Am. J. Bot.* 82, (in press).
- Murashige, T., and F. Skoog, 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 413—497.
- Nogler, G. A., 1984: Gametophytic apomixis. In: Johri, B. M. (ed.), *Embryology of Angiosperms*, 475—518. Springer-Verlag, Berlin.
- Normann, G. A., C. L. Quarin, and B. L. Burson, 1989: Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races of six *Paspalum* species. *J. Hered.* 80, 24—28.
- Nygren, A., 1948: Further studies in spontaneous and synthetic *Calagrostis purpurea*. *Hereditas* 34, 113—125.
- Quarin, C. L., and W. W. Hanna, 1980: Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. *Crop Sci.* 20, 69—75.
- Rodkiewicz, B., 1970: Callose in cell walls during megasporeogenesis in angiosperms. *Planta* 93, 39—47.
- Savidan, Y., and J. Berthaud, 1994: Maize × *Tripsacum* hybridization and the potential for apomixis transfer for maize improvement. In Bajaj, Y. P. S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Volume 25, Maize, 63—89. Springer-Verlag, Berlin.
- , and M. Dujardin, 1992: Apomixie: la prochaine révolution verte? *La Recherche* 241, 326—334.
- Stebbins, G. L., 1950: *Variation and Evolution in Plants*. Columbia University Press, New York.
- Voigt, P. W., and E. C. Bashaw, 1972: Apomixis and sexuality in *Eragrostis curvula*. *Crop Sci.* 12, 843—847.

ANNEXE III-4

O. Leblanc · D. Grimanelli · D. González-de-León
Y. Savidan

Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-*Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers

MASTER COPY

Illustration proof on photographic paper
Please make corrections with a red fiber-tip
or felt-tip pen and return to publisher

Received: 22 December 1994 / Accepted: 17 February 1995

Abstract Polyploid plants in the genus *Tripsacum*, a wild relative of maize, reproduce through gametophytic apomixis of the diplosporous type, an asexual mode of reproduction through seed. Moving gene(s) responsible for the apomictic trait into crop plants would open new areas in plant breeding and agriculture. Efforts to transfer apomixis from *Tripsacum* into maize at CIMMYT resulted in numerous intergeneric F₁ hybrids obtained from various *Tripsacum* species. A bulk-segregant analysis was carried out to identify molecular markers linked to diplospory in *T. dactyloides*. This was possible because of numerous genome similarities among related species in the Andropogoneae. On the basis of maize RFLP probes, three restriction fragments co-segregating with diplospory were identified in one maize-*Tripsacum dactyloides* F₁ population that segregated 1:1 for the mode of reproduction. The markers were also found to be linked in the maize RFLP map, on the distal end of the long arm of chromosome 6. These results support a simple inheritance of diplospory in *Tripsacum*. Manipulation of the mode of reproduction in maize-*Tripsacum* backcross generations, and implications for the transfer of apomixis into maize, are discussed.

Key words Diplospory · RFLP
Bulk-segregant analysis · Genome similarity
Intergeneric hybrids · *Zea mays*

Introduction

Barring a few exceptions, such as banana and potato, important food crops reproduce sexually. By contrast, apomixis-asexual reproduction through seed (Nogler 1984a) is a very common mode of reproduction in perennial tropical forage grasses and in at least 300 wild species belonging to 30 higher plant families (Asker and Jerling 1992). Apomictic processes bypass both meiosis (apomeiosis, after Renner 1916) and egg-cell fertilization, producing offspring which are exact genetic replicas of the mother plant. Particular genotypes or complex traits as well as hybrid vigor, impossible or difficult to perpetuate through sexual reproduction, can be easily maintained and multiplied indefinitely under an apomictic mode of reproduction. Therefore apomixis would be of great value if introduced into major food crops, and would allow the propagation of heterotic hybrid combinations, leading to increased food production in developing countries (Savidan and Dujardin 1992; Jefferson 1994). Most major cereal crops belong to the Gramineae, a family in which apomixis is widely expressed (Brown and Emery 1958), especially in wild relatives of maize, wheat, and pearl millet. However, owing to the wealth of cytological and molecular data available for maize, combined with the recent progress in understanding its reproductive biology (Dumas and Mogensen 1993; Faure et al. 1994), maize would be a unique model system for the manipulation of apomixis.

The mode of reproduction in the *Tripsacum* agamic complex ($x=18$), the closest wild apomictic relative of *Zea mays* L. ($x=10$), is closely related to ploidy level. Diploid genotypes are sexual, but polyploid ones reproduce through gametophytic apomixis characterized by diplosporous apomeiosis (diplospory) followed by parthenogenetic development of the egg cell. Diplospory in *Tripsacum* ssp. is facultative and primarily of the *Antennaria* type, resulting from meiotic failure in megasporocytes that first enlarge and then directly develop into mature unreduced female gametophytes through three or more mitoses (Leblanc et al. 1995). Moreover, non-reduction of chromo-

Communicated by G. S. Khush

O. Leblanc (✉)¹ · D. Grimanelli · Y. Savidan
The French Scientific Research Institute for Development through Cooperation (ORSTOM) and the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Apartado Postal 6-641, 06600 México D. F., Mexico

D. González-de-León
Applied Molecular Genetics Laboratory, CIMMYT,
Apartado Postal 6-641, 06600 México D. F., Mexico

Present address:

¹ ORSTOM, Laboratoire de Ressources Génétiques et d'Amélioration des Plantes Tropicales, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex, France

somes during diplosporous megasporogenesis – i.e. meiosis failure – is strongly associated with an absence of callose deposition in megasporocyte cell walls, whereas meiotic megasporocytes and their derivatives are surrounded by callose (Leblanc et al. 1995). In our current effort to transfer apomixis from *Tripsacum* into maize, F₁ hybrids were produced using maize and tetraploid *Tripsacum* accessions from various origins. We have used one F₁ population that segregated 1:1 for mode of reproduction (meiotic vs apomeiotic), together with bulk-segregant analysis (BSA; Michelmore et al. 1991) for the detection of genetic markers linked to gene(s) responsible for apomeiosis in *Tripsacum*. Taking advantage of the genomic synteny observed within the Andropogoneae (Bennetzen and Freeling 1993), a strategy based on molecular markers of known map position in maize was devised to screen the *Tripsacum* DNA bulks. The molecular-marker information reported here should assist in the transfer of apomixis from *Tripsacum* into maize, as well as ultimately allow the isolation of the *Tripsacum* DNA segment responsible for diplospory for more detailed molecular analyses.

Maize RFLP clones (BNL, CSU, UMC and php) were kindly supplied by the University of Missouri, Columbia. The final selection of probes was based on the preliminary screening of five F₁ individuals and both the maize and the *Tripsacum* parents, in order to identify *Tripsacum*-specific restriction fragments as well as heterozygosity for these fragments in the *Tripsacum* parent. For the genetic study, the DNAs of *T. dactyloides* (accession 65-1234), the maize hybrid (CML139 × CML135), and the two bulks, were hybridized to 76 clones detecting loci throughout the maize genome (at 20 to 40 cM intervals; Heredia Díaz et al. 1994, and personal communication; tropical maize map, CIMMYT, unpublished data). *Tripsacum*-specific markers identified in the diplosporous bulk were then checked on the 44 F₁ individuals of known reproductive behavior. Once markers had been identified, eight probes corresponding to other flanking markers on the maize map, were then used to narrow down the region of interest.

Isozyme analysis

Isozyme analysis was performed following Stuber et al (1988), after slight modification of the sample preparation procedure; samples were extracted by homogenizing 0.2 g of young leaves from adult plants with 200 µl of a Tris-HCl 0.5 M pH 7.5 buffer containing 16% (w/v) sucrose, 8% (w/v) sodium ascorbate, 8% (w/v) PVP and 4% (w/v) ascorbic acid. F₁ hybrids in bulks and the two parents were stained for MDH (malate dehydrogenase).

Materials and Methods

Plant material

An F₁ population of 91 individuals was derived from hybridization between a maize hybrid (CML139 × CML135) from Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) as pistillate parent and *Tripsacum dactyloides*(L.) L., CIMMYT accession 65-1234 (2n=4x=72), an apomict from the Everglades, Florida, USA (Leblanc et al. 1995). All the hybrids recovered were 2n=46 combining 36 chromosomes from the *Tripsacum* parent and 10 from the maize parent. They were all completely male-sterile, and only a few showed very low female fertility when backcrossed to maize. Given such fertility behavior, the determination of the mode of reproduction of each F₁ plant through progeny-tests (i.e. mother-offspring comparisons and/or evaluation of progeny heterogeneity) could not be carried out. Therefore, analysis of callose deposition during megasporogenesis (sucrose-aniline blue clearing procedure combined with epifluorescence microscopy; Peel 1993) was used for cytoembryological determination of reproductive behavior (meiosis versus diplospory) in 52 maize-*T. dactyloides* hybrids. Some 10 to 20 ovules from 31 of the 52 hybrids previously analyzed were then re-cleared using a methyl benzoate-dibutyl phthalate clearing procedure (Crane and Carman 1987) to confirm callose analysis on the basis of cytological observations.

Bulk DNA composition and RFLP analysis

DNAs from 53 individuals of the maize-*Tripsacum* F₁ population and the two parents were extracted using a CTAB procedure (Hoisington et al. 1994). For bulk-segregant analysis (BSA), two bulks of DNA were prepared by combining the DNA from ten F₁ hybrids producing reduced (meiotic) female gametophytes, and from 10 F₁s producing unreduced (apomeiotic) female gametophytes. DNA from F₁ hybrids, the maize and *T. dactyloides* parents, and the two bulks, were digested using the restriction endonucleases *Hind*III and *Eco*RI, electrophoresed and transferred onto nylon membranes. Hybridizations, stringency washes (0.15 × SSC-0.1% SDS, 2 × 5 min. at room temperature, then 3 × 15 min at 60°C), chemiluminescent detection, and exposure were all performed according to Hoisington et al. (1994).

Results

Segregation for mode of reproduction in the maize-*Tripsacum* F₁ hybrids

Of the 52 maize-*Tripsacum* F₁ hybrids analyzed for mode of reproduction, 23 lacked callose deposition during megasporogenesis and 29 exhibited callose fluorescence in and around the megasporocyte or the megaspore cell walls. When observed after the methyl benzoate-dibutyl phthalate clearing procedure, all the ovules showing an absence of callose revealed enlarged megasporocytes of the *Antennaria* diplosporous type, whereas the fluorescing ones always contained meiotic products (megasporocytes, dyads or tetrads). These observations correspond to typical diplosporous gametophytic apomixis and sexuality in *Tripsacum* ssp. (Leblanc et al. 1995). Several different hypotheses were tested regarding the segregation ratio for mode of reproduction; three of these are given on Table 1.

Table 1 Possible hypotheses pertaining to the segregation of the mode of reproduction in the *T. dactyloides*-maize segregating F₁ population. Each of the expected ratios can be fitted to the observed segregation of 23 (diplosporous) to 29 (meiotic); r is the recombination fraction and P the probability associated with the test

Hypothesis	Expected ratio	χ^2	P
One factor	1 : 1	0.7	0.5 > P > 0.25
Two independent factors	3 : 1	10.3	0.005 > P
Two factors linked (r=0.25)	54 : 46	0.065	0.9 > P > 0.75

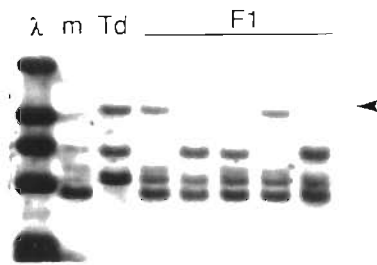


Fig. 1 Hybridization of maize probe CSU4 onto DNA of *T. dactyloides* 65-1234 (*Td*), the maize hybrid CML139×CML135 (*m*), and five F₁ individuals. The arrow indicates a *Tripsacum*-specific restriction fragment. Note that the *Tripsacum* parent is heterozygous for this fragment. λ HindIII-digested lambda DNA

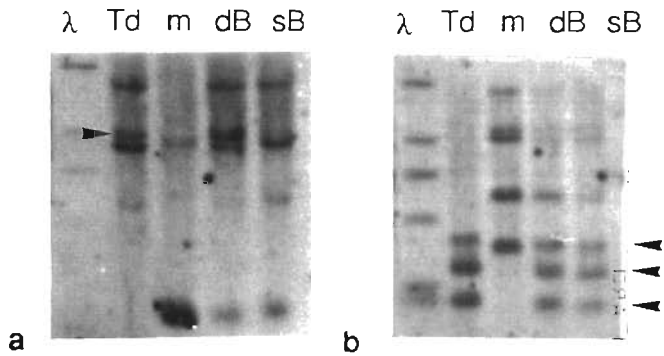


Fig. 2a, b RFLP patterns in *T. dactyloides* (65-1234) (*Td*), the maize hybrid (CML139×CML135) (*m*), and the two F₁ DNA bulks (*dB* diplosporous DNA bulk; *sB* sexual DNA bulk) revealed by two maize probes. a Polymorphic restriction fragment (arrow) shared by *T. dactyloides* 65-1234 and the diplosporous bulk detected by UMC28 (*EcoRI* digests). b *Tripsacum*-specific restriction fragments (arrows) that were not correlated with the mode of reproduction detected by BNL6.22 (*HindIII* digests). λ HindIII-digested lambda DNA

RFLP analysis

Eighty-four out of ninety-three maize probes (90%) detecting loci throughout the maize genome, revealed *Tripsacum*-specific restriction fragments. Among these probes, all the "CSU" gave the strongest and clearest signals when hybridized onto *Tripsacum* DNA: these cDNA clones seemed therefore to have better homology to *Tripsacum* DNA than most of the others which were derived from genomic libraries. The inheritance of the *Tripsacum*-specific restriction fragments in the preliminary probe selection screening of five F₁ individuals showed that 81% were heterozygous in the *Tripsacum* parent (Fig. 1). The two restriction enzymes used (*EcoRI* and *HindIII*) were equally effective in detecting informative polymorphisms. The final 68 maize probes (Table 2) were hybridized to *T. dactyloides* (accession 65-1234), maize hybrid (CML139×CML135), and the two DNA bulks.

