UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

D.E.A. D' AMELIORATION DES PLANTES

L' OBTENTION DE POLYPLOIDES AU TRAVERS DE DEUX MATERIELS :

LE CAFERIER ET LA LUZERNE

NOIROT Michel

1975

Documentation ORSTOM

D.E.A d' Amélioration des plantes

L' OBTENTION DE POLYPLOIDES AU TRAVERS DE DEUX MATERIELS : LE CAFEIER ET LA LUZERNE

- - - - - -

M. N O I R O T Michel

J'exprime toute ma reconnaissance à M. CHARRIER pour son aide morale et matérielle apportée au cours des travaux réalisés sur le caféier à MADAGASCAR et de la rédaction de ce rapport.

M. NOIROT

S O M M A I R E

Introduction : p.1

Chapitre I : Données bibliographiques p.3

A. Utilisation de la colchicine p.3

1. Le type de matériel traité p.4

2. Le support de la colchicine p.5

3. L'interaction concentration-durée de traitement p.6

4. Les autres facteurs p.7

a) L'asphyxie p.7

b) L'index mitotique et la vigueur p.7

c) La dominance apicale p.8

d) La pénétration de la colchicine p.8

B. Le tri des polyploides : le problème des chimères périclines p.9

1. Le problème des chimères périclines p.9

2. Les principaux caractères utilisés p.12

a) La forme de la feuille p.12

b) La densité stomatique p.13

c) La longueur du stomate p.14

d) Le diamètre des grains de pollen p.14

e) Les autres caractères p.14

2. L'isolement des rejets p.15

Chapitre II : L'obtention de polyploides chez le caféier p.17

A. Nouvelles modalités apportées au traitement sur bourgeons axillaires p.17

B. L'isolement et la confirmation des polyploides p.27

1. Le tri des bourgeons p.27

2. La mise au point d'une méthode de confirmation p.28

a) L'étude des caractères au niveau diploide p.30

* La forme de la feuille p.30

* La longueur du stomate p.31

* La densité stomatique p.32

b) Le choix du seuil p.35

C. Quelques caractéristiques foliaires p.37

1. Action de la polyploidie sur le rapport d'allométrie foliaire p.37

a) Sur les feuilles de l'axe orthotrope p.37

b) Sur les feuilles de l'axe plagiotrope p.37

2. Relation entre niveau de ploidie et longueur du stomate p.42
3. Rôle de la duplication chromosomique sur la densité stomatique p.42

Chapitre III : L'obtention de polyploides chez la luzerne p.47
A. Le traitement sur graines prégermées p.47
B. L'isolement des types sexuellement tétraploides p.50
1. L'étude du caractère"forme du foliole médian" au niveau diploide p.50
2. Le choix du seuil de rejet p.55

Chapitre IV : Discussion p.57
A. Utilisation de la colchicine p.57
1° Lors du traitement sur graines p.57
2° Lors du traitement sur bourgeons axillaires p.62
B. L'isolement et la confirmation des polyploides p.65

Chapitre V : Conclusions p.71

L'OBTENTION DE POLYPLOIDES AU TRAVERS DE DEUX MATERIELS : LE CAFEIER ET LA LUZERNE.

- - - - - - - -

Ces deux plantes présentent plusieurs pools géniques séparés par des barrières à la reproduction. Afin d'exploiter les caractères intéressants de ces différents pools, des programmes d'hybridation interspécifique furent organisés. Dans les deux genres, l'induction de la polyploidie apparait comme un outil permettant l'égalisation préalable des niveaux de ploidie. Chez le caféier, la restauration de fertilité d'hybrides interspécifiques F1 stériles a aussi été envisagée par la duplication chromosomique. Les études sur la polyploidisation réalisées chez ces deux plantes respectivement à MADAGASCAR et à ORSAY aboutissent aux mêmes conclusions; d'où leur réunion dans une synthèse commune.

La technique de duplication chromosomique sur bourgeons axillaires, mise au point par BERTHOU en Côte d'Ivoire au cours des années 1968-69 fût adoptée chez le caféier. Sur la Côte Est malgache, le manque de vigueur des caféiers en parc à bois sous ombrière et le lessivage de la partie traitée par les pluies nous ont obligé à revoir les conditions d'application. Une extension de la technique à des clônes peu vigoureux fût possible grâce à l'apport d'eau de coco et à l'utilisation d'une émulsion à la lanoline comme support de la colchicine . L'obtention pour un

génotype donné de plusieurs formes différenciables par des caractères foliaires nous fit penser à la présence de cytochimères stables. En raison de leur incidence dans les futurs croisements, une méthode de tri et de confirmation fut mise au point.

Chez la luzerne, le but a été moins de décrire de nouvelles modalités que d'essayer de mettre au point une méthode de tri précoce, semblable à celle utilisée pour le caféier. La présence chez le genre Médicago d'une modification continuelle de la forme de la feuille au cours de la croissance nous a permis d'étendre la technique à un cas plus général.

Au cours de ce rapport ,nous allons envisager successivement:

- les données bibliographiques
- l'obtention de polyploides chez le caféier et la luzerne
- à la lumière des données apportées par les précédents auteurs,une discussion sur les travaux relatés ici
- en conclusion, les problèmes posés par la polyploidisation et les moyens d'y remédier

I. Données bibliographiques

A. Utilisation de la colchicine

Depuis 1937, où BLAKESLEE traita des graines de Datura par immersion pendant dix jours dans une solution de colchicine à 0,2%, le nombre de modalités décrites dans la littérature n'a cessé de se diversifier. Cependant, la multiplicité apparente des données ne doit pas nous empêcher de ressortir les grandes caractéristiques du traitement à la colchicine. Certains auteurs (DOMMERGUES 1951, ESSAD et CACHON 1965, BERTHAUT 1965 et DERMEN 1938 à 1965) apportent de précieux renseignements par leur analyse méthodologique du problème . Les diverses techniques utilisées diffèrent par le type de matériel traité (graines,plantules et méristèmes caulinaires),par le support de la colchicine (eau, glycérine,lanoline, agar agar,etc...),par la concentration (0,01% à 2%); par le temps de traitement (30mn à 10 jours) et par divers autres facteurs (température, agents mouillants,vide etc...).

1. Le type de matériel traité

Si BLAKESLEE fut le premier en 1937 a obtenir des polyploides par traitement de graines à la colchicine, il fut aussi le premier à traiter des plantules cotylédonnaires. Cependant avec cette dernière technique, il n'obtint au début que des modifications qu'il ne sut fixer. Chez les plantes pérennes ,les avantages des bourgeons axillaires apparurent très tôt (DERMEN et SCOTT 1938, DERMEN 1954,etc...).