Table 2 RFLP probes detecting loci throughout the maize genome (20–40-cM intervals), selected for RFLP analysis

Maize chr.	Probes detecting a locus in a given chromosome ^a
1	BNL 5.59, BNL 6.32, UMC11, UMC58, UMC72, UMC83, UMC86, CSU3, CSU12 ^b , CSU110, CSU134.
2	BNL8.45, UMC36, UMC55, UMC98, UMC139, CSU4, CSU40, CSU64, CSU154.
3	UMC16, UMC17, UMC18, UMC92, CSU32, CSU38.
4	BNL8.23, UMC47, UMC66, CSU39, CSU84, CSU166.
5	BNL6.22, UMC1, UMC54, UMC68, CSU26, CSU33, CSU108.
6	UMC28, UMC65, UMC138, CSU56, CSU80, CSU70, CSU94.
7	BNL5.61, UMC80, UMC149, CSU11, CSU27, CSU129.
8	BNL1.45, UMC120, CSU31, CSU110, CSU142.
9	UMC105, UMC114, CSU12 ^b , CSU93, CSU95.
10	BNL7.49, UMC64, UMC130, CSU6, CSU46, CSU103.

^a Heredia Díaz et al. 1994: tropical maize map, CIMMYT, unpublished data

^b Probe for which duplicate loci are known in the maps mentioned above

Table 3 Sub-set of genetic markers from a distal segment of maize chromosome 6 used for the detection of linkage(s) with the chromosome region controlling diplospory in *Tripsacum*

Probe	Map distance (cM) from UMC28 ^a
UMC177 ^b	3.4
CSU68	0
UMC134	1.5
MDH2	9.7
UMC133	9.7
php4016	15.0
UMC62	17.7
UMC71	24.7
UMC132	30.8

^a Distances are based on the 1994 map of Heredia Díaz et al. (personal communication)

^b Most-distal locus known

Linkage analysis

The screening of DNA bulks yielded three potential markers for the mode of reproduction. The first marker was detected by UMC28 during the initial screening of the bulks. Further analysis of the probable flanking regions, based on the maize map (Table 3), yielded two more markers, detected by CSU68 and UMC62. In effect, these probes each detected a restriction fragment present in both the *Tripsacum* parent and the diplosporous bulk, but not in the other bulk or the maize parent (Fig. 2). After hybridizing the corresponding probes to the 44 individuals of known mode of reproduction, significant linkage between all three markers and diplospory was detected (Table 4 and Fig. 3). All three markers segregated according to a 1:1 ratio ($\chi^2 \leq 0.27$, $P \leq 0.6$). There were no recombinants between the markers

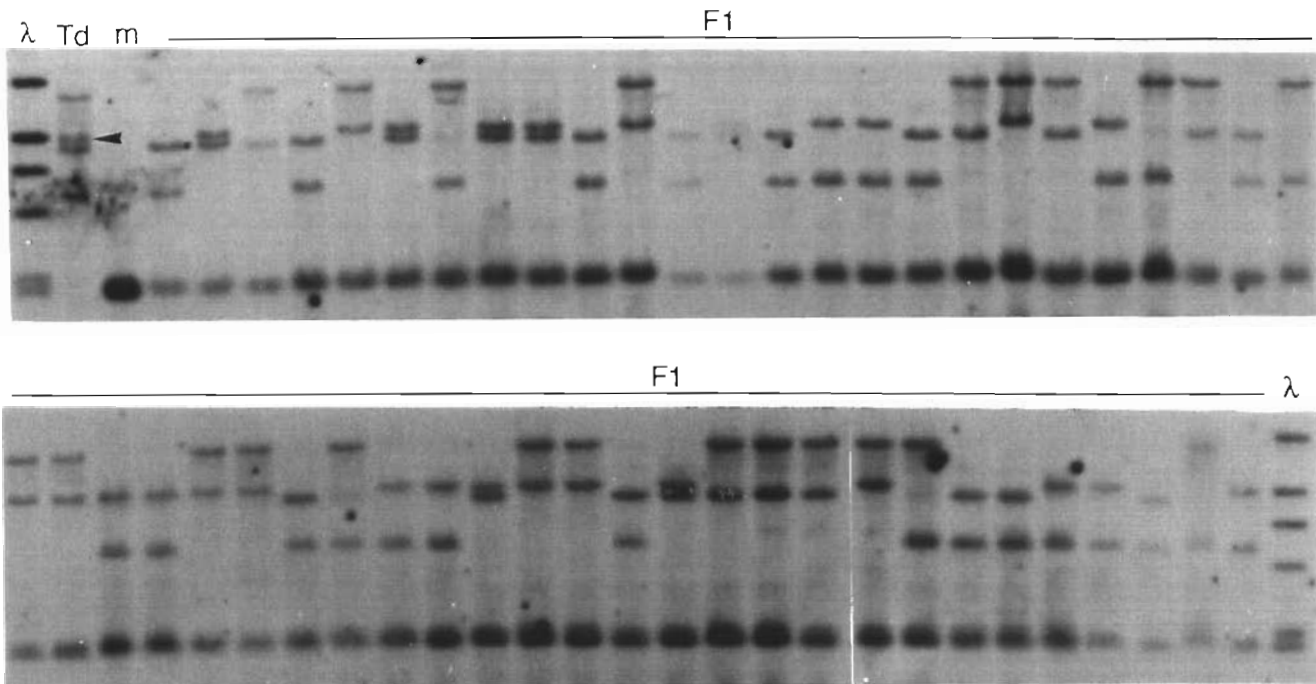


Fig. 3 Segregation analysis of the restriction fragment revealed by UMC28 (arrow) in the F₁ hybrids from the cross between diploporous *T. dactyloides* (Td) and sexual maize (m). EcoRI digests. λ : HindIII-digested lambda DNA

Table 4 Linkage relationships between the three RFLP markers and diplospory detected through BSA, in the segregating F₁ population of maize hybrid (CML139 \times CML135) \times *T. dactyloides* (accession 65-1234). Each cell contains the results of the contingency χ^2 test for independent assortment; P is the probability associated with the test and r is the recombinant fraction

Marker	Diplospory	Marker	
		umc28	csu68
umc28	$\chi^2 = 17.8$ $P = 2.5 \times 10^{-5}$ $r = 0.18$		
csu68	$\chi^2 = 17.8$ $P = 2.5 \times 10^{-5}$ $r = 0.18$	$\chi^2 = 44.0$ $P = 9.3 \times 10^{-7}$ $r = 0.00$	
umc62	$\chi^2 = 19.8$ $P = 8.7 \times 10^{-6}$ $r = 0.15$	$\chi^2 = 29.8$ $P = 4.3 \times 10^{-7}$ $r = 0.05$	$\chi^2 = 29.8$ $P = 4.3 \times 10^{-7}$ $r = 0.05$

detected by UMC28 and CSU 68, irrespective of the enzyme used.

Discussion

Inheritance of diplospory

Some of the hypotheses assuming the more complex models of genetic control of diplospory (Table 1) are too im-

probable. As will be discussed later, the marker data seem to support the hypothesis that the inheritance of diplospory in *Tripsacumis* controlled by a single Mendelian factor. Under this hypothesis, tetraploid *T. dactyloides* would be simplex for a dominant allele conferring diplospory.

Regarding the genetic control of diplospory in other species, no genetic analysis has been conducted, apart from studies in *Taraxacum* which show that the gene or genes for diplospory are located on a single chromosome (Mogie 1988).

In the case of apospory, where one or more unreduced female gametophytes form mitotically from somatic nucellar cells while the legitimate sexual line generally aborts, similar results have been obtained for various species. The inheritance of gametophytic aposporous apomixis appears to be monogenic in *Panicum maximum* (Savidan 1982), *Ranunculus auricomus* (Nogler 1984b), *Cenchrus ciliaris* (Sherwood et al. 1994), and *Brachiaria* (Valle and Miles 1994).

Strategy for DNA bulk screening: RFLP vs RAPD markers

In our endeavor to tag genes for diplospory, two crucial aspects of our strategy were the use of existing RFLP linkage information for maize and the speed provided by bulk-segregant analysis. BSA is now commonly performed in molecular genetic studies for the identification of markers linked to traits of agronomic value. RAPD markers are mainly used in such analyses (e.g., Burua et al. 1993; Penner et al. 1993), but note that bulk screenings are usually performed in the absence of a linkage map that is valid for any segregating population of the species concerned. On the other hand, although RFLP markers have been widely used for constructing maps that are valid across popula-

tions of a species (e.g., the maize maps of Helentjaris et al. 1986; Burr et al. 1988; Gardiner et al. 1993), they are only sporadically used in bulk-segregant analyses (e.g., Pineda et al. 1993; Mohan et al. 1994). Over the last 10 years, grass genomes have been well characterized genetically, and molecular data have revealed important similarities (gene order and composition, map collinearity) within and between the Triticeae and the Andropogoneae (Hulbert et al. 1990; Liu et al. 1992; Ahn et al. 1993; Melake Berhan et al. 1993; Grivet et al. 1994). Although a genetic linkage map is not available for *Tripsacum*, preliminary results from our group indicate that regions/groups of markers are conserved between the maize and *Tripsacum* genomes (unpublished data), and confirm Galinat's (1971) previous cytogenetic work. Because of such genomic similarities, the selected set of probes allowed us to use the maize molecular linkage map as a basis for screening efficiently the *Tripsacum* linkage groups.

Moreover, as expected in a wild apomict (Nogler 1984a), a very high level of heterozygosity was detected in the parental *Tripsacum* accession. This and the large number of *T. dactyloides*-specific restriction fragments, facilitated the discovery of markers co-segregating with diplospory after a relatively modest screening.

Linkage between molecular markers and diplospory

The three RFLP markers found to co-segregate with diplospory re-inforce the hypothesis of monogenic inheritance of diplospory. All three markers also appear to belong to the same linkage group in maize: the distal end of the long arm of chromosome 6 (Heredia Díaz 1994; CIMMYT *loc cit*). This observation confirms the existence of conserved genomic segments between *Tripsacum* and maize. Moreover, the recombination observed between the loci detected by UMC28 (or CSU68) and UMC62 was lower (0.05) in *Tripsacum* than in the available maize maps (around 0.2, Heredia Díaz 1994; CIMMYT *loc cit*). The significance of this difference is difficult to interpret as yet. Further analysis using more markers and progenies from both tetraploid and diploid *Tripsacum* crosses should indicate whether there are significant differences in the recombination rates between the two ploidy levels and maize. The most relevant result, however, is that the segments may be homologous enough for recombination to take place between maize and *Tripsacum* genomes around the region controlling diplospory.

Co-inheritance of apomixis and molecular markers has been previously reported in *Pennisetum squamulatum* Fresen, a wild relative of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) that reproduces through aposporous apomixis (Ozias-Akins et al. 1993). However, as observed by these authors, Mendelian linkage analysis could not be performed on this type of plant material since there was no evidence of pairing between the putative chromosome carrying the factor(s) for apospory and a chromosome from the other parent. In such a system the prospects for applying marker-assisted selection to introduce apomixis to a recipient spe-

cies seem daunting. In contrast, our current data suggest that the apparent homoeology between *Tripsacum* and maize could favour chromosome pairing between the corresponding segments and hence the possibility for recombination to occur. The three RFLP markers (UMC28, UMC62 and CSU68) that co-segregate with diplospory in *T. dactyloides* could well represent a first step in assisting the selection of such recombination events which are necessary for the ultimate production of diplosporous maize.

The question remains of whether the two essential components of apomictic reproduction, in this case diplospory followed by parthenogenesis, are determined by independent or linked genetic factors. Indeed, there is evidence that apomeiotic hybrids lacking parthenogenetic capacities are rarely encountered (Nogler 1984a; Kojima et al. 1994). Moreover, in *Tripsacum* species, as in most apomicts, the presence of the gene(s) responsible for apomeiosis generally results in maternal progenies (Nogler 1984a; Asker and Jerling 1992). This may be interpreted in two ways: either the region controlling diplospory contains a major factor with pleiotropic effects on the other essential components of gametophytic apomixis, or it contains several tightly linked factors each controlling one single component. The risk of selecting purely apomeiotic or diplosporous genotypes in derivatives of *T. dactyloides* by using markers co-segregating with diplospory would, therefore, be proportional to the strength of this linkage.

Perspectives

As already reported by Harlan and de Wet (1977), the pathway of genetic transfer from tetraploid *Tripsacum* to maize goes through (1) maize-*Tripsacum* hybrid backcross generations carrying a decreasing number of *Tripsacum* chromosomes plus the two complete sets of maize chromosomes; and (2) the production of "tripsacoid" maize plants from maize-*Tripsacum* addition lines combining 20 chromosomes from maize and a few from *Tripsacum* (three being the most frequent *Tripsacum* chromosome number).

Such a scheme becomes more complex when the transfer of apomixis is attempted, as a result of the male sterility that drastically affects the first backcross generations (Harlan and de Wet 1977) and of the high numbers of useless individuals derived through apomixis. However, in some rare cases, reduced egg cells are observed (Leblanc et al. 1995), allowing the production of sexual off-types that are the only ones useful for the achievement of the backcross scheme. The determination of the mode of reproduction can be carried out using either cytoembryological analyses in ovules or progeny-tests performed one generation later (Bashaw 1980). Such procedures, however, are destructive (ovule analyses), time-consuming and cannot be carried out before flowering, making them difficult to apply when large numbers of progenies have to be screened and/or when low female fertility occurs. Marker-based selection helps overcome these limitations, allowing an early identification of apomictic genotypes.

The markers reported here will simplify the identification of chromosome addition lines carrying the chromosome of interest, and ultimately maize-*Tripsacum* recombinants. In order to attempt the production of apomictic maize, enhancement of pairing between homoeologous segments of the maize and *Tripsacum* genomes will be attempted following a strategy based on B-A translocations in maize (Beckett 1978). Cytological studies of maize-*Tripsacum* hybrids have shown that B-A translocations might be effective tools for chromosome manipulation and the introduction of *Tripsacum* DNA segments into maize (Kindiger and Beckett 1990).

Wild tetraploid plants obviously do not represent an attractive system for gene isolation via map-based gene cloning. However, if the transfer of apomixis into maize is achieved, a number of avenues for the molecular characterization and isolation of the genes of interest, such as map-based cloning or transposon tagging, open up. Eventually, the introduction of apomixis into other crops through genetic engineering might become possible.

References

- Ahn S, Anderson JA, Sorrells ME, Tanksley SD (1993) Homoeologous relationships of rice, wheat and maize chromosomes. *Mol Gen Genet* 241:483-490
- Asker S, Jerling L (1992) Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton
- Bashaw EC (1980) Apomixis and its implication in crop improvement. In: Fehr WR, Hadley HH (eds) Hybridization of crop plants. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, pp 45-63
- Beckett JB (1978) B-A translocations in maize. *J Hered* 69:27-36
- Bennetzen JL, Freeling M (1993) Grasses as a single genetic system: genome composition, collinearity and compatibility. *Trends Genet* 9:259-261
- Brown WV, Emery HP (1958) Apomixis in the Gramineae: Panicoidae. *Am J Bot* 45:253-263
- Burr B, Burr F, Thompson KA, Albertson MC, Stubber CW (1988) Gene mapping with recombinant inbreds in maize. *Genetics* 118:519-526
- Burua UM, Chalmers KJ, Hackett CA, Thomas WTB, Powell W, Waugh R (1993) Identification of RAPD markers linked to a *Rhynchosporium secalis* resistance locus in barley using near-isogenic lines and bulked-segregant analysis. *Heredity* 71:177-184
- Crane CF, Carman JG (1987) Mechanisms of apomixis in *Elymus rectisetus* from Eastern Australia and New Zealand. *Am J Bot* 74:477-496
- Dumas C, Mogensen HL (1993) Gametes and fertilization: maize as a model system for experimental embryogenesis in flowering plants. *The Plant Cell* 5:1337-1348
- Faure JE, Digonnet C, Dumas C (1994) An in vitro system for adhesion and fusion of maize gametes. *Science* 263:1598-1600
- Galinat WC (1971) The origin of maize. *Annu Rev Gen* 5:447-478
- Gardiner JM, Coe EH, Melia-Hancock S, Hoisington DA, Chao S (1993) Development of a core RFLP map in maize using an immortalized F₂ population. *Genetics* 134:917-930
- Grivet L, D'Hont A, Dufour P, Hamon P, Roques D, Glazmann JC (1994) Comparative mapping of sugarcane with other species within the Andropogoneae tribe. *Heredity* 73:500-508
- Harlan JR, de Wet JMJ (1977) Pathways of genetic transfer from *Tripsacum* to *Zea mays*. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:3494-3497
- Helentjaris T, Slocum M, Wright S, Schaefer A, Nienhuis J (1986) Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet* 72:761-769
- Heredía Diaz (1994) *Maize Genet Coop Newslett* 68:30
- Hoisington D, Khairallah M, González-de-León D (1994) Laboratory protocols, 2nd edn. CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. CIMMYT, México D.F
- Hulbert SH, Richter TE, Axtell JD, Bennetzen JL (1990) Genetic mapping and characterization of sorghum and related crops by means of maize DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4251-4255
- Jefferson RA (1994) Apomixis: a social revolution for agriculture? *The Monitor* 19:14-16
- Kindiger B, Beckett JB (1990) Cytological evidence supporting a procedure for directing and enhancing pairing between maize and *Tripsacum*. *Genome* 33:495-500
- Kojima A, Kozono T, Nagato Y, Hinata K (1994) Non-parthenogenetic plants detected in Chinese chive, a facultative apomict. *Breeding Sci* 44:143-149
- Leblanc O, Peel MD, Carman JG, Savidan Y (1995) Megasporogenesis and megagametogenesis in several *Tripsacum* species (Poaceae). *Am J Bot* 82 (in press)
- Liu CJ, Atkinson MD, Chinoy CN, Devos KM, Gale MD (1992) Non-homoeologous translocations between group 4, 5, and 7 chromosomes within wheat and rye. *Theor Appl Genet* 83:305-312
- Melake Berhan A, Hulbert SH, Butler LG, Bennetzen JL (1993) Structure and evolution of the genomes of *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *Theor Appl Genet* 86:598-604
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked-segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genome regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9828-9832
- Mogie M (1988) A model for the evolution and control of generative apomixis. *Biol J Linn Soc* 35:127-153
- Mohan M, Nair S, Bentur JS, Rao UP, Bennett J (1994) RFLP and RAPD mapping of the rice *Gm2* gene that confers resistance to biotype 1 of the gall midge (*Orseolia oryzae*). *Theor Appl Genet* 87:782-788
- Nogler GA (1984a) Gametophytic apomixis. In: Johri BM (ed) Embryology of angiosperms. Springer-Verlag, Berlin
- Nogler GA (1984b) Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusion. *Bot Helv* 94:411-422
- Ozias-Akins P, Lubbers EL, Hanna WW, McNay JW (1993) Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum* co-inheritance of the trait and molecular markers. *Theor Appl Genet* 85:632-638
- Peel MD (1993) Meicyte callose in aposporic and diplosporic grasses and in hybrids between bread wheat and *Elymus rectisetus*. MS thesis Utah State University
- Penner GA, Chong J, Lévesque-Lemay M, Molnar SJ, Fedak G (1993) Identification of a RAPD marker linked to the oat stem-rust gene *Pg3*. *Theor Appl Genet* 85:702-705
- Pineda O, Bonierbale MW, Plaisted RL, Brodie BB, Tanksley SD (1993) Identification of RFLP markers linked to the *H1* gene conferring the resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Genome* 36:152-156
- Renner O (1916) Zur Terminologie des pflanzlichen Generationswechsels. *Biol Zentralbl* 36:337-374
- Savidan Y (1982) Nature et hérédité de l'apomixie chez *Panicum maximum* Jacq. PhD thesis Université de Paris XI
- Savidan Y, Dujardin M (1992) Apomixie: la prochaine révolution verte? *La Recherche* 241:326-334
- Sherwood RT, Berg CC, Young BA (1994) Inheritance of apospory in buffelgrass. *Crop Sci* 34:1490-1494
- Stuber CW, Wendel JF, Goodman MM, Smith JCS (1988) Techniques and scoring procedures for starch-gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). North Carolina State Experiment Station Technical Bulletin 286.
- Valle CB do, Miles JW (1994) Melhoramento de gramíneas do gênero *Brachiaria*. In: Simposio sobre manejo pastagens, 11. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, pp 1-23

ANNEXE III-5

Can diploid cereals reproduce through apomixis? Evidence from maize-Tripsacum hybrids.

Olivier Leblanc ^{1, 3}, Daniel Grimanelli, Nurul Islam-Faridi ^{1, 2}, Julien Berthaud ³, and Yves Savidan.

(Accepté pour publication dans *Journal of Heredity*)

The French Scientific Research Institute for Development through Cooperation (ORSTOM) and ¹ The International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). Apartado Postal 6-641, 06600 México D. F., México.

phone: (52) 595 421 00; fax number: (52) 5 726 75 59 .

²Current address: Department of Soils & Crop Sciences, Texas A & M University, College Station, TX 77843-2474, USA.

³ Current address: ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex, France.

Abstract. Expression of gametophytic apomixis in wild grasses is restricted to polyploid plants. In our effort to transfer apomixis from diplosporous tetraploid Tripsacum ($2n=72$) into corn through conventional backcrosses, we produced polyhaploid plants combining one complete set of chromosomes from each genus. These polyhaploid plants were totally male sterile. By contrast, they showed high female fertility and seeds were produced apomictically when pollinated with maize. Such polyhaploids are the first case reported of full expression of apomixis in diploid-like condition in grasses; this suggests that diplosporous apomixis might be expressed in diploid crops such as maize or rice.

The relationship between gametophytic apomixis (asexual reproduction through seeds; Nogler, 1984a) and polyploidy is strong (Stebbins, 1950). In agamic complexes, diploids are sexual while polyploids reproduce apomictically. Apomixis expression at the diploid level, though, has been reported but only in a few species and mostly from dicotyledonous taxa (Asker and Jerling, 1992; Nogler, 1984a). As part of our effort to transfer facultative apomixis from diplosporous tetraploid Tripsacum (the closest wild apomictic relative of maize with $x=18$) into corn, we established a collection of several generations of maize-Tripsacum hybrids. From apomictic $2n=56$ (20-maize + 36-Tripsacum chromosomes) BC1 plants, we produced apomictic polyhaploid plants ($2n=28$) combining one haploid set of chromosomes from maize and Tripsacum. Although apomictic polyhaploid plants have already been discovered in aposporous agamic complexes, they were generally weak and sterile (Nogler, 1984a). De Wet et al. (1973), however, already mentioned fertile 28-chromosome plants derivating from maize-Tripsacum hybrids, but neither mode of reproduction nor genomic structure were clearly documented and implications for a possible expression of apomixis in non-polyploid conditions were not discussed. We report here apomixis in one of these maize-Tripsacum polyhaploids, suggesting that this mode of reproduction might be fully expressed in a diploid-like structure.

Materials and Methods

Plant material

28-chromosome polyhaploid plant, BC2#6-529, was obtained through a fairly complex backcrossing scheme from F1#16, a maize-Tripsacum F1 hybrid. F1#16 was initially obtained using a maize

individual from CIMMYT population #34 as pistillate parent and CIMMYT *Tripsacum dactyloides* accession 65-1234, an apomictic tetraploid ($2n=72$) from Evergleades, Florida, USA. Because of complete male sterility in F1#16 and its backcross derivatives, BC2#6-529 was derived from F1#16 after six generations of backcross using maize individuals from CIMMYT population 21 as male progenitors. BC2#6-529 was then pollinated with a maize hybrid (CML62 x CML135, CIMMYT lines), resulting in a progeny of 64 plants.

Chromosome analyses

Chromosome numbers of F1#16 and derivatives in the five backcross generations were determined from root tip squashes. Flow cytometry was then used to estimate the chromosome numbers of BC2#6-529 and of its offspring. Leaf samples were prepared according to Galbraith et al. (1981), and analyzed with a PARTEC CA-II cytometer (Partec GmbH, Otto-Hahn Straße 32, D-48161 Münster, Germany). We also performed fluorescing *in situ* hybridization to determine the chromosome structure of plant BC2#6-529 and several offspring. Chromosome preparations were made following Jewell and Islam-Faridi (1994), and DNA labelling and detection procedures according to Islam-Faridi and Mujeeb-Kazi (1994).

Determining mode of reproduction

Megasporogenesis analyses: pistils from BC2#6-529 and several offsprings were optically cleared for interference contrast microscopy to observe internal morphological details within ovules (Crane and Carman, 1987), and for ultraviolet microscopy for callose fluorescence detection (Peel, 1993). The mode of reproduction was therefore determined according to megasporocyte development and callose deposition patterns (Leblanc et al., 1995).

Fingerprinting analyses for BC2#6-529 progeny testing: total genomic DNA was extracted according to Hoisington et al. (1994) from the *Tripsacum* parent 65-1234, from BC2#6-529, and from 13 offspring (10 morphologically similar to the mother plant and 3 distinct). 10 µg DNA were digested with restriction endonuclease HindIII, electrophoresed and transferred onto nylon membrane. Hybridizations, stringency washes, detection and exposure were made according to Hoisington et al. (1994). We chose maize probes UMC3, UMC8, UMC38, UMC 310, BNL16-06 because they were known to give multiple band patterns from a previous survey of an ORSTOM-CIMMYT *Tripsacum* collection (unpublished data).

Results

Backcrossing scheme

Since Mangelsdorf and Reeves's pioneer work (1931), maize-*Tripsacum* hybrids have been produced by several authors mainly to determine the role of *Tripsacum* in the evolution of maize (Galinat, 1971; Mangelsdorf and Reeves, 1939) or to study the introgressions between maize and *Tripsacum* (de Wet et al. 1972; Harlan and de Wet, 1977; Maguire, 1961). Regarding the transfer of apomixis to maize, maize-*Tripsacum* hybrids were produced by Petrov et al. (1979), but still without success. For this reason, we produced new hybrids between maize and tetraploid *Tripsacum* with the aim to transfer apomixis into maize. Because male sterility affected the F1 hybrids and their derivatives, backcrosses were performed using these maize-*Tripsacum* as female. Progeny from apomictic materials may comprise four types (Asker, 1980): 1) maternal offspring through apomixis; 2) $2n+n$ offtypes (meiosis failure and egg cell fertilization); 3) $n+n$ offtypes through sexuality; and 4) polyhaploid offtypes ($n+0$). Therefore, the following nomenclature was defined to facilitate plant monitoring:

- i) F1s are 46-chromosome plants combining 10 maize (M) and 36 *Tripsacum* (Tr) chromosomes from hybridizations between maize and tetraploid *Tripsacum*; or, also, apomictic progenies from 46-chromosome F1s.
- ii) BC1s are 56-chromosome plants ($20M+36Tr$) arising from fertilization of unreduced female gametes in F1 plants; or, also, apomictic progenies from 56-chromosome BC1s.