L'obtention de polyploides artificiels par la colchicine chez le caféier fut réussie en 1939 par MENDES sur graines prégermées (35 jours). Depuis le traitement sur graines a été repris de façon intensive par CAPOT en 1968 en Côte d'Ivoire.L'utilisation de plantules cotylédonnaires a permis aussi à VISHVESHWARA et CHINNAPPA (1965) d'obtenir des autotétraploides de Coffea canephora .Plus recemment, au cours de travaux réalisés en 1968-69, BERTHOU (1975) a mis au point une technique de traitement sur bourgeons axillaires. Parallelement, SONDHAL , MONACO et CARVALHO (1972) ont aussi réussi la polyploidisation par instillation de colchicine au niveau des méristèmes avec une micropipette.

Chez la luzerne, la plupart des techniques utilisées se réfèrent au traitement sur graines prégermées. Cependant LESINS 1955 préfèrent le traitement de plantules cotylédonnaires diminuant ainsi une mortalité liée à l'action toxique de la colchicine sur les racines. En 1970, KHOSROWCHAHLI obtient des tétraploides de Medicago sativa par traitement de bourgeons axillaires permettant ainsi des comparaisons rigoureuses diploide-tétraploide chez cette espèce.

2. Le support de la colchicine

Si le milieu aqueux est le plus universellement utilisé, certains auteurs ont envisagé pour le traitement de plantules cotylédonnaires ou de méristèmes caulinaires soit l'utilisation de supports lipidiques comme la lanoline (BLAKESLEE 1937) ou la glycérine (DERMEN 1954), soit de supports rétenteurs du milieu aqueux comme l'agar agar (EVANS 1954) ou le coton hydrophile (DERMEN 1954, KHOSROWCHAHLI 1970).

Chez le cafeier, l'eau est le seul support employé jusqu'à présent .(MENDES 1939, VISHVESHWARA et CHINNAPPA 1965, CAPOT 1968, BERTHOU 1975, SONDHAL MONACO et CARVALHO 1972).

Chez la luzerne, KHOSROWCHAHLI en 1970 utilise le coton hydrophille pour maintenir la goutte

aqueuse au niveau des bourgeons axillaires.

3. L'interaction concentration-durée de traitement

En 1951, DOMERGUES met en évidence sur l'orge une interaction entre la concentration et le temps d'immersion des graines. Ainsi pour des concentrations de 0,1% , 0,05% , 0,025% et 0,01% il note des durées de traitement optimales respectivement de 19h , 22h , 36h et 64h. Si la plupart des auteurs ont utilisé des concentrations variant de 0,01% à 2% , les valeurs optimales semblent se situer vers 0,05% (BERTHAUT 1965, ESSAD et CACHON 1965) pour une durée de traitement variant entre 12 et 32h.

Chez le caféier, nous trouvons des concentrations de 0,15% pour un temps d'immersion de 4 jours (MENDES 1939), de 0,5% (VISHVESHWARA et CHINNAPPA 1965) et de 1% à 2% avec 24h de traitement (CAPOT 1968).

Chez la luzerne, LESINS trempe la partie aérienne de ces plantules dans une solution à 0,07% de colchicine pendant 6h . KHOSROWCHAHLI traite les bourgeons axillaires avec des concentrations de 0,1 et 0,15% .

4. Les autres facteurs

a) L'asphyxie

En 1965, ESSAD et CACHON montre sur l'orge un effet toxique de l'asphyxie en synergie avec la colchicine lors du traitement par immersion de graines prégermées. Il est à noter que DOMMERGUES, en 1951, immerge ses grains d'orge au minimum pour éviter un effet d'asphyxie. Cet effet observé sur les racines doit être relié à la toxicité qui apparait avec les supports inertes plus imperméables à l'oxygène lors du traitement de bourgeons axillaires (DERMEN 1954).

b) L'index mitotique et la vigueur

Le rôle du taux de cellule en division est capital lors du traitement à la colchicine. BERTHAUT en 1965 le démontre et préconise l'emploi de substancesdites de croissance comme la kinétine et l'AIA. Les températures optimales de la division cellulaire correspondent dans la littérature aux températures de traitement préconisées (23 - 27°C). ROSEN en 1949 sur la betterave augmente les mitoses par choc thermique. EIGSTI et DUSTIN rappellent que la colchicine à faible concentration à un effet excitomitotique. Il est interessant de relier maintenant cette action de l'index mitotique avec celle de la vigueur. DER-

MEN en 1954 décrit le rôle de la vigueur lors du traitement de bourgeons axillaires chez Vitis rotundifolia . Parallèlement, BERTHOU en 1975 cite une meilleur réussite des traitements sur les hybrides triploides entre C. canephora et C.arabica.

c) La dominance apicale

Son rôle est particulièrement important dans les traitements sur bourgeons axillaires. Il a été mis en évidence par DERMEN en 1954. Cet auteur note aussi une interaction entre la vigueur et la dominance apicale dans la réussite de la polyploidisation. BERTHOU utilise aussi cette propriété pour obtenir des rejets autotétraploides de C.canephora . Enfin chez la luzerne, KHOSROWCHAHLI en 1970 est obligé de traiter des boutures d'un noeud en raison du manque partiel de dominance apicale chez cette plante.

d) La pénétration de la colchicine

Afin d'assurer une meilleure efficacité de nombreux auteurs ont envisagé d'accélerer la pénétration de la colchicine, soit par action du vide (DE ROO 1955,ESSAD et CACHON 1965),soit par adjonction d'agents mouillants (DERMEN 1954, CAPOT 1968). Il est à noter que KHOSROWCHAHLI déconseille l'emploi de ces derniers en raison d'une certai-

ne toxicité.

B. Le tri des polyploides : le problème des chimères périclines

1. Le problème des chimères périclines

Le crible des polyploides est le point le plus délicat dans l'obtention des plants recherchés. De nombreux auteurs ont tenté avec succès ou non la recherche d'un mode de dépistage précoce (SCHWANITZ 1952, DERMEN 1952, SAVITSKY 1952, DERMEN 1954, KUZDOWICZ 1956, FUNKE 1956, BUTTERFASS 1958, ESSAD et TOUVIN 1959, CAPOT 1968, KHOROWCHAHLI 1970). Le comptage chromosomique d'extrémités racinaires n'est pas nécessairement exact (EINSET, BLASER et IMMER 1947, FROST et KRUG 1942, THOMPSON et OLMO 1959). THOMPSON et OLMO montre sur la vigne que seules les coupes histologiques effectuées au microtome sur l'apex ou les jeunes feuilles réflètent la véritable identité des polyploides. Face à la difficulté matérielle que représente cette méthode, divers auteurs ont cherché des caractères discriminants épidermiques pour finalement utiliser le crible du grain de pollen (SCHWANITZ 1952, KUZDOWICZ 1956, FUNKE 1956, ESSAD et TOUVIN 1959, CAPOT 1968); Seul DERMEN ayant utilisé à bon escient les propriétés des chimères périclines a abouti à un crible précoce.

Les cytochimères, mises en évidence par les déficiences chlorophylliennes avant d'être détectées chez les polyploides, sont la cause de nombreux échecs dans la mise au point d'une méthode de tri efficace et précoce. Leur existence et leur rôle ont été démontrés à la suite des travaux de BAUR, CHITTENDEN, RENNER, CAUDAT, IMAI, BLAKESLEE, SATINA, DERMEN, TILNEY-BASSET et DULIEU. De ces travaux, il ressort que les dicotylédones possèdent très souvent une structure foliaire à trois couches dénommées par BLAKESLEE et SATINA de l'extérieur vers l'intérieur LI, LII, LIII. Cette disposition est le reflet de la structure du méristème (BAUR). Il existe une certaine stabilité de ces chimères périclines, variable suivant l'espèce étudiée et il est très important de connaitre la constitution cytohistologique des tétraploides utilisés lors d'un programme d'hybridation (EINSET et LAMB 1951, DERMEN 1954, EINSET et PRATT 1954, THOMPSON et OLMO 1963). Ainsi EINSET, BLASER et IMHOFE en 1947, FROST et KRUG en 1942 montrent que certaines cytochimères sexuellement tétraploides ne sont pas détectées par comptage chromosomique d'extrémité racinaires. L'exemple est donné dans le cas du Citrus par la chimè-

re 242 qui donne des racines diploides issues de la LIII et du pollen de tétraploide issu de la LII.

TILNEY-BASSET (1965) fait ressortir l'importance de la LI dans la stabilité des chimères périclines. Des réversions sont possibles, mais elles ont toujours lieu dans un sens centripète. DERMEN (1954) cite des taux de réversions très faibles (une en huit années). Cet auteur montre aussi que chez la feuille, l'épiderme est issu de la LI, le mésophylle et la plupart des nervures de la LII et la nervure principale de la LIII. Pour lui seules les structures 244 et 422 sont parfaitement stables en croissance symodiale chez la vigne. La stabilité des autres types (mésochimères) est relative et une forme 242 devient souvent une forme 244 chez le bourgeon axillaire. PRATT (1959) confirme que chez la vigne seuls les types 244 et 422 sont stables. Il en déduit que chez les tissus sous épidermiques,il y a homogénéisation des couches. THOMPSON et OLMO (1965) montrent qu'effectivement la présence de divisions périclines en LII conduit au niveau des bourgeons axillaires à une homogénéisation à partir de la LII des couches internes. Cependant chez les chimères chlorophylliennes de nombreuses mésochimères sont stables (TILNEY-BASSET 1965, DULIEU 1967). Il ressort de toutes ces données que

la stabilité des chimères périclines est spécifique mais dans l'ensemble les couches les plus stables sont dans l'ordre la LI, la LII puis la LIII.

Chez le cafeier, CAPOT (1968) émet l'hypothèse de la présence de chimères périclines stables. Il est à noter que FRANCO (1959) rejette en étudiant la densité stomatique certains plants de Coffea arabica var. bullata (8n) ayant la valeur espérée mais différents de la majorité de ses octoploides étudiés Il est fort probable que cet auteur était en présence dans ses cas les plus fréquents de cytochimères naturelles.

Chez la luzerne, la bibliographie ne donne pas d'exemple de cytochimères. Cependant les problèmes soulevés dans la mise au point d'une méthode de tri précoce et efficace laisse envisager leur présence.

2. Les principaux caractères utilisés

a) La forme de la feuille

Très tôt, ce caractère est apparu comme caractéristique de la réussite du traitement (BLAKESLEE 1937). Mais il a été peu utilisé comme critère de crible. En 1954, sur la vigne, DERVIN montre que la forme en U du limbe au point de jonction avec le pétiole suffit à caractériser les plants

sexuellement tétraploides. En 1959,ESSAD et TOUVIN utilisent le rapport longueur/largeur du limbe pour trier les tétraploides de betterave. En 1965, ESSAD et CACHON mesurent la longueur du limbe de la troisième feuille pour caractériser le syndrome colchicinique chez l'orge. CAPOT donne pour le caféier les valeurs observées entre diploides et tétraploides. Enfin BERTHOU en 1968-69 trie empiriquement les rejets sur la forme de la feuille.

b)La densité stomatique

RANDOLPH en 1935 montra l'existence d'une relation entre le nombre de stomates et le nombre de chromosomes chez Zea mays . Ceci fut confirmé par les travaux de SAX et SAX sur Tradescantia en 1937. Sur les espèces et hybrides du genre Coffea FRANCO en 1939 montre qu'en général la densité stomatique est inversement proportionnelle au nombre de chromosomes, mais la comparaison manque de rigueur en raison de l'hétérogénéité du matériel étudié. CAPOT en 1968 utilise ce caractère pour confirmer les autotétraploides obtenus. SOHOH en 1972 démontre que la densité stomatique varie en fonction de l'ombrage de un à dix. Il est donc impératif d'avoir les mêmes conditions extérieures pour utiliser

ce caractère comme crible.

c)la_longueur du_stomates

L'augmentation de la longueur du stomate avec le niveau de ploidie a été étudiée en 1935 sur Zea mays et confirmée par SAX et SAX en 1937 sur Tradescantia. Son utilisation dans le crible des polyploides est très fréquente depuis.(ESSAD et CACHON 1965, SCHWANITZ 1952,BINGHAM 1968,KHOSROWCHAHLI 1970,etc...) Cependant DERMEN en 1954 est le seul a avoir utilisé ce caractère pour différencier parmi les formes sexuellement tétraploides les chimères 244 des tétraploides vrais 444

d)Le diamètre_des_grains de_pollen

Découvert par BLAKESLEE en 1937, puis repris par de très nombreux auteurs, ce caractère d' apparition tardive est efficace et évite très souvent une analyse meiotique laborieuse.Il a été utilisé entre autres par DERMEN sur la vigne avant que ce dernier ne découvre un caractère plus précoce et tout aussi efficace: la forme.

e) les autres_caractères

On peut citer le nombre de pores du grain de pollen employé par KUZDOWICZ en 1956, le nombre de chloroplastes de la cellules de garde du stomate (MOCHIZUKI et SUEOKA 1955,BUTTERASS 1958,BING-

HAM 1968, KHOSROWCHAHLI 1970), la dimension des pièces florales (BLAKESLEE 1937, DERMEN 1954 etc...) des fruits (DERMEN 1954) ou des graines (DERMEN 1954, ESSAD et CACHON 1965).

3. L'isolement des rejets

DERMEN (1954) sur la vigne envisage plusieurs critères successifs de sélection comme, le retard dans la sortie des rejets, l'apparition de feuilles en mosaique ,puis de chimères sectorielles. Enfin la forme des feuilles et la mise en évidence de chimères périclines par le caractère longueur du stomate lui permettent de définir la structure de ses polyploides obtenus. Les résultats sont confirmés par la grosseur des grains de pollen. L'auteur n'utilise pas les techniques cytologiques sur extrémités racinaires en raison du biais qu'apporte cette méthode. Il est à noter que DERMEN utilise la croissance sympodiale ,naturelle chez la vigne,pour isoler à partir des bourgeons axillaires des feuilles touchées sectoriellement un rejet entièrement symétrique.