- iii) BC2s are offtypes arising from 56-chromosome plants through unreduced female gamete fertilization ($2n=66$, $30M + 36Tr$), or from reduced female gamete fertilization ($2n=38$, $20M + 18Tr$), or from parthenogenetic development of reduced female gamete ($2n=28$, $10M + 18Tr$); or, also, from any BC2 plant through apomixis.
- iv) Similarly, BC3s are offtypes ($2n+n$, $n+n$, $n+0$) found in progenies of apomictic BC2s.

According to this nomenclature, BC2#6-529 was derived as follows:

maize (population #34) x 65-1234 (*T. dactyloides*) → F1#16 → BC1#1001 → BC1#2017 → BC1#3031 → BC1#4031 → BC1#5-8 → BC2#6-529.

Based on the analysis of the derivatives from F1#16, F1 plant #16 and the BC1s #1001, #2017, #3031, #4031 and #5-8 reproduced apomictically.

Chromosomal analyses of BC2#6-529 and its progeny

Plant BC2#6-529 and 52 of its offsprings were estimated to have $2n=28$ using flow cytometry. The twelve remaining plants were estimated to have $2n=38$. BC2#6-529 and all the 28-chromosome plants selected in its progeny we analyzed using *in situ* hybridization showed a $10M + 18Tr$ genomic structure (figure 1a). The 38-chromosome offspring showed a $20M + 18Tr$ structure (figure 1b).

This therefore confirmed that 28-chromosome plants comprise one complete haploid set of chromosomes from *Tripsacum* 65-1234 and one from maize, and therefore have polyhaploid structure somewhat similar to that of a diploid.

Morphology and fertility

BC2#6-529 and its 28-chromosome offspring were morphologically uniform and exhibited a phenotype quite distinct from either *Tripsacum* 65-1234 or accessions of the maize-*Tripsacum* hybrid collection derived from it. All 28- and 38-chromosome plants were male-sterile. Anthers were not dehiscent and pollen completely aborted, possibly as a result of meiotic irregularities. In contrast, viable seeds were produced when the plants were fertilized with maize pollen. However, female fertility was higher in 28-chromosome plants than in any other maize-*Tripsacum* hybrid (F1s, BC1s, 66- and 38-chromosome plants) we have produced to date.

Mode of reproduction

Megasporogenesis in BC2#6-529 and in its 28- and 38- chromosome offspring was characterized by the complete failure of meiosis, as determined using interference-contrast and callose fluorescence observations. No callose was detected during megasporogenesis, and enlarged megasporocytes developed directly into female gametophytes through mitoses. This reproductive pathway is similar to the diplosporous development observed in *T. dactyloides* 65-1234, the apomictic parent from which these plants were derived (Leblanc et al., 1995).

All 28-chromosome plants from BC#6-529 progeny produced the same restriction fragment patterns as the mother plant when hybridized with the five selected maize probes, suggesting that neither recombination nor egg cell fertilization had occurred. Plants with 38 chromosomes showed additional bands which probably originated from the maize pollen thus confirming fertilization of some of the unreduced gametes of BC2#6-529.

$2n=28$ polyhaploids exhibiting the same phenotype have also been found at a very low frequency (<0.5%) in progeny of other BC1 plants derived from 65-1234, and those investigated for mode of reproduction were also apomictic.

Discussion

28-chromosome ($10M + 18Tr$) BC2#6-529 originated through parthenogenetic development of a reduced gamete in 56-chromosome apomictic BC1#5-8. Observations of megasporogenesis and results of progeny testing clearly indicated that the polyhaploid plant BC2#6-529 also reproduced apomictically with the following patterns typical of apomictic reproduction (Bashaw, 1980): (i)

meiosis failure and expression of diplospory; (ii) homogeneity in offspring at the morphological and molecular levels; (iii) high female fertility in an unbalanced chromosomal structure; (iv) presence of $2n+n$ off-types ($2n=20M + 18 Tr$) in a proportion (18.5%) commonly observed in apomictic maize-Tripsacum hybrids derived from plant 65-1234 (unpublished data).

Pathways of genetic transfer from Tripsacum to maize through conventional backcrossing have already been described by Harlan and de Wet (1977). From apomictic maize-Tripsacum BC1 hybrids ($2n=56$), 20-chromosome plants possessing Tripsacum introgressions can be recovered in four steps. However, since our goal is to transfer apomixis and since complete male sterility affects the F1, BC1, and BC2 generations, hybrids that contribute to the next step must be offtypes arising through residual sexuality. The frequency of such offtypes was estimated to be around 3% in T. dactyloides 65-1234 and its derivatives. Addition lines that combine 20 chromosomes from maize and a few from Tripsacum result from 38-chromosome plants. Such $2n=38$ hybrids can be $n+n$ off-types in BC1 progenies, and are expected to segregate for mode of reproduction. Therefore, using this pathway ($46 \rightarrow 56 \rightarrow 38 \rightarrow$ addition lines) and given the low rate of residual sexuality in apomictic BC1 materials, producing and identifying apomictic 38-chromosome hybrids requires the capacity to analyze a large number of BC1 progeny (figure 2). When backcrossed to maize, apomictic 28-chromosome polyhaploids are thus a good source of apomictic 38-chromosome plants, due both to their high fertility and to the frequency of $2n+n$ off types (15 to 20%) in their progeny. This type of backcross is also of great interest for cytogenetic analyses: recovering a 20-chromosome apomictic plant from an apomictic maize-Tripsacum addition line would imply that exchanges of genetic material do occur at meiosis. The particular chromosome constitution of these polyhaploids appears to facilitate the study of the possible pairings between maize and Tripsacum chromosomes. Although pairings and exchanges between maize and Tripsacum have already been reported (Kindiger and Beckett, 1990; Maguire, 1960), the chromosome structure of the polyhaploids may allow researchers to determine whether preferential pairing exists and, if so, which chromosomes are involved.

In aposporous species, gametophytic apomixis is controlled by one dominant allele "A" (reviewed by Asker and Jerling, 1992). Although very few data are available for diplosporous species, diplospory also appears to be under simple genetic control in Eragrostis curvula (Voigt and Bashaw, 1972), and in maize-Tripsacum F1 hybrids that segregate 1:1 for mode of reproduction (Leblanc et al., 1995). All models describing the evolution of apomixis show that, under this single-dominant-gene hypothesis, apomixis eliminates sexuality regardless of the fitness of the carriers of the gene(s) responsible for apomixis (Marshall and Brown, 1981; Pernès, 1972). However, apomixis is not expressed at the diploid level in agamic complexes, though diploid genetic pools do make a large genetic contribution to such complexes: they produce new variability through recombination and at the same time are able to exchange genetic material with polyploids (de Wet, 1968; Savidan and Pernès, 1982). The strong interrelationship between apomixis expression and polyploidy in wild agamic complexes is not well understood, and mechanisms of protection against apomictic reproduction at the diploid level have still to be elucidated. Genetic models such as the allelic-ratio hypothesis which postulate that sterility arises when the proportion of A alleles to a in a given individual is greater than 0.25 (Noirot, 1993), do not fit the $2n=28$ and 38 maize-Tripsacum hybrids described here, for which the allelic ratios are expected to be 0.5 and 0.33, respectively (i. e., assuming that the Tripsacum parental genotype would be Aaaa). Besides, though gametophytic apomixis is found mainly in polyploids in the wild, a few diploid species (largely from dicotyledonous taxa) reproduce apomictically (Asker and Jerling, 1992). Apospory is also expressed in a trisomic hybrid form ($2n+1$) of Ranunculus (Nogler, 1984b). Dihaploids obtained from apomicts in the Bothriochloa-Dichanthium complex (de Wet, 1968) and in Panicum maximum (Savidan, 1982) were either sexual and fertile or potentially apomictic, as aposporous embryo sacs were observed, but sterile.

Apomixis in fairly fertile polyhaploids from apomicts has already been reported in Ranunculus argoviensis (Nogler, 1984a), and in two derivatives ($2n=21$ and $2n=23$) from interspecific hybrids between Pennisetum glaucum L. ($x=7$) and wild Pennisetum species ($x=9$) (Dujardin and Hanna, 1986; Hanna et al., 1992). Note, however, that given the basic chromosome numbers in Pennisetum,

we would conclude that the 21- and 23-chromosome Pennisetum polyhaploids do not have, as claimed by the authors, a diploid-like structure. Thus, contrary to the authors' conclusions, those Pennisetum polyhaploids do not indicate the possibility of apomixis expression in non-polyploid plants.

The $2n=28$ chromosome structure reported in this paper (10 maize chromosomes with 18 from the wild species) is, to our knowledge, the first reported case in a grass genus in which diplosporous apomixis is normally expressed and functional in a diploid-like condition.

References

- Asker S, 1980. Gametophytic apomixis: elements and genetic regulation. *Hereditas* 93: 277-293.
- Asker S and Jerling L, 1992. Apomixis in Plants. Boca Raton, California: CRC Press.
- Bashaw EC, 1980. Apomixis and its implication in crop improvement. In: Fehr WR and Hadley HH (eds) Hybridization of crop plants. American Society of Agronomy, Madison, Wis.; 45-63.
- Crane CF and Carman JG, 1987. Mechanisms of apomixis in Elymus rectisetus from Eastern Australia and New Zealand. *Amer. J. Bot.* 74: 477-496.
- de Wet MJM, 1968. Diploid-tetraploid-haploid cycles and the origin of variability in Dichanthium agamospecies. *Evolution* 22: 394-397.
- de Wet MJM, Harlan JR, Lambert RJ, and Engle LM, 1972. Introgression from Tripsacum into Zea and the origin of maize. *Caryologia* 25: 25-31.
- de Wet MJM, Harlan JR, Engle LM, and Grant CA, 1973. Breeding behavior of maize-Tripsacum hybrids. *Crop Sci.* 13: 254-256.
- Dujardin M and Hanna WW, 1986. An apomictic polyhaploid obtained from a pearl millet x Pennisetum squamulatum apomictic interspecific hybrid. *Theor. Appl. Genet.* 72: 33-36.
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, and Firoozabady E, 1981. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220: 1049-1051.
- Galinat WC, 1971. The origin of maize. *Ann. Rev. Genetics* 5: 447-478.
- Hanna WW, Dujardin M, Ozias-Akins P, and Arthur L, 1992. Transfer of apomixis in Pennisetum. In: International Workshop on Apomixis in Rice, Changsa, People's Republic of China, Jan. 13-15 1992 (Wilson K. J., ed.). Canberra, Australia: Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture (CAMBIA); 23-29.
- Harlan JR and de Wet MJM, 1977. Pathways of genetic transfer from Tripsacum to Zea mays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3494-3497.
- Hoisington D, Khairallah M, and González-de-Leon D, 1994. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Second Edition. Mexico D. F.: CIMMYT.
- Islam-Faridi MN and Mujeeb-Kazi A, 1994. Visualization of Secale cereale DNA in wheat germplasm by in situ hybridization. *Theor. Appl. Genet.*, in press.
- Jewell DC and Islam-Faridi N, 1994. A technique for somatic chromosome preparation and C-banding of maize. In: The maize Handbook. (M. Freeling and V. Walbot. eds.). Springer-Verlag. New-York; 484-493.
- Kindiger B and Beckett JB (1990). Cytological evidence supporting a procedure for directing and enhancing pairing between maize and Tripsacum. *Genome* 33: 495-500.
- Leblanc O, Peel M, Carman JG, and Savidan Y, 1995. Megasporogenesis and megagametogenesis in several Tripsacum species (Poaceae). *Am. J. Bot* 82 : 57-63.
- Leblanc O, Grimanelli D, González de León D, and Savidan Y (1995) Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-Tripsacum hybrids using maize RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* (sous presse)
- Maguire MP, 1960. A study of pachytene chromosome pairing in maize-Tripsacum hybrid derivative. *Genetics* 45: 651-664.
- Maguire MP, 1961. Divergence in Tripsacum and Zea chromosomes. *Evolution* 15:394-400.
- Mangelsdorf PC and Reeves RG, 1931. Hybridization of maize, Tripsacum and Euchlaena. *J. Hered.* 22: 329-343.

- Mangelsdorf PC and Reeves RG, 1939. The origin of Indian corn and its relatives. Texas. Agr. Exp. Sta. Bull. 574.
- Marshall DR and Brown HD, 1981. The evolution of apomixis. *Heredity* 47:1-15.
- Noirot M, 1993. Allelic ratios and sterility in the agamic complex of the Maximae (Panicoideae): evolutionary role of the residual sexuality. *J. Evol. Biol.* 6: 95-101.
- Nogler GA, 1984a. Gametophytic apomixis. In: *Embryology of Angiosperms*, Johri B. M. (ed.). Berlin: Springer-Verlag; 475-518.
- Nogler GA, 1984b. Genetics of apospory in apomictic Ranunculus auricomus V. conclusion. *Bot. Helv.* 94: 411-422.
- Peel MD, 1993. Meicyte callose in aposporic and diplosporic grasses and in hybrids between wheat and Elymus rectisetus. (MS dissertation). Logan, Utah: Utah State University.
- Pernès J, 1972. Organisation évolutive d'un groupe agamique: la section des Maximae du genre Panicum (Graminées). (PhD dissertation). Paris, France: Univ. of Paris.
- Petrov DF, Belousa NI, and Fokina ES, 1979. Inheritance of apomixis and its elements in corn-Tripsacum hybrids. *Genetika* 15: 1827-1836.
- Savidan Y, 1982. Embryological analysis of facultative apomixis in Panicum maximum Jacq. *Crop Sci.* 22: 467-469.
- Savidan Y and Pernès J, 1982. Diploid-tetraploid-dihaploid cycles and the evolution of Panicum maximum Jacq. *Evolution* 36: 596-600.
- Stebbins GL, 1950. *Variation and Evolution in Plants*. Columbia University Press, New York.
- Voigt PW and Bashaw EC, 1972. Apomixis and sexuality in Eragrostis curvula. *Crop Sci.* 12: 843-847

Figure legends

Figure 1. Root tip metaphases from 28- and 38-chromosome maize-Tripsacum hybrids (a and b respectively) after genomic fluorescing *in situ* hybridization, using total genomic DNA from T. dactyloides 65-1234 as a probe (yellow-labelled chromosomes are from the wild species while the red-labelled ones are from maize). Photograph (a) clearly shows the diploid-like structure in 28-chromosome polyhaploid hybrids that combine 10 maize chromosomes and 18 from the wild species. A 38-chromosome plant, combining one haploid chromosome set from Tripsacum and the complete chromosome stock from maize, is shown in (b).