BERTHOU sur le cafeier élimine d'emblée les bourgeons les plus différenciés. Le tri com-

mence dès l'apparition de la deuxième paire de feuille,laquelle pour être conservée doit présenter les caractéristiques de la chimère sectorielle. Une coupure de l'apex permet alors par croissance sympodiale forcée l'obtention de feuilles symétriques plus larges considérées comme tétraploides.

Chez la luzerne, KHOSROWCHAHLI cherche aussi à utiliser les bourgeons les moins différenciés de la série axillaire. Il se trouve cependant dans l'obligation de conserver un des deux bourgeons apparents pour permettre la croissance des suivants. Le tri est purement visuel au départ (déformations, grandeur des feuilles et des pièces florales);une deuxième élimination est effectuée avec le crible du nombre de chloroplastes des cellules de garde du stomates. Enfin une confirmation a lieu par comptage chromosomique d'extrémités racinaires. Il est à peu près certain que par cette technique utilisant des caractères propres à la LI et la LIII ,il a du éliminer des plants sexuellement interessants.

II. L'obtention de polyploides chez le caféier

A. Nouvelles modalités apportées au traitement sur bourgeons axillaires

BERTHOU date aux caféiers C.canephora Pierre Ex Froehner la duplication chromosomique sur bourgeons axillaires mise au point par DERMEN en 1954 sur la vigne. Les étapes sont les suivantes:

-rupture de la dominance apicale

-traitement de méristèmes axillaires par un seul apport de solution à 1% de colchicine entre les stipules.

A Madagascar, le matériel végétal traité est très varié et comprend des espèces diploides dont C.canephora, C.excelsa, C.eugenioides et divers Mascarocoffea , des hybrides diploides (Congusta, C.canephora x C.eugénioides, C.canephora x Mascarocoffea),ainsi que des hybrides triploides entre C.arabica et les diverses autres espèces. Ce matériel se trouve réparti sur les deux stations de recherches caféieres de Kianjavato et d'IlakaEst et les travaux ont été réalisés dans le cadre de l'opération conjointe ORSTOM IFCC. Cependant, les ex-

périences relatées ici ont été effectuées essentiellement sur C.canephora et les hybrides Congusta en parc à bois sous ombrière à la station d'Ilaka Est .

Dès les premiers traitements, la pluviométrie très particulière de la Côte Est malgache nécessita la protection de la partie traitée par un manchon en polyéthylène transparent pour éviter le lessivage de la solution aqueuse de colchicine à 1% apportée entre les stipules.

Comme, de plus, une seule application s'avéra insuffisante à l'obtention de rejets modifiés, un essai orientatif sur le clône C.canephora 23.1.57 permit d'adapter la technique aux conditions nouvelles. L'optimum d'efficacité fut obtenu lorsque les apports de colchicine à 1% au nombre de deux par jour pendant cinq jours avaient lieu aux heures matinales (7h ½, 9h ½).

Ces conditions ne se prêtant guère à l'utilisation intensive de la méthode. L'indépendance vis à vis de l'horaire et la diminution du nombre d'applications fut envisagée. Le support solide, de par son contact constant avec les méristèmes répond à ces deux critères. Un deuxième essai préli-

minaire nous fit comparer l'eau, l'agar agar et la lanoline. Cette dernière fut retenue, l'agar agar provoquait la nécrose du noeud traitée dans 100% des cas. Le mélange à 1% de colchicine est alors déposé sur une coupe plane. Le niveau de la section, déterminé par une étude à la loupe binoculaire de coupes sériées du noeud ,fut fixé au plan tangeant au bourrelet stipulaire.Il laisse ainsi intact la série de bourgeons axillaires orthotropes et élimine les deux bourgeons plagiotropes (voir schéma p.20).

Chez certains clônes peu vigoureux, le traitement se soldait par une nécrose plus ou moins tardive de la partie traitée. Dans le but de forcer le démarrage des bourgeons axillaires colchicinés chez de tels clônes, un apport de substances favorisant la mérésis s'imposa. De plus, la présence jusqu'alors nécessaire d'une protection pouvait s'avérer inutile voire néfaste, lors de l'utilisation de support solide. C'est dans ces deux directions qu'a été effectué sur le clône Congusta HA, peu vigoureux en parc à bois, un essai trifactoriel 3 x 3 x 2 avec confounding (plan de COCHRAN et COX 1968). Les facteurs testés sont la colchicine (C), l'eau de coco (K),

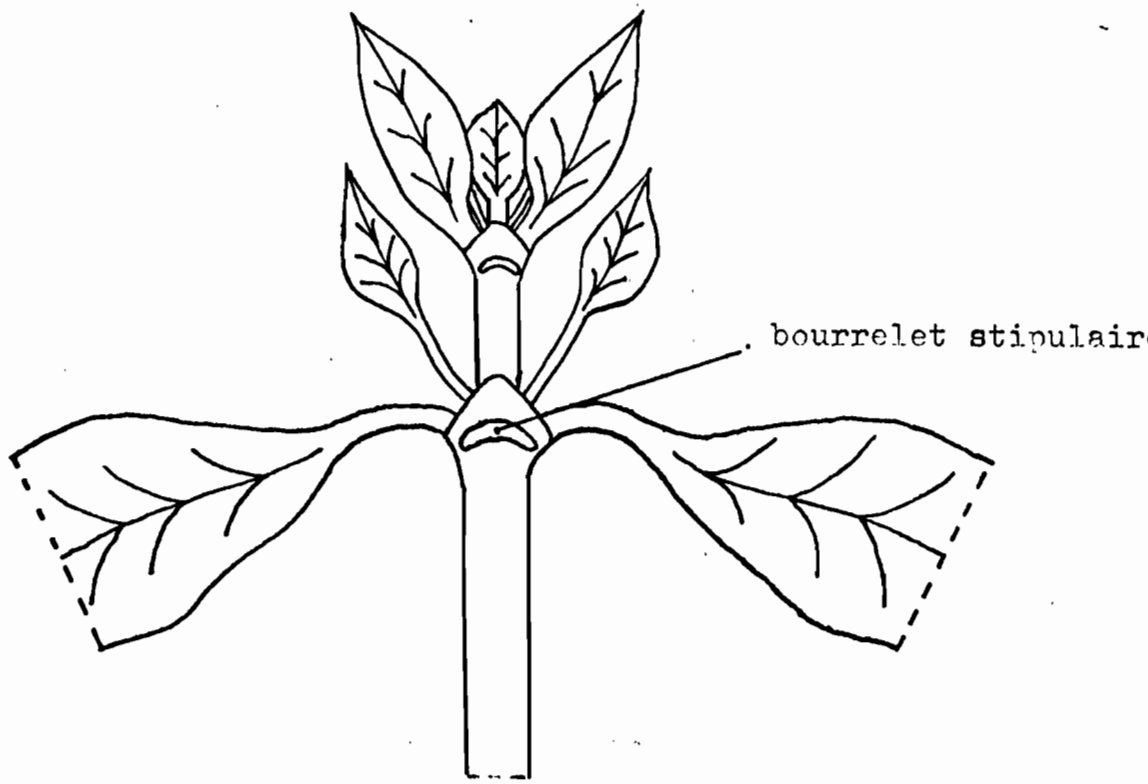
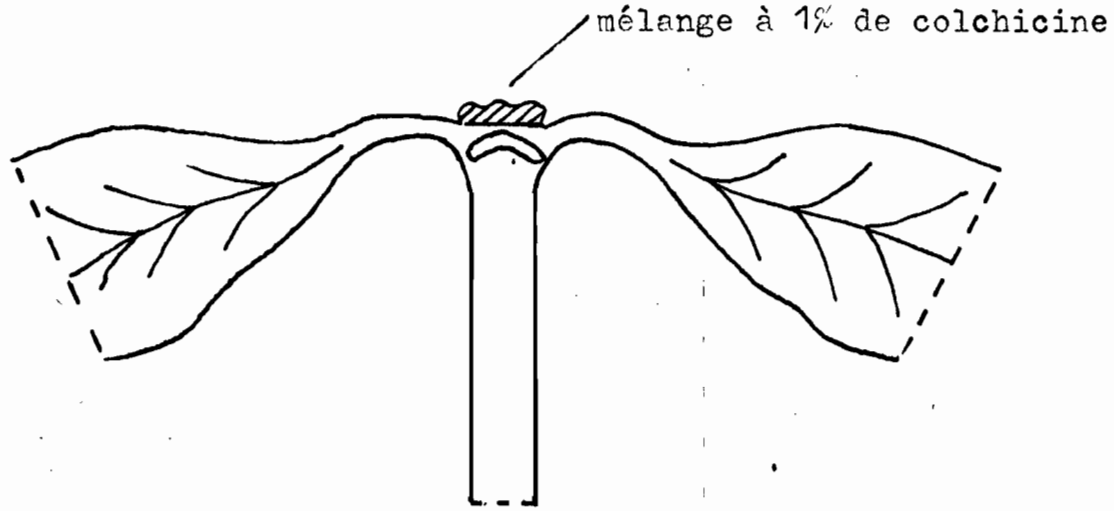


Schéma de la partie terminale de l'axe orthotrope

1) avant traitement



2) après traitement

et la protection (P). Pour satisfaire toutes les combinaisons, quatre émulsions ont été préparées. Ce sont:

Emulsion A :50% lanoline, 50% eau

Emulsion B :50% lanoline, 50% eau de coco

Emulsion C :49,5%lanoline,49,5%eau,1%colchicine

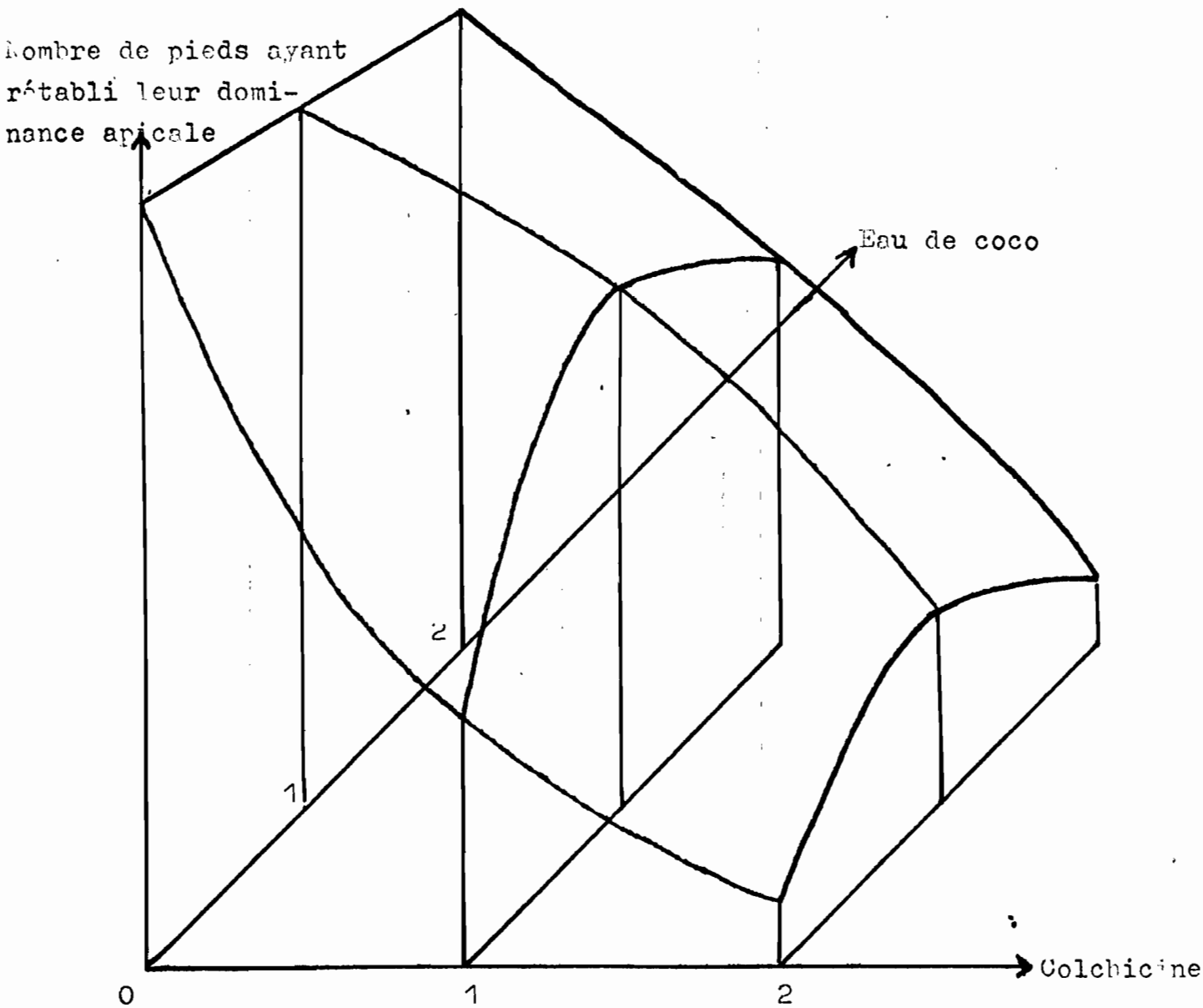
Emulsion D :49,5%lanoline,49,5%eau de coco,1% de colchicine.

Dans les quatre cas, trois gouttes d'agent émulsionnant sont ajoutées. Par exemple, le traitement $C_0K_2P_1$ consistera en deux applications espacées de quinze jours d'émulsion B, la partie traitée restant protégée pendant trois semaines par un manchon en polyéthylène. Pour le traitement $C_2K_1P_0$, non protégé, une dose d'émulsion D sera suivie à quinze jours d'une dose d'émulsion C. Pour chaque parcelle élémentaire, le nombre de pieds est de trois; les données originales durent subir une transformation de variable $y = 2 \text{ arc sin } \sqrt{x/n}$ pour remplir les conditions de l'analyse de variance.