Figure 2. Pathways of production of apomictic 38-chromosome hybrids from apomictic maize-Tripsacum F1 hybrids. F1, BC1, and BC2 generations are totally male sterile. Therefore, among 56-chromosome BC1 progenies, the fraction arising through residual sexuality is the only one that contributes to the next step. In the 46Æ56Æ38 scheme, apomictic 38-chromosome hybrid production represents an important bottleneck, because of the expected segregation for mode of reproduction in the 3% fraction of n+n offspring coming from residual sexuality. Although 28-chromosome polyhaploids are rarely recovered, they are easily multiplied through apomixis, and therefore strengthen the production of apomictic 38-chromosome hybrids through fertilization of unreduced gametes (2n+n offsprings).

Figure 1.

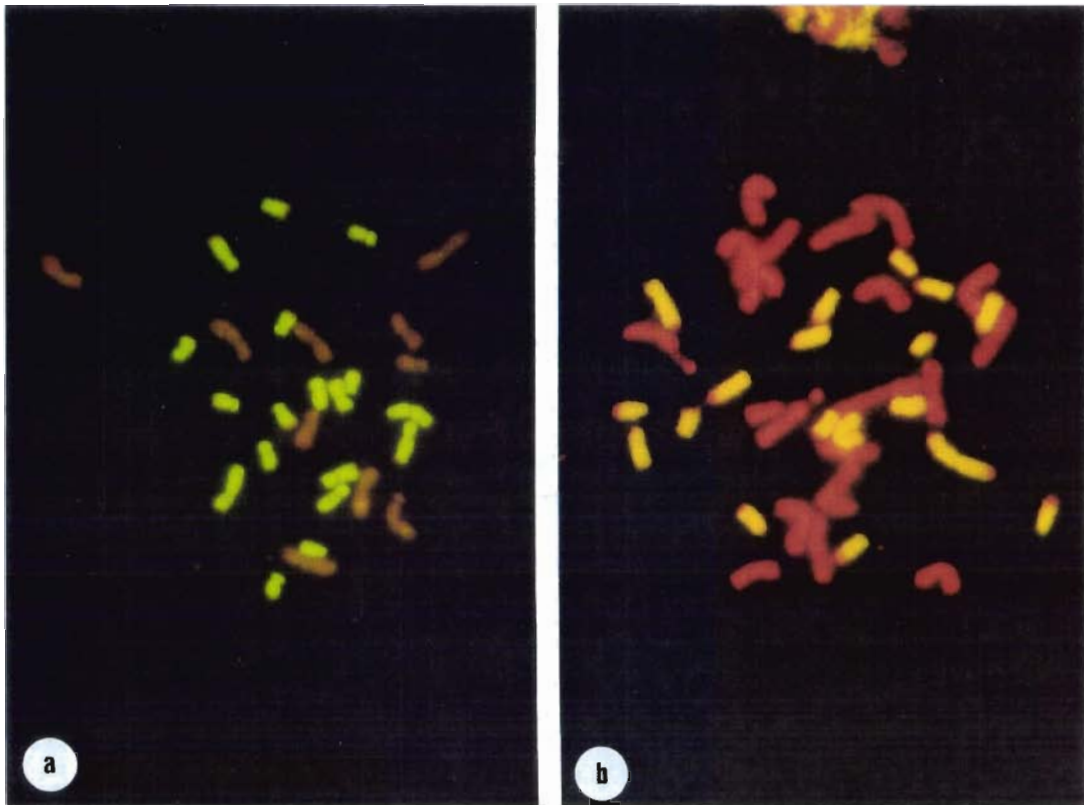
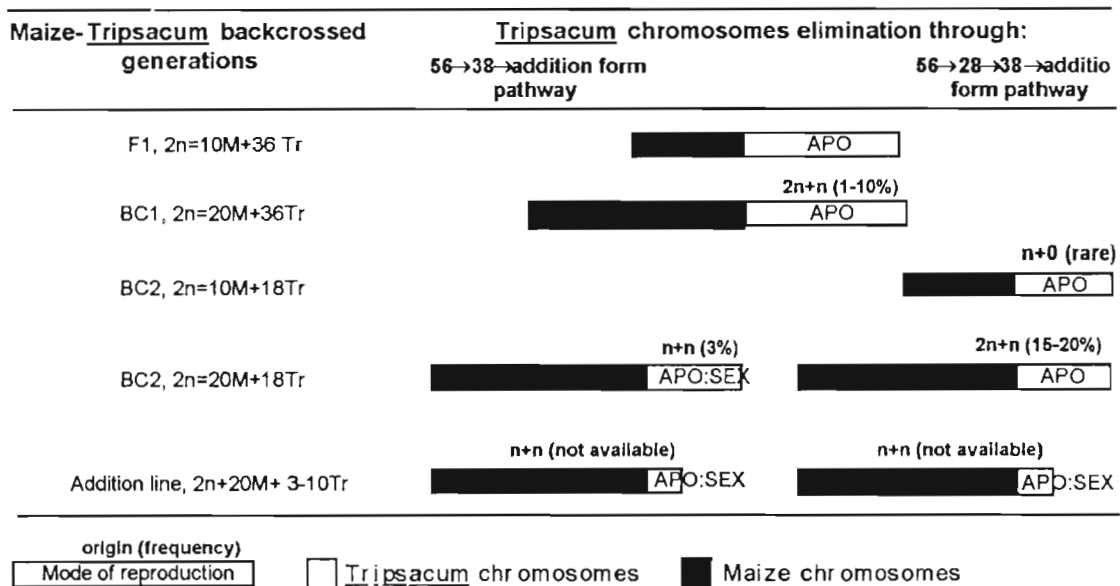


Figure 2.



PARTIE IV

SYNTHESE &

CONCLUSIONS GENERALES

La très grande majorité des travaux concernant l'apomixie gamétophytique a été réalisée chez des espèces aposporiques du type *Panicum*, certainement en raison de l'identification assez aisée de ce mode de reproduction. En ce qui concerne les autres types, les études sont beaucoup moins nombreuses. La diplosporie a longtemps été considérée comme très difficile à étudier car l'observation porte uniquement sur la mégasporogénèse et non sur des structures pluricellulaires différenciées (Bashaw 1980). L'une des difficultés de l'étude des modes de reproduction apomictiques est liée aux deux éléments qui les caractérisent. Si la non réduction est bien connue, la parthénogénèse est un aspect qui n'a presque pas été abordé. Les résultats présentés dans ce document apportent un certain nombre de réponses aussi bien sur l'aspect descriptif de l'apomixie diplosporique que sur la nature des facteurs à l'origine de ce mode de reproduction. La production et l'analyse de différentes générations d'hybrides maïs-*Tripsacum* ont été d'une aide précieuse pour l'étude génétique de la diplosporie et de son expression. Ces générations représentent les premières étapes du transfert de l'apomixie chez le maïs.

A. APOMIXIE CHEZ *TRIPSACUM*

1. Hérité et expression des facteurs responsables de l'apomixie

L'analyse des modes de reproduction chez les hybrides F1 maïs-*Tripsacum* suggère une hérédité monogénique et dominante de la diplosporie, et l'identification d'une région génomique unique impliquée dans l'expression de ce caractère renforce ce résultat. Les formes tétraploïdes sont simplex pour l'allèle responsable de la non réduction. L'hypothèse d'une liaison forte entre les facteurs génétiques responsables de la diplosporie et de la parthénogénèse ou d'un effet pléiotropique du facteur responsable de la diplosporie permet d'extrapoler raisonnablement ce résultat à l'apomixie (Leblanc *et al.* 1995c).

L'analyse des modes de reproduction au cours des différentes générations montre l'influence du contexte génétique dans lequel les facteurs responsables de l'apomixie s'expriment. La ségrégation pour la non réduction observée chez les hybrides F1 maïs-*Tripsacum* (1:1) n'est conservée ni chez les BC2 à 38 chromosomes, ni chez les polyhaploïdes à 28 chromosomes. Le mode de reproduction de ces BC2 dépend étroitement du nombre de chromosomes ; alors que les hybrides $2n=38$ sont sexués, ceux à $2n=28$ se reproduisent apomictiquement. De plus, tous les descendants obtenus à partir de BC2 à 38 chromosomes sont issus de la fécondation d'un gamète réduit par un noyau mâle maïs ($2n=20M+2-14Tr$). Bien que les germinations aient été réalisées en tube, de possibles polyhaploïdes ont pu être éliminés (faible vigueur). Cependant, vu les taux de germination importants (>80%), l'apparition de tels individus ne semble pas être fréquente. Ceci suggère que, chez les BC2 à 38 chromosomes, la production de gamètes réduits est associée à la perte de l'aptitude à la parthénogenèse.

Les ségrégations observées chez les hybrides F1 maïs-*Tripsacum* sont le résultat d'événements de recombinaison au niveau tétraploïde ; les gamètes produits sont alors diploïdes, et hétérozygotes pour l'allèle responsable de la diplosporie (le parent est simplex pour cet allèle). Le niveau BC1 combine les génomes *Tripsacum* et maïs à l'état diploïde, et la réduction d'une telle structure chromosomique conduit à la production de gamètes réunissant un stock haploïde de chacun des génomes. L'hypothèse que l'allèle A, responsable de l'aposporie, soit aussi un facteur léthal récessif a été proposée par Nogler (1984a), mais n'a jamais été clairement démontrée. Une hypothèse similaire peut être avancée pour expliquer nos résultats : l'association d'un facteur léthal récessif avec la région du génome responsable de la diplosporie aurait pour conséquence l'élimination des gamètes produits par les hybrides BC1 et porteurs de cette association. Les possibilités de restriction à la recombinaison détectée dans la région responsable de la non réduction (Leblanc *et al* 1995c) pourraient rendre compte d'une telle organisation du génome, dont l'importance évolutive serait fondamentale (protection du niveau diploïde contre l'apomixie). Sous cette hypothèse, la faible proportion de polyhaploïdes (5.1% de l'ensemble des BC2 obtenus à partir de gamètes réduits chez les BC1) traduirait de rares événements de recombinaison ayant permis l'élimination du facteur léthal récessif. Les hybrides BC2 à 28 et 38 chromosomes doivent donc correspondre à des structures alléliques différentes, reflétant les événements de recombinaison dans la région du génome concernée et à l'origine des ségrégations observées. Cependant, sur la base de marqueurs RFLP appartenant au même groupe de liaison que les marqueurs associés à l'apomixie (D. Grimanelli, ORSTOM-CIMMYT, non publié), cette hypothèse n'a pas encore été totalement confirmée. Néanmoins, quels que soient les mécanismes responsables des ségrégations observées, les polyhaploïdes détectés dans les descendance des hybrides à 56 chromosomes suggèrent que l'apomixie peut s'exprimer dans un contexte génétique diploïde (Leblanc *et al.* 1995d).

En l'absence de matériels *Tripsacum* exploitables pour l'analyse des facteurs génétiques contrôlant la réalisation de l'apomixie, les hybrides maïs-*Tripsacum* ont constitué une source d'informations importante d'où sont tirés les résultats obtenus concernant aussi bien l'hérédité de ces facteurs que les conditions nécessaires à leur expression. La production de génotypes tétraploïdes sexués devrait permettre l'établissement de différentes générations de croisements en ségrégation pour les modes de reproduction (Leblanc *et al.* 1995b), et une analyse plus approfondie de l'hérédité de l'apomixie chez *Tripsacum*, et de ses différents composants.

2. Hypothèses sur les effets des facteurs génétiques responsables de l'apomixie

La mégasporogénèse chez les formes sexuées est caractérisée par des dépôts de callose au niveau des parois des mégasporocytes et des mégaspores des diades et tétrades. La dégradation progressive, du pôle chalazal vers le pôle micropylaire, de cette callose marque la fin de la méiose. La mégaspore au pôle chalazal se différencie en sac embryonnaire immédiatement après qu'elle ait été libérée. Le premier signe de cette différenciation est un accroissement du volume de la cellule par vacuolisation. Les 3 mégaspores au pôle micropylaire commencent à dégénérer avant que la callose ait entièrement été dégradée. Chez les formes diplosporiques du type *Antennaria* et *Taraxacum*, l'avortement de la méiose est associée à l'absence de callose lors de la mégasporogénèse. En ce qui concerne le développement de type *Antennaria*, bien que la vacuolisation soit beaucoup plus marquée chez les formes apomictiques, les mégasporocytes ont un comportement similaire à celui des mégaspores réduites des tétrades qui se différencient en sacs embryonnaires.

La mégasporogénèse s'apparente donc à un processus de différenciation des mégasporocytes en promégagamétophytes, et correspond plus à un développement gamétophytique que méiotique.

21. Rôle de la callose dans la mégasporogénèse

Rodkiewicz (1970) a montré que, chez les espèces présentant un développement mono- et bisporique des sacs embryonnaires, la callose est synthétisée dans les parois des méiocytes femelles et de leurs produits. Elle est aussi caractéristique de la microsporogénèse. Les travaux de Heslop-Harrison et Mackenzie (1967) ont montré que lors de la microsporogénèse chez *Lilium*, elle agit comme un filtre moléculaire assurant l'isolement de la cellule mère des microspores de signaux de reconnaissance provenant des tissus sporophytiques adjacents et pouvant réprimer le programme de mise en place de la méiose. Cependant, le rôle de la callose dans la sporogénèse est encore mal connu. Des travaux plus récents sur la microsporogénèse remettent partiellement en cause cette hypothèse, montrant que la callose est loin d'être une structure imperméable (Rodriguez-Garcia et Majewska-Sawka 1992). De plus, l'absence de callose ne conduit pas forcément à l'avortement de la méiose (espèces à développement tétrasporique du sac embryonnaire, Rodkiewicz 1970).

Une autre action de la callose pourrait être son influence sur la plasticité des mégasporocytes. Le développement diplosporique de type *Antennaria* est caractérisé par une forte vacuolisation des cellules, difficilement envisageable en sa présence. De même, l'une des premières modifications que subissent les mégasporocytes survivantes des tétrades est un fort accroissement du volume cellulaire, suggérant l'influence de celui-ci sur l'induction des premières divisions de la mégagamétogenèse. Il est aussi intéressant de noter qu'il existe des similarités entre la synthèse de callose au cours de la reproduction sexuée et de l'embryogenèse somatique : chez différentes espèces, l'un des premiers événements visibles lors de la production d'embryons somatiques est la synthèse d'une paroi callosique autour des cellules embryogènes (trèfle, Maheswaran et Williams 1985 ; chicorée, Dubois *et al.* 1989 ; cocotier, Verdeil, CIRAD-CP, communication personnelle).

Le fait que la synthèse de callose soit associée chez de nombreuses espèces à des événements méiotiques indique qu'elle doit jouer un rôle prépondérant dans leur réalisation ; chez *Tripsacum*, la relation synthèse de callose et mode de reproduction est stricte. Nous avons montré qu'un seul gène est responsable de la diplosporie (Leblanc *et al.* 1995c). Son action est certainement directement ou indirectement liée à la synthèse de callose lors de la mégasporogenèse.

22. Non fécondation de l'oosphère et parthénogenèse

Les modalités de la mégagamétogenèse sont identiques pour les deux modes de reproduction (nombre de divisions et durée). Cependant, les sacs embryonnaires non réduits sont produits plus précocement que les réduits, et sont donc désynchronisés par rapport au développement floral. L'hypothèse que cette désynchronisation soit à l'origine d'une perte de réceptivité de l'oosphère au moment de la décharge du tube pollinique a été avancée (Leblanc et Savidan 1994). Chez *Paspalum notatum*, une graminée aposporique, la pollinisation précoce et forcée conduit à la production d'individus $2n+n$, alors qu'en conditions naturelles tous les descendants sont de type maternel ($2n+0$) (Martínez *et al.* 1994). La diplosporie aurait donc pour conséquence de limiter la double fécondation classique des angiospermes (oosphère et cellule centrale) à une simple (ou double) fécondation de la cellule centrale. Une telle hypothèse présuppose donc un rôle passif du gamète femelle lors de la fécondation. Ceci semble être en contradiction avec les résultats obtenus chez les descendants des BC1 obtenus après réduction ($2n=28$ et 38) : les gamètes à l'origine de ces hybrides sont issus de processus de la reproduction sexuée pour laquelle il y a synchronisme entre le développement des sacs embryonnaires, la floraison et la capture du pollen. Or, il est intéressant de noter que, seuls les gamètes ayant l'aptitude à la diplosporie, ne sont pas fécondés. Ceci suggère que le gamète femelle puisse interagir soit avec le noyau reproducteur mâle, soit avec les structures adjacentes pour empêcher la fécondation.

Les mécanismes à l'origine de la non fécondation de l'oosphère n'ont pas été étudiés au cours de ce travail, ni chez d'autres espèces apomictiques. Cependant, différents types peuvent être envisagés : fusion des gamètes impossible en raison de modifications physico-chimiques des membranes ou des parois de l'oosphère ; perturbation des signaux de reconnaissance cellulaire entre les gamètes au niveau, soit de leur production (état physiologique de l'oosphère), soit de leur transmission (nature des membranes). Il en est de même pour les événements au moment de la fécondation, et notamment quels peuvent être les signaux échangés entre le noyau reproducteur et l'oosphère. L'absence de fécondation de l'oosphère n'impose pas un rôle passif au gamète mâle, et rien n'indique que ce soit la fusion des noyaux à l'origine de l'albumen (indispensable à la formation d'une graine viable) qui déclenche le développement parthénogénétique de l'oosphère. D'autres hypothèses telles que une induction par un début de fusion des gamètes qui avorte par la suite ou par l'oosphère elle-même (programmation interne) doivent être prise en compte.

3. Intérêts de la diplosporie

L'aposporie et la diplosporie sont les deux modalités de l'apomixie gamétophytique. Elles ont parfois été présentées comme le résultat des mêmes facteurs génétiques, mais s'exprimant à des phases différentes du développement (Nogler 1984a). L'aposporie se surimpose à la méiose, et ne semble pas la modifier de façon fondamentale : les processus méiotiques sont associés à des dépôts de callose, et l'initiation des cellules nucellaires en sacs embryonnaires aposporiques est toujours observée une fois la première division méiotique réalisée, et jusqu'à la dégénérescence des tétrades (Peel 1993).

Au contraire, le développement diplosporique est caractérisé par une perturbation de la mise en place du programme contrôlant la méiose des mégasporocytes. Les hybrides à $2n=112$ et $2n=76$ correspondant à des doublements chromosomiques spontanés ont été détectés uniquement dans des descendances de plantes mères apomictiques ; ils résultent eux aussi de perturbations des processus méiotiques, dont l'origine est peut être à rapprocher des facteurs génétiques responsables de la diplosporie. La non réduction de type diplosporique s'apparente donc à une mutation du processus méiotique.

L'étude de la production des gamètes (méiose, différenciation des macrospores) et de la double fécondation au niveau moléculaire et cellulaire est récemment devenu un des champs d'activité les plus passionnants de la biologie de la reproduction chez les végétaux. La maîtrise de différentes technologies telles que la transformation génétique ou la fécondation *in vitro* ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude de l'expression de gènes et pour la compréhension des mécanismes régulant

la fécondation (Dumas et Mogensen 1993, Faure *et al.* 1994, Pelletier et Bechtold 1994). L'apomixie gamétophytique de type diplosporique représente alors dans ce contexte un modèle intéressant pour l'analyse de différentes étapes fondamentales de la reproduction sexuée : quels pourraient être les effets sur la mégasporogénèse de l'introduction d'une construction génétique combinant un promoteur d'ovule et un gène dégradant la callose chez une plante sexuée? Est-il possible de réaliser des fécondations *in vitro* à partir de gamètes femelles issus d'un processus apoméiotique? Comparaison des ADNc impliqués dans chacun des développements et étude de leur spécificité. Les *Tripsacum* apomictiques sont des plantes sauvages et polyploïdes qui se prêtent difficilement à ce genre d'approches (génome complexe et peu connu, forte hétérozygotie) ; cependant, si le programme de transfert de l'apomixie dans une plante modèle comme le maïs aboutit, elles seront alors envisageables.

B. TRANSFERT DE L'APOMIXIE AU MAÏS

1. Réalisation du schéma de transfert

La stérilité mâle des premières générations d'hybrides maïs-*Tripsacum* impose le côté femelle comme voie de transfert de matériel génétique au moins jusqu'au niveau "lignées d'addition". La situation est compliquée par le caractère même à introduire ; en effet, le passage d'une étape à l'autre est un goulot d'étranglement car seuls des individus hors types y contribuent. La synthèse des travaux de Harlan et de Wet sur les transferts génétiques de *T. dactyloides* au maïs (1977) suggère qu'il est possible de produire directement des hybrides apomictiques à $2n=38$ à partir du niveau BC1, mais la fréquence d'apparition de tels génotypes n'est pas mentionnée. Dans notre étude, tous les hybrides BC2 à 38 chromosomes analysés se reproduisent par sexualité. La production de plantes apomictiques à 38 chromosomes à partir de l'hybride apomictique F1-16 (maïs x *T. dactyloides* 65-1234) ne fait pas appel à la sexualité, mais à deux catégories de hors types, $2n+n$ (passage de 46 à 56 chromosomes et de 28 à 38 chromosomes) et $n+0$ (passage de 56 à 28 chromosomes). De plus, l'une de ces catégories correspond à une polyhaploïdisation dont la fréquence est très rare (<0.2% pour l'ensemble des descendances de BC1). La sexualité (réduction, fécondation) n'intervient finalement pour la première fois que pour la production de "lignées d'addition".

La réalisation de ce schéma de transfert repose donc sur la détermination des nombres chromosomiques d'un nombre important d'hybrides. La production d'un nombre important de descendants semble *a priori* difficilement compatible avec la faible fertilité observée au cours des premières étapes du transfert. Elle a cependant pu être compensée par la multiplication des géniteurs, soit par apomixie (cas des BC1), soit par multiplication *in vitro* (cas des BC3 apomictiques à $2n=38$).

Le criblage des descendances basé sur la cytométrie en flux est particulièrement performant par sa simplicité et sa rapidité (jusqu'à 200 plantes par jour). Cette approche a permis l'analyse systématique des descendants à un stade très jeune, et avant repiquage ; seuls les génotypes recherchés ont alors été conservés. Par ailleurs, la détection d'événements rares importants (polyhaploïdisation) a été favorisée.

2. Faisabilité du transfert

L'apomixie chez *Tripsacum* semble être un caractère à déterminisme génétique simple, pour lequel nous disposons aujourd'hui de techniques cytoembryologiques d'identification rapides et fiables (Leblanc *et al.* 1995a, 1995e). Par ailleurs, l'identification de marqueurs moléculaires associés à l'apomixie chez le parent sauvage permet la détermination précoce (avant floraison) des modes de reproduction chez les hybrides maïs-*T. dactyloides* 65-1234 (Leblanc *et al.* 1995c). Ces marqueurs ont aussi permis de détecter des homéologies entre une région du génome du maïs et la région responsable de la diplosporie chez *T. dactyloides* 65-1234.

Nous avons aussi montré que l'expression de l'apomixie diplosporique dans un contexte non polyploïde est possible. Finalement, les possibilités de transmission des facteurs génétiques responsables de l'apomixie diplosporique restent la seule véritable inconnue ; la production d'un hybride apomictique et fertile, issu d'un processus sexué (réduction, fécondation) à partir d'une plante à 38 chromosomes, représente la garantie de la faisabilité du transfert. L'obtention de "lignées d'addition" maïs-*Tripsacum* apomictiques, actuellement en cours au CIMMYT, représente donc une étape décisive dans le transfert de l'apomixie. L'importance de cette étape est aussi liée aux possibilités de recouvrement d'une fertilité mâle, même partielle. Il serait alors possible de renverser le sens du croisement, et donc d'obtenir des plantes toutes issues de reproduction sexuée : fécondation d'un gamète femelle réduit maïs par un noyau mâle produit par une lignée d'addition. Chaque grain de pollen étant issu d'une méiose, il y aurait une augmentation considérable des possibilités de recombinaison entre les deux génomes. D'après N. Islam-Faridi (Université Texas A&M, communication personnelle), l'introggression de matériel génétique *Tripsacum* chez le maïs peut-être très importante puisqu'il a détecté, par hybridation *in situ*, jusqu'à 7 segments introgressés chez un maïs issu d'un programme de rétrocroisement. Plus que de forcer la recombinaison entre les deux génomes par des techniques de cultures *in vitro* qui dans certains cas favorisent les réarrangements chromosomiques (Phillips *et al.* 1990), il apparaît donc plus judicieux de la diriger pour favoriser les recombinaisons entre la région *Tripsacum* responsable de la diplosporie et la région homéologue du maïs (utilisation de lignées de maïs B-A transloquées ; Partie I-D-1 et Leblanc *et al.* 1995c).

C PERSPECTIVES-CONCLUSIONS GENERALES

Le transfert de l'apomixie chez les céréales demeure un véritable défi. L'objectif du programme ORSTOM-CIMMYT, lorsqu'il a été initié en 1989, était de produire un maïs apomictique avant l'an 2000. L'effort consenti depuis 5 ans a permis de caractériser l'apomixie chez *Tripsacum* et d'avancer le transfert jusqu'à un stade décisif. Bien que le nombre de "lignées d'addition" jusqu'à présent produites soit trop faible pour tirer des conclusions, l'obtention d'un maïs apomictique peut être raisonnablement envisagée à court terme. La collection d'hybrides BC3 apomictiques est aujourd'hui constituée d'environ 1700 individus ; d'ici l'été 1995, 10 à 15000 descendants devraient être analysés. Trois axes de recherches peuvent alors être développés tant au niveau fondamental qu'appliqué :

i) étude de la mise en place de la méiose et de la fécondation aux niveaux moléculaire et cellulaire ;

ii) marquage et isolation du ou des gènes de l'apomixie pour le transfert à d'autres plantes cultivées ;

iii) obtention de données expérimentales sur l'évolution de la structure des variétés en régime de reproduction apomictique et pour l'évaluation du risque biologique lié à l'introduction de l'apomixie dans les variétés traditionnelles.