Les notations ont été effectuées semaine par semaine pendant trois mois d'une part sur le nombre de pieds ayant rétabli leur dominance apicale et d'autre part sur la mortalité. Pour le détail des calculs nous renvoyons à l'annexe 1. Les con-

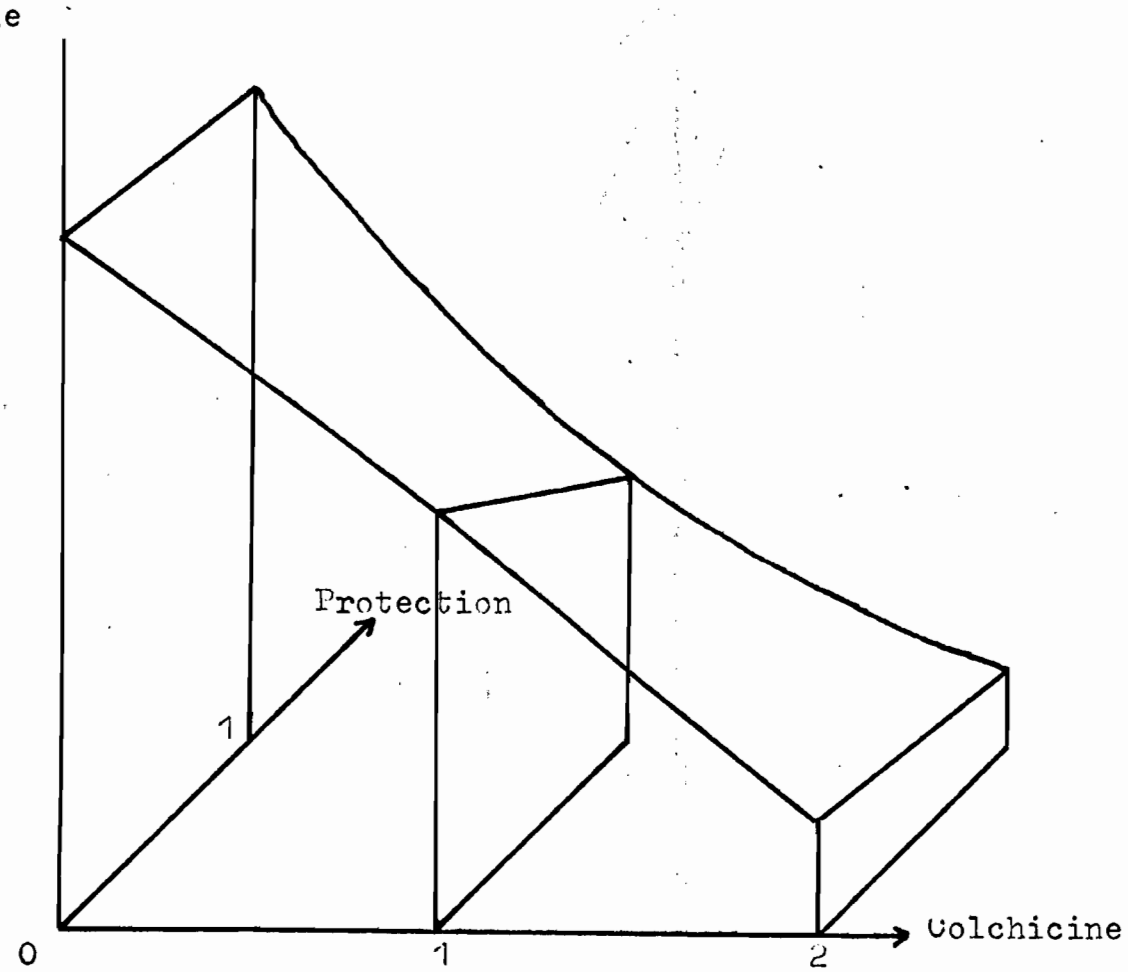
clusions y sont sensiblement les mêmes et ressortent bien des graphes 1,2,3 et 4 (p. 23,24,25,26). L'eau de coco diminue nettement la toxicité de la colchicine à la dose C1 . Son effet est cependant insuffisant lorsque deux doses de colchicine sont apportée. La protection a une action néfaste. Celle ci s'accroit très rapidement en présence de colchicine.

Le meilleur traitement envisagé à la suite de cet essai consista en une décapitation à la lame de rasoir au niveau du bourrelet stipulaire, suivie d'une application sur la surface de coupe d'une émulsion constituée de 49,5% d'eau de coco, 49,5% de lanoline et de 1% de colchicine. La protection a été abandonnée.