Les stratégies pour le développement des agricultures des pays en voie de développement, et notamment du continent africain, n'ont jusqu'ici pas eu les effets escomptés ; l'expérience nous a appris qu'une approche globale telle que l'introduction de variétés très performantes dans les systèmes de cultures ne peut pas s'appliquer à toutes les situations. L'amélioration des plantes en milieu tropical doit donc trouver des stratégies pour identifier des gènes d'intérêt et les introduire dans les variétés traditionnelles. Que ces gènes soient de résistance aux maladies et parasites, d'adaptation à la sécheresse, d'utilisation de l'azote, ou d'apomixie, ils peuvent tous contribuer à l'augmentation des rendements sans déstabiliser les équilibres socio-économiques et environnementaux.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmad F, Comeau A (1991) Production, morphology, and cytogenetics of *Triticum aestivum* (L.) thell x *Elymus scabrus* (R. Br.) Löve intergeneric hybrids obtained by *in ovulo* embryo culture. Theor Appl Genet 81 : 833-839.
- Ahn S, Anderson JA, Sorrells ME, Tanksley SD (1993) Homoeologous relationships of rice, wheat and maize chromosomes. Mol Gen Genet 241 : 483-490.
- Anderson E (1944) Cytological observations on *Tripsacum dactyloides*. Ann Mo Bot Gard 31 : 317-323.
- Asker S (1979) Progress in apomixis research. Hereditas 91 : 231-240.
- Asker S, Jerling L (1992) Apomixis in Plants. CRC Press, Boca Raton, Floride.
- Babcok EB, Steebins GL (1938) The American species of *Crepis* : Their relationships and distribution as affected by polyploidy and apomixis. Carnegie Inst Wash Publ 504 : 1-200.
- Bashaw EC (1980) Apomixis and its implication in crop improvement. In : Fehr WR, Hadley HH (eds) Hybridization of crop plants. Am Soc Agr, Madison, Wis., pp 45-63.
- Beckett JB (1978) B-A translocations in maize. J Hered 69 : 27-36.
- Bennetzen JL, Freeling M (1993) Grasses as a single genetic system: genome composition, collinearity and compatibility. Trends Genet 9 : 259-261.
- Bergquist RR (1981) Transfer from *Tripsacum dactyloides* to corn of a major gene locus conditioning resistance to *Puccinia sorghi*. Phytopathology 7 : 518-520.
- Bernard S, Jewell DC (1985) Crossing maize with *Sorghum*, *Tripsacum* and millet : the product and their level of development following pollination. Theor Appl Genet 70 : 474-483.
- Berthaud J (1995) Apomixis and management of diversity. In : Savidan Y et Carman JG (eds), Apomixis Handbook. FAO, Rome (en preparation).
- Berthaud J, Savidan Y (1989) Genetic resources of *Tripsacum* and gene transfer to maize. In : Mujeeb-Kazi A and Sitch LA (eds), Review of advances in plant biotechnology, 1985-1988. 2d International Symposium on Genetic Manipulation in Crops. Mexico D. F., Mexico, and Manila, Philippines: CIMMYT and IRRI, pp. 121-130.
- Birchler JA, Alfenito MR (1993) Marker systems for B-A translocation in maize. J Hered 84 : 135-138.
- Brown WW, Emery HP (1958) Apomixis in the Gramineae : Panicoideae. Am J Bot 45 : 253-263.
- Carman JG, Crane CC, Riera-Lizarazu O (1991) Comparative histology of cell walls during meiotic and apomeiotic megasporogenesis in two hexaploid Australasian *Elymus* species. Crop Sci 31 : 1527-1532.
- Carman JG, Wang RR-C (1992) Apomixis in Triticeae. In : Elgin JH, Miksche JP (eds) Proc Apomixis Workshop. USDA-ARS, ARS-104, pp 26-29.
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci Sinica 18†: 659-668.

- Cleij G, de Bock TSM, Lekkerkerker B (1976) Crosses between *Beta vulgaris* L. and *Beta lomatogona* F.. *Euphytica* 25 : 539-547.
- Crane CF et Carman JG (1987) Mechanisms of apomixis in *Elymus rectisetus* from eastern Australia and New Zeland. *Am J Bot* 74 : 477-496.
- Cutler HC, Anderson E (1941) A preliminary survey of the genus *Tripsacum*. *Ann Mo Bot Gard* 28 : 249-269.
- D'Amato F (1984) Role of polyploidy in reproductive organs and tissues. *In* : Embryology of Angiosperms, BM Johri (ed), Springer-Verlag, Berlin, pp 519-566.
- Darlington CD (1939) The evolution of genetic systems. Cambridge University Press, Cambridge.
- De Laat AMM, Göhde W, Vogelzang MJDC, (1987) Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. *Plant Breeding* 99 : 303-307.
- de Wet JMJ (1968) Dihaploid-tetraploid-haploid cycles and the origin of variability in *Dichanthium* agamospecies. *Evol* 22 : 394-397.
- de Wet JMJ, Gray JR, Harlan JR (1976) Systematics of *Tripsacum*. *Phytologia* 33 : 203-227.
- de Wet JMJ, Harlan JR, Engle LM, Grant CA (1973) Breeding behaviour of maize-*Tripsacum* hybrids. *Crop Sci* 13 : 254-256.
- de Wet JMJ, Timothy DH, Hilu KW, Fletcher GB (1981) Systematics of South American *Tripsacum* (Gramineae). *Am J Bot* 68 : 269-276.
- Dubois T, Guedira M, Dubois J, Vasseur J (1990) Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium* : Is callose an early marker? *Ann Bot* 64 : 539-545.
- Dujardin M, Hanna WW (1983) Apomictic and sexual pearl millet x *Pennisetum squamulatum*. *J Hered* 74 : 277-279.
- Dujardin M, Hanna WW (1984) Cytogenetics of double cross hybrids between *Pennisetum americanum*-*Pennisetum purpureum* amphiploïds and *P. americanum* x *Pennisetum squamulatum* interspecific hybrids. *Theor Appl Genet* 69 : 97-100.
- Dujardin M, Hanna WW (1985) Cytology and reproduction of reciprocal backcrosses between pearl millet and sexual and apomictic hybrids of pearl millet x *Pennisetum squamulatum*. *Crop Sci* 25 : 59-62.
- Dujardin M, Hanna WW (1989a) Crossability of pearl millet with wild *Pennisetum* species. *Crop Sci* 29 : 77-80.
- Dujardin M, Hanna WW (1989b) Developing apomictic pearl millet - characterization of a BC3. *J Genet and Plant Breeding* 43 : 145-151.
- Dumas C, Mogensen HL (1993) Gametes and fertilization : Maize as a model system for experimental embryogenesis in flowering plants. *The Plant Cell* 5 : 1337-1348.
- Faure JE, Digonnet C, Dumas C (1994) An in vitro system for adhesion and fusion of maize gametes. *Science* 263 : 1598-1600.
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NA, Sharma DP, Firoozaboby E (1983) A rapid flow cytometric analysis of cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220 : 1049-1051.
- Gale MD, Miller TE (1987) The introduction of alien genetic variation into wheat. *In* : Lupton FGH (ed) *Wheat breeding*. Chapman et Hall, Londres, pp 173-210.
- Galinat WC (1971) The origin of maize. *Ann Rev Gen* 5 : 447-478.
- Galinat WC, Chaganti RSK, Hager FD (1964) *Tripsacum* as a possible amphidiploid of wild maize and *Manisuris*. *Harvard U Bot Mus L* 20 (9) : 289-316.
- Gerstel DU, Mishanec WM (1950) On the inheritance of apomixis in *Parthenium argentatum*. *Bot Gaz* 112 : 96-106.

- Grivet L, D'Hont A, Dufour P, Hamon P, Roques D, Glazmann JC (1994) Comparative mapping of sugarcane with other species within the Andropogoneae tribe. *Heredity* 73 : 500-508.
- Guignard L (1899) Sur les anthérozoïdes et la double copulation sexuelle chez les végétaux angiospermiens. *Rev Gen Bot* 11 : 129-135.
- Gustafsson Å (1947) Apomixis in higher plants. Part III. Biotype and species formation. *Lunds Universitets Årsskrift Nova Series*. 43 : 183-370.
- Hair JB (1956) Subsexual reproduction in *Agropyron*. *Heredity* 10 : 129-160.
- Hanna WW (1979) Interspecific hybrids between pearl millet and fountaingrass. *J Hered* 70 : 425-427.
- Hanna WW (1987) Utilization of wild relatives of pearl millet. Proceeding of the International Pearl Millet Workshop, 7-11 Avril 1986, ICRISAT Center, India, Patancheru, pp 33-42.
- Hanna WW, Bashaw EC (1987) Apomixis : its identification and use in plant breeding. *Crop Sci* 27 : 1136-1139.
- Hanna WW, Dujardin M (1982) Apomictic interspecific hybrids between pearl millet and *Pennisetum orientale* L. C. Rich. *Crop Sci* 22 : 857-859.
- Hanna WW, Dujardin M, Ozias-Akins P, Lubbers E, Arthur L (1993) Reproduction, cytology, and fertility of pearl millet x *Pennisetum squamulatum* BC4 plants. *J Hered* 84 : 213-216.
- Harlan JR, Brooks MH, Bargaonkar DS, de Wet JMJ (1964) Nature and inheritance of apomixis in *Bothriochloa* and *Dichanthium*. *Bot Gaz* 125 : 41-46.
- Harlan JR, de Wet JMJ (1975) On Ö. Wing and a Prayer: The origin of polyploidy. *Bot Rev* 41 : 361-390.
- Harlan JR, de Wet JMJ (1977) Pathways of genetic transfer from *Tripsacum* to *Zea mays*. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 : 3494-3497.
- Harlan JR, de Wet JMJ, Naik SM, Lambert RJ (1970) Chromosome pairing within genomes in maize-*Tripsacum* hybrids. *Science* 167 : 1247-1248.
- Heslop-Harrison J, Mackenzie A (1967) Autoradiography of soluble 2-¹⁴C thymidine derivatives during meiosis and megasporogenesis in *Lilium* anthers. *J Cell Sci* 2 : 387-400.
- Heslop-Harrison JS, Leitch AR, Schwarzacher T, Ananthawat-Jonsson K (1990) Detection and characterization of 1B/1R translocations in hexaploid wheat. *Heredity* 65 : 385-392.
- Iltis HH (1983) From teosinte to maize : the catastrophic sexual transmutation. *Science* 222 : 886-894.
- Izmailow R (1967) Observations in embryo and endosperm development in various chromosomic types of the apomictic species *Ranunculus cassubicus* L.. *Acta Biol Cracov Ser Bot* 10 : 99-111.
- Jaffé W, Rojas M (1994) Maize hybrids in Latin America : issues and options. *The Monitor* 19 : 6-8.
- James J (1979) New maize x *Tripsacum* hybrids for maize improvement. *Euphytica* 28 : 239-247.
- Jayawal RK, Fernandez MA, Schroeder RG (1990) Isolation and characterization of a *Pseudomonas* strain that restricts growth of various phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol* 56 : 1053-1058.
- Jefferson RA (1994) Apomixis : A social revolution for agriculture? *The Monitor* 19 : 14-16.
- Jewell DC, Islam-Faridi N (1994) A technique for somatic chromosome preparation and C-banding of maize. In: Freeling M et Walbot V(eds) *The Maize Handbook*, Springer-Verlag, New-York; pp 484-493.
- Kindiger B, Beckett JB (1990) Cytological evidence supporting a procedure for directing and enhancing pairing between maize and *Tripsacum*. *Genome* 33 : 495-500.
- Kojima A, Kozono T, Nagato Y, Hinata K (1994) Non-parthenogenetic plants detected in Chinese Chive, a facultative apomict. *Breeding Science* 44 : 143-149.

- Laikova LI (1976) Cytoembryological study of maize x *Tripsacum* hybrids. In : Petrov DF (ed), Apomixis and its role in evolution and plant breeding. Russian translation series 22, AA Balkema Rotterdam, pp 79-87.
- Le HT, Armstrong KC, Miki B (1989) Detection of rye DNA in wheat-rye hybrids and wheat translocation stocks using total genomic DNA as a probe. *Plant Mol Biol Reporter* 7 : 150-158.
- Leblanc O, Savidan Y (1994) Timing of megasporogenesis in *Tripsacum* species (Poaceae) as related to the control of apomixis and sexuality. *Pol Bot Stud* 8 : 75-81.
- Leblanc O, Peel MD, Carman JG, Savidan Y (1995a) Megasporogenesis and megagametogenesis in several *Tripsacum* species (Poaceae). *Am J Bot* 82 : 57-63.
- Leblanc O, Dueñas M, Hernández M, Bello S, Garcia V, Berthaud J, Savidan Y (1995b) Chromosome doubling in *Tripsacum* : The production of artificial sexual tetraploid plants. *Plant Breeding* 114 (sous presse).
- Leblanc O, Grimanelli D, González-de-León D, Savidan Y (1995c) Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-*Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers. *Theor Appl Genet* (sous presse)
- Leblanc O, Grimanelli D, Islam-Faridi N, Berthaud J, Savidan Y (1995d) Can diploid cereals reproduce through sexuality? Evidence from maize-*Tripsacum* hybrids. *J Hered* (accepté pour publication)
- Leblanc O, Mazzucato A (1995e) Screening procedures to identify and quantify apomixis. In : Savidan Y et Carman JG (eds), *Apomixis Handbook*, FAO Rome (en préparation).
- Lin BY (1984) Ploidy barrier to endosperm development in maize. *Genetics* 107 : 103-115.
- Littlejohn GM, de V. Pienaar R (1995) *Thinopyrum distichum* addition lines : Production, morphological and cytological characterisation of 11 disomic addition lines and stable addition-substitution line. *Theor Appl Genet* 90 : 33-42.
- Liu ZW, Wang RRC, Carman JG (1994) Hybrids and backcross progenies between wheat (*Triticum aestivum* L.) and apomictic Australian wheatgrass [*Elymus rectisetus* (Nees in Lehm.) A. Löve & Connor] : karyotypic and genomic analyses. *Theor Appl Genet* 89 : 599-605.
- Lopes MA, Larkins BA (1993) Endosperm origin, development, and function. *The Plant Cell* 5 : 1383-1399.
- Maguire MP (1960) A study of pachytene chromosome pairing in maize-*Tripsacum* hybrid derivative. *Genetics* 45 : 651-664.
- Maguire MP (1962) Common loci in corn and *Tripsacum*. *J Hered* 53 : 87-88.
- Maheswaran G, Williams EG (1985) Origin and development of somatic embryos formed directly on immature embryos of *Trifolium repens* *in vitro*. *Ann Bot* 38 : 619-630.
- Mangelsdorf PC (1983) The mystery of corn : new perspectives. *Proc Am Phil Soc* 127 : 215-247.
- Mangelsdorf PC, Reeves RG (1931) Hybridization of maize, *Tripsacum*, and *Euchlaena*. *J Hered* 22 : 339-343.
- Martínez E.J, Espinoza F, Quarín CL (1994) B_{III} progeny (2n+n) from apomictic *Paspalum notatum* obtained through early pollination. *J Hered* 85 : 295-297.
- Mendel G (1869) Über einige aus künstlicher Befruchtung gewonnene *Hieracium*-Bastarde. *Ostwalds Klassiker der ex. Wiss.* 121.
- Miller TE, Reader SM (1987) A guide to the homoeology of chromosomes within the Triticeae. *Theor Appl Genet* 74 : 214-217.
- Mogie M (1988) A model for the evolution and control of generative apomixis. *Biol J Linn Soc* 35 : 127-153.
- Müntzing A (1940) Further studies on apomixis and sexuality in *Poa*. *Hereditas* 26 : 115-190.

- Nawaschin S (1898) Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgänge bei *Lilium martagon* und *Fritillaria tenella*. Bull Acad Imp Sci St Petersburg 33 : 39-47.
- Nogler GA (1984a). Gametophytic apomixis. In : Embryology of Angiosperms, BM Johri (ed), Springer-Verlag, Berlin, pp 475-518.
- Nogler GA (1984b) Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus* V. Conclusion. Bot Helv 94 : 411-422.
- Ostenfeld CH (1910) Further studies on the apogamy and hybridization of the Hieracia. Z. indukt Abstamm 3 : 241-285.
- Ozias-Akins P, Lubbers EL, Hanna WW (1992) Molecular research on apomixis in *Pennisetum*. In : Elgin JH, Miksche JP (eds) Proc Apomixis Workshop. USDA-ARS, ARS-104, pp 26-29.
- Ozias-Akins P, Lubbers EL, Hanna WW, McNay JW (1993) Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum* : co-inheritance of the trait and molecular markers. Theor Appl Genet 85 : 632-638.
- Peel MD (1993) Meiocyte callose in aposporic and diplosporic grasses and in hybrids between bread wheat and *Elymus rectisetus*. Master in Sciences, Utah State University, Logan, Utah, USA, pp 1-83.
- Pelletier G, Bechtold N (1994) Connaître le génome des plantes. La Recherche 254 : 1197-1199.
- Petrov DF, Belousova NI, Fokina ES, Laikova LI, Iatsenko RM, Sorokina TP (1984) Transfer of some elements of apomixis from *Tripsacum* to maize. In : Petrov DF (ed) Apomixis and its role in evolution and plant breeding. Russian translation series 22, AA Balkema Rotterdam, pp 9-78.
- Phillips RL, Kaeppler SM, Peschke VM (1990) Do we understand somaclonal variation? In : Progress in Plant Cellular and Molecular Biology, Hijkamp HJJ, Van der Plas LHW, van Aartrijk J (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Pays Bas, pp.131-141.
- Powers L (1945) Fertilization without reduction in guayule (*Parthenium argentatum* Gray) and a hypothesis as to the evolution of apomixis and polyploidy. Genetics 30 : 323-346.
- Randolph LF (1955) Cytogenetic aspects of the origin and evolutionary history of corn. In : Corn and Corn Improvement, Academic Press, New York, pp 16-61.
- Randolph LF (1970) Variation among *Tripsacum* populations of Mexico and Guatemala. Brittonia 22 : 305-337.
- Reddy PS, d'Cruz R (1969) Mechanism of apomixis in *Dicanthium annulatum* (Forssk) Stapf. Bot Gaz 130 : 71-79.
- Reeves RG, Mangelsdorf PC (1935) Chromosome numbers in relatives of *Zea mays*. Am Nat 69 : 633-635.
- Renner O (1916) Zur Terminologie des pflanzlichen Generationswechsels. Biol Zentralbl 36 : 337-374.
- Richard AJ (1973) The origin of *Taraxacum* agamospecies. Bot J Linn Soc 66 : 189-211.
- Rodkiewicz B (1970) Callose in cell walls during megasporogenesis in angiosperms. Planta 93 : 39-47.
- Rodriguez-Garcia MI, Majewska-Sawka A (1992) Is the special callose wall of microsporocytes an impermeable barrier? J Exp Bot 43 : 1659-1653.
- Savidan Y (1982) Hérité et nature de l'apomixie chez *Panicum maximum* Jacq. Trav Doc ORSTOM 153, pp 1-159.
- Savidan Y, Dujardin M (1992) Apomixie : la prochaine révolution verte? La Recherche 241 : 326-334.
- Savidan Y, Pernès J (1978) Diploid-tetraploid-dihaploid cycles and the evolution of *Panicum maximum* Jacq. Evol 36 : 596-600.

- Schwarzacher T, Anamthawat-Jonsson K, Harrison GE, Islam IKMR, Jia JZ, King IP, Leitch AR, Miller TE, Reader SM, Rogers SM, Shi M, Heslop-Harrison JS (1992) Genomic *in situ* hybridization to identify alien chromosomes and chromosome segments in wheat. *Theor Appl Genet* 84 : 778-786.
- Schwarzacher T, Leitch AR, Bennett MD, Heslop-Harrison JS (1989) *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann Bot* 64 : 315-324.
- Sherwood RT, Berg CC, Young BA (1994) Inheritance of apospory in buffelgrass. *Crop Sci* 34 : 1490-1494.
- Simone GW, Hooker AL (1976) Monogenic resistance in corn to *Helminthosporium turcicum* derived from *Tripsacum floridanum*. *Proc Am Phytopathol Soc* 3 : 207.
- Snyder LA (1957) Apomixis in *Paspalum secans*. *Am J Bot* 44 : 318-324.
- Sørensen T (1958) Sexual chromosome-aberrants in triploid apomictic *Taraxacum*. *Bot Tidsskr* 54 : 1-22.
- Stebbins GL (1950) *Variation and Evolution in Plants*, Columbia University Press, New York.
- Stuber CW, Wendel JF, Goodman MM, Smith JCS (1988) Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). North Carolina State Experiment Station Technical Bulletin 286.
- Talbert LE, Doebley JF, Larson S, Chandler VL (1990) *Tripsacum andersonii* is a natural hybrid involving *Zea* and *Tripsacum* : molecular evidence. *Am J Bot* 77 : 722-726.
- Taliaferro CM, Bashaw EC (1966) Inheritance and control of obligate apomixis in breeding buffelgrass, *Pennisetum ciliare*. *Crop Sci* 6 : 473-476.
- Tinney FW (1940) Cytology of parthenogenesis in *Poa pratensis*. *J Agr Res (Washington)* 60 : 351-360.
- Torabinejad J, Mueller J (1993a) Genome constitution of the Australian hexaploid grass *Elymus scabrus* (Poaceae : Triticeae). *Genome* 36 : 147-151.
- Torabinejad J, Mueller J (1993b) Genome analysis of intergeneric hybrids of apomictic and sexual Australian *Elymus* species with wheat, barley, and rye. *Theor Appl Genet* 86 : 288-294.
- Valle CB do, Miles JW (1992) Breeding of apomictic species. *Apomixis Newsletter* 5 : 37-47.
- Valle CB do, Miles JW (1994) Melhoramento de gramíneas do gênero *Brachiaria*. In : Simposio sobre manejo pastagens, 11. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, pp 1-23.
- Voigt PW, Bashaw EC (1972) Apomixis and sexuality in *Eragrostis curvula*. *Crop Sci* 12 : 843-847.
- Warmke HE (1954) Apomixis in *Panicum maximum*. *Am J Bot* 41 : 5-11.
- Winkler H (1908) Über Parthenogenesis und Apogamie im Pflanzenreich. *Progr Rei Bot* 2 : 293-454.



COPIES SERVICE RAPIDE

34980 St-Géry-du-Pas - Tél. 07 84 27 66

Centre de Traitement de Documents Scientifiques

Abstract

The *Tripsacum* genus ($x=18$, Poaceae) is a Mexican wild relative of maize ($x=10$). Most species are polyploid (3x, 4x, 5x, et 6x), and modes of reproduction are closely linked to ploidy level. Diploids are sexual, whereas polyploid forms reproduce through apomixis. Apomixis, an asexual reproduction through seeds, is characterized by the production of unreduced female megagametophytes and parthenogenetic development of egg cells into embryos. Introduction of such mode of reproduction into crops would open new areas in plant breeding and might increase yields in Third World countries. ORSTOM in collaboration with CIMMYT initiated in 1989 a programme to move genes responsible for apomixis into maize. From tetraploid *T. dactyloides* 65-1234, various generations of maize-*Tripsacum* hybrids were derived. Addition lines combining 20 chromosomes from the crop and 1 to 14 from the wild species were recovered.

No reduction in *Tripsacum* is of the Antennaria type of diplospory : megaspore mother cells directly differentiate into embryo sacs through mitoses. Among the different cytoembryological features of the modes of reproduction, callose is the most significant one : callose synthesis, that is observed throughout meiosis, does not occur during diplosporous development. A simple inheritance of diplospory, dominant over sexuality, was observed in a maize-*Tripsacum* F1 family. However, the nature of the linkage between diplospory and parthenogenesis is still unknown, and the expression of the genetic factors responsible for diplospory seem to be complex. The production of polyhaploid hybrids combining 10 chromosomes from maize and 18 from *Tripsacum* suggests that apomixis may be expressed in diploid conditions : the hypothesis of a recessive lethal factor linked with diplospory has been proposed. It might explain the strong relationship between apomixis and polyploidy.. In *T. dactyloides*, a single region responsible for apomixis expression and showing lower recombination rates was identified and enhanced these results. The production of sexual tetraploid plants through colchicine treatment of diploid genotypes allowed the establishment of populations that segregate for the modes of reproduction. They should give us a more precise genetic analysis of apomixis in *Tripsacum*.

The homoeology detected between this region and the distal part of maize chromosome 6 allows to design strategies to direct pairings, and force the recombination between these homoeologous segments to obtain maize plants that reproduce apomictically.

Key words : *Tripsacum* - apomixis - diplospory - callose - meiosis - *Zea mays* - intergeneric hybrids -bulk segregant analysis - flow cytometry - sexual tetraploids

Résumé

Tripsacum ($x=18$, Poacées) est un genre sauvage originaire du Mexique, et apparenté au maïs ($x=10$). La plupart des espèces sont polyploïdes ($3x$, $4x$, $5x$, et $6x$), et les modes de reproduction sont étroitement associés au niveau de ploïdie ; les formes diploïdes sont sexuées, alors que les polyploïdes se reproduisent apomictiquement. L'apomixie, ou multiplication asexuée par graines, se caractérise par la production de sacs embryonnaires non réduits dont les oosphères se développent parthénogénétiquement en embryons. L'introduction d'un tel mode de reproduction chez les plantes cultivées pourrait avoir un impact aussi bien sur les schémas d'amélioration que sur les rendements des variétés traditionnelles des pays en voie de développement. Un programme de transfert de l'apomixie au maïs a été initié par l'ORSTOM en collaboration avec le CIMMYT en 1989. A partir d'une introduction tétraploïde, *T. dactyloides* 65-1234, différentes générations d'hybrides maïs-*Tripsacum* ont été dérivées après rétrocroisement par le maïs. Des lignées d'addition, combinant les 20 chromosomes de l'espèce cultivée et 2 à 14 chromosomes de l'espèce sauvage ont été produites.

Chez *Tripsacum*, la non réduction est du type Antennaria de la diplosporie : les cellules mères des mégaspores se différencient en sacs embryonnaires directement par mitoses. Parmi les différents indicateurs cytoembryologiques des modes de reproduction qui ont été identifiés, la callose apparaît comme le plus significatif : l'avortement de la méiose est associé à une absence de synthèse de callose lors de la mégasporogénèse, alors qu'elle est caractéristique des formes sexuées. L'analyse génétique des modes de reproduction dans une famille d'hybrides F1 maïs-*T. dactyloides* indique une hérédité simple de l'apomixie, et dominante sur la sexualité. Cependant, cette simplicité n'est qu'apparente. En effet, la nature de la liaison entre non réduction et parthénogénèse reste très largement inconnue, et les conditions nécessaires à l'expression des facteurs génétiques responsables de la diplosporie semblent complexes. L'obtention d'hybrides polyhaploïdes combinant 18 chromosomes de l'espèce sauvage et 10 provenant du maïs suggère que l'expression de l'apomixie est possible en conditions diploïdes : l'hypothèse d'un facteur récessif létal et associé à la diplosporie qui rendrait compte de la relation modes de reproduction/ploïdie a été faite. Chez *T. dactyloides*, l'identification, sur la base de marqueurs moléculaires RFLP cartographiés chez le maïs, d'une seule région génomique impliquée dans l'expression de l'apomixie et présentant une restriction à la recombinaison renforce ces résultats. La production de plantes tétraploïdes sexuées après doublement à la colchicine de génotypes diploïdes a permis de constituer des familles en ségrégation pour les modes de reproduction chez *Tripsacum*. Elles devraient permettre une analyse génétique plus approfondie de l'apomixie.

L'homéologie détectée entre la région responsable de l'apomixie et la partie distale du chromosome 6 du maïs permet aussi d'envisager le développement de stratégies pour forcer les appariements, et induire des recombinaisons qui pourront être à l'origine de maïs apomictiques.

Mots clés : *Tripsacum* - apomixie - diplosporie - callose - méiose - *Zea mays* - hybridation intergénérique - "bulk segregant analysis" - cytométrie en flux - tétraploïdes sexués.