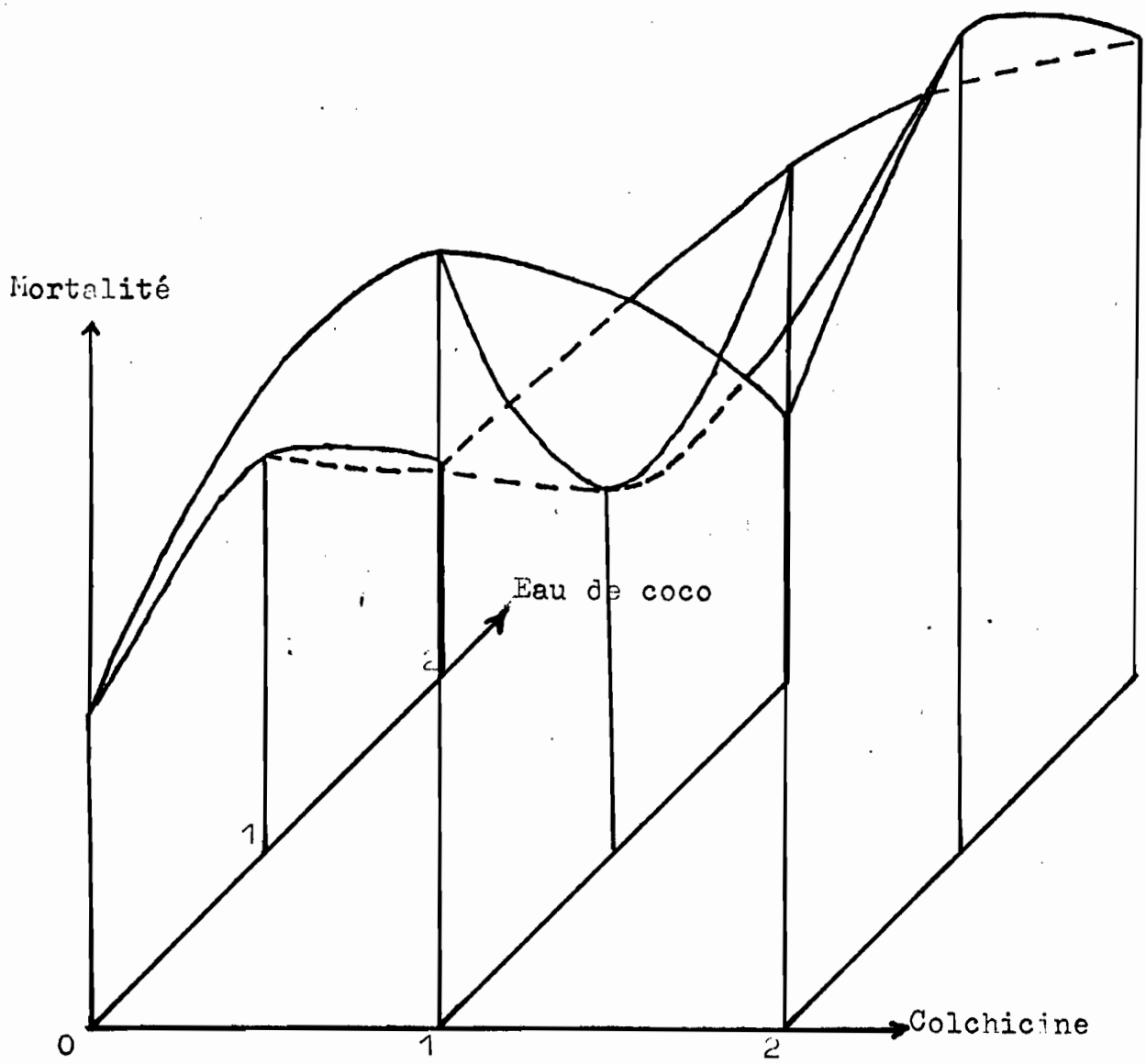


Graphe 1: Interaction colchicine- eau de coco sur le nombre de pieds ayant rétabli leur dominance apicale.

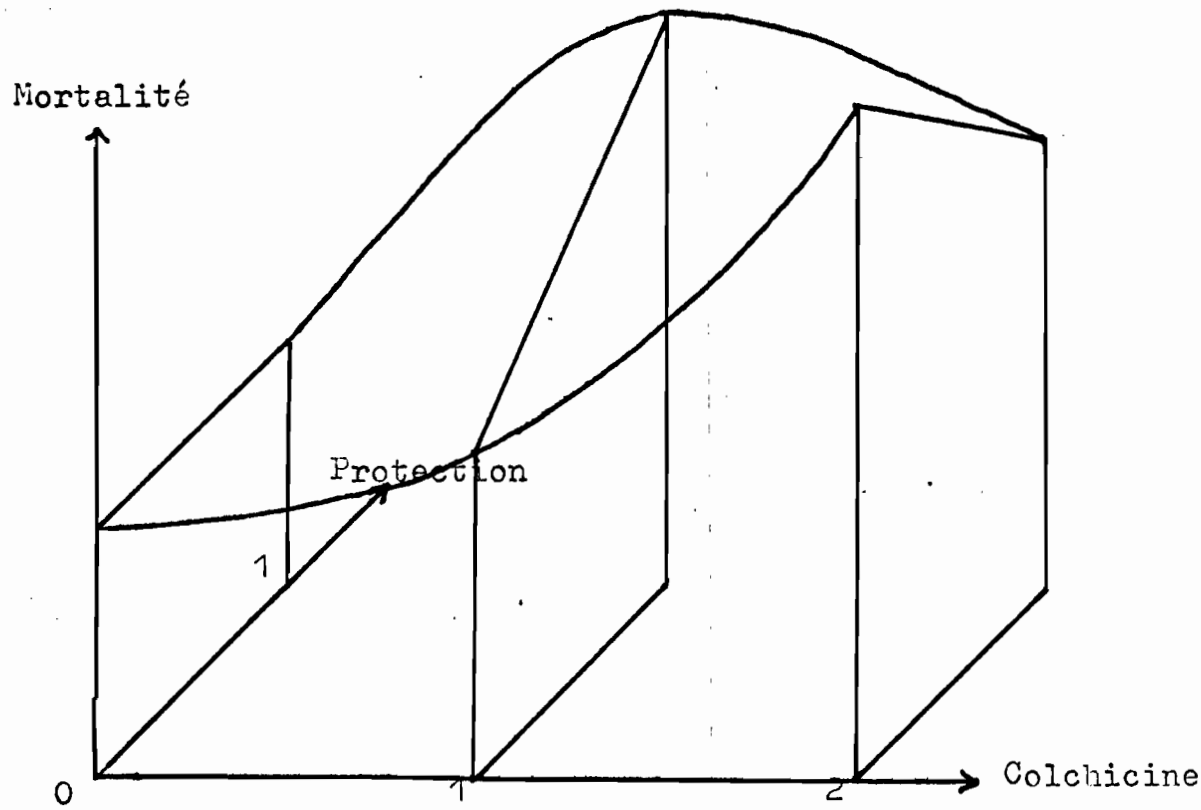
Nombre de pieds ayant
rétabli leur dominance
apicale



Graphe 2 : Interaction colchicine - Protection sur le nombre de pieds ayant rétabli leur dominance apicale.



Graphe 3 : Interaction Colchicine - Eau de coco sur la mortalité .



Graphe 4: Interaction colchicine protection sur la mortalité

B. L'isolement et la confirmation des polyploides

1. Le tri des bourgeons

A Madagascar, les rejets apparus précocement s'avérant peu ou pas déformés ont été éliminés. Généralement ,au delà d'un délai de trois semaines, apparaissent des tiges dont les deux premières paires de feuilles montrent de grandes déformations; celles ci s'estompent très rapidement en croissance libre monopodiale dès le 3^{e} ou 4^{e} noeud. Ces deux premières paires de feuilles correspondent au type en mosaique décrit par DERMEN chez la vigne. Elles sont constituées par un ensemble de petits territoires diploides et tétraploides juxtaposés et correspondent à ce qu'on est en mesure d'attendre de l'action de la colchicine sur les feuilles préformées et la zone sous apicale. BERTHOU montre et ceci est confirmé à Ilaka Est que la première paire de feuille n'est pas représentative de la série de bourgeons située à sa base. Par contre la deuxième paire de feuille est un bon crible visuel et les méristèmes situés à son aisselle correspondent à la structure de la feuille. De par l'hétérogeneité de celle ci, on est en mesure d'espérer trouver, dans la série axillante,des bourgeons dont la structure moyenne

est plus riche en cellules tétraploides. Le sectionnement de la partie supérieure du rejet permet d'une part l'élimination de territoires à fortes chances ininteressants et d'autre part de rompre le dominance apicale pour utiliser les bourgeons sériaux. Cette croissance sympodiale forcée décrite par BERTHOU et que montre la photo 1 de la page 28 constitue d'après l'aspect extérieur le tri visuel en "baionnette". L'opération est reprise à chaque niveau foliaire jusqu'à l'apparition d'une feuille symétrique Elle est poursuivie ensuite sur trois noeuds minimum afin de réduire la présence de cellules diploides dans le rejet final isolé.

2. La mise au point d'une méthode de confirmation

La confirmation, au début ,par le comptage stomatique nous conduisit à rejeter certains types à l'aspect pourtant tétraploide. Ceci nous amena à penser à la présence de chimères périclines chez les polyploides artificiels de caféier . La zone gamétogène étant la LII, il importait de considerer comme crible des caractères dépendant de cette couche. La sélection aura pour but la sélection de plants 2n4n4n ou 4n4n4n. Les mésochimères 242 et 424 sont instables et donnent comme chez la

Photo 1: le tri en "baionnette"

vigne par croissance sympodiale des rejets respectivement 244 et 422 . La forme comme l'ont montré DERMEN et BERTHOU révélant les tiges sexuellement interessantes a été le premier crible retenu. Pour différencier par la suite les formes 244 et 444, la densité stomatique et la longueur du stomate furent utilisées. Il est en effet important de connaitre la structure exacte de la cytochimère en raison du risque faible mais réel d'instabilité de la LI . La confirmation sur feuille symétrique s'opère par rejet de l'hypothèse diploide. La méthode pour être éfficace compote deux étapes:

-définir la moyenne diploide avec le minimum de variabilité

-choisir un seuil de rejet adéquat.

a) L'étude des caractères au niveau diploide

Le détail des calculs est précisé dans l'annexe 2.

* La forme de la feuille

La feuille est mesurée sur sa plus grande largeur et, pour la longueur, de la base du limbe jusqu'à l'extrémité de l'acumen. Le rapport établi entre la longueur et la largeur caractérise la forme. Vingt quatre feuilles donnent une précision de 5% sur la moyenne pour un risque de 5% .

La distribution observée possède les caractéristiques de la loi normale. Une analyse a permis de cerner en parc à bois sous ombrière trois sources de variation :-le clône

-le noeud sur la tige

-le type de feuille (orthotrope ou plagiotrope)

Nous noterons qu'en champs où les conditions sont moins homogènes, il apparait une variation entre les pieds à l'interieur d'un clône.

Afin de limiter la variabilité, les paramêtres de la population diploide sont déterminés pour chaque clône, sur feuille orthotrope en parc à bois .

* La longueur du stomate

Les mesures sont effectuées sur une empreinte de rhodoide prise sur la face inférieure de la feuille suivant la méthode décrite par CAPOT(1968) et mise au point au Laboratoire de Botanique de M.NOZERAN . Les mensurations se font avec le microscope ZEISS grossissement 8000 sur la plus grande des cellules de garde. Huits mesures donnent la moyenne de l'empreinte avec une précision de 5% pour un risque de 5%. Trois empreintes suffisent pour avoir la moyenne de la feuille avec la même précision.

Le caractère s'apparente à la loi normale et ne possède pas de sources de variation hormis la variation entre les empreintes à l'interieur d'une feuille . Les paramètres ont ainsi être déterminés pour l'ensemble de la population C.canephora et sont reproduits dans le tableau de la page 33 .

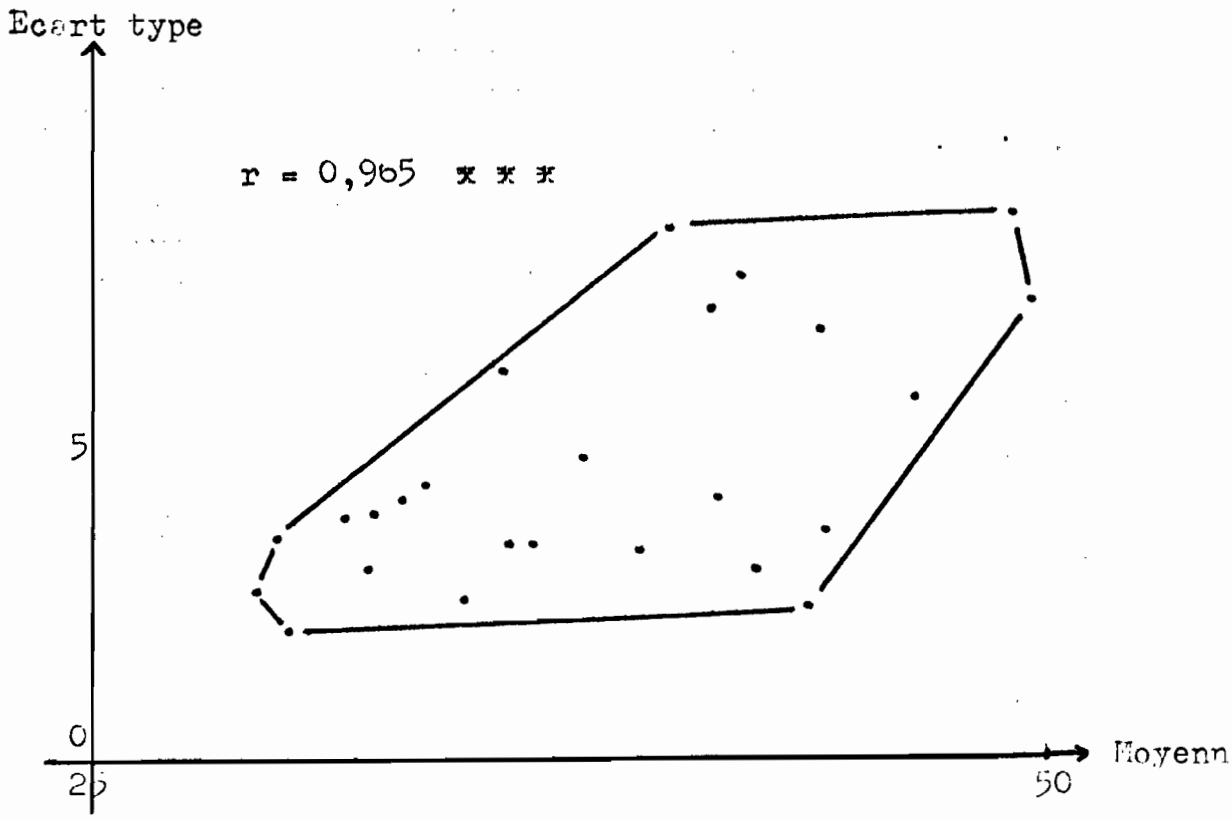
* La densité stomatique

Les comptages ont lieu sur les mêmes empreintes que précedemment, par champs de microscope WILD M11 au grossissement 200 . Seize dénombrements sont suffisants pour estimer la moyenne de l'empreinte avec une précision de 5% pour un risque de 5% .

L'existence d'une relation linéaire passant par l'origine entre la moyenne et l'écart-type (voir la figure p 33) et la dissymétrie de la distribution (page 34) montre que ce caractère suit une loi binomiale agrégative. Ceci nous a obligé lors de l'analyse des sources de variation à utiliser la transformation logarithmique des données, sans laquelle toute comparaison par l'analyse de variance présente un risque de biais important. Le caractère est extrêmement variable . Parmi les facteurs observés, on peut citer le génotype, le pied à l'interieur du clône, les noeuds sur le pied, les feuilles d'un même noeud et enfin l'empreinte à l'interieur d'u-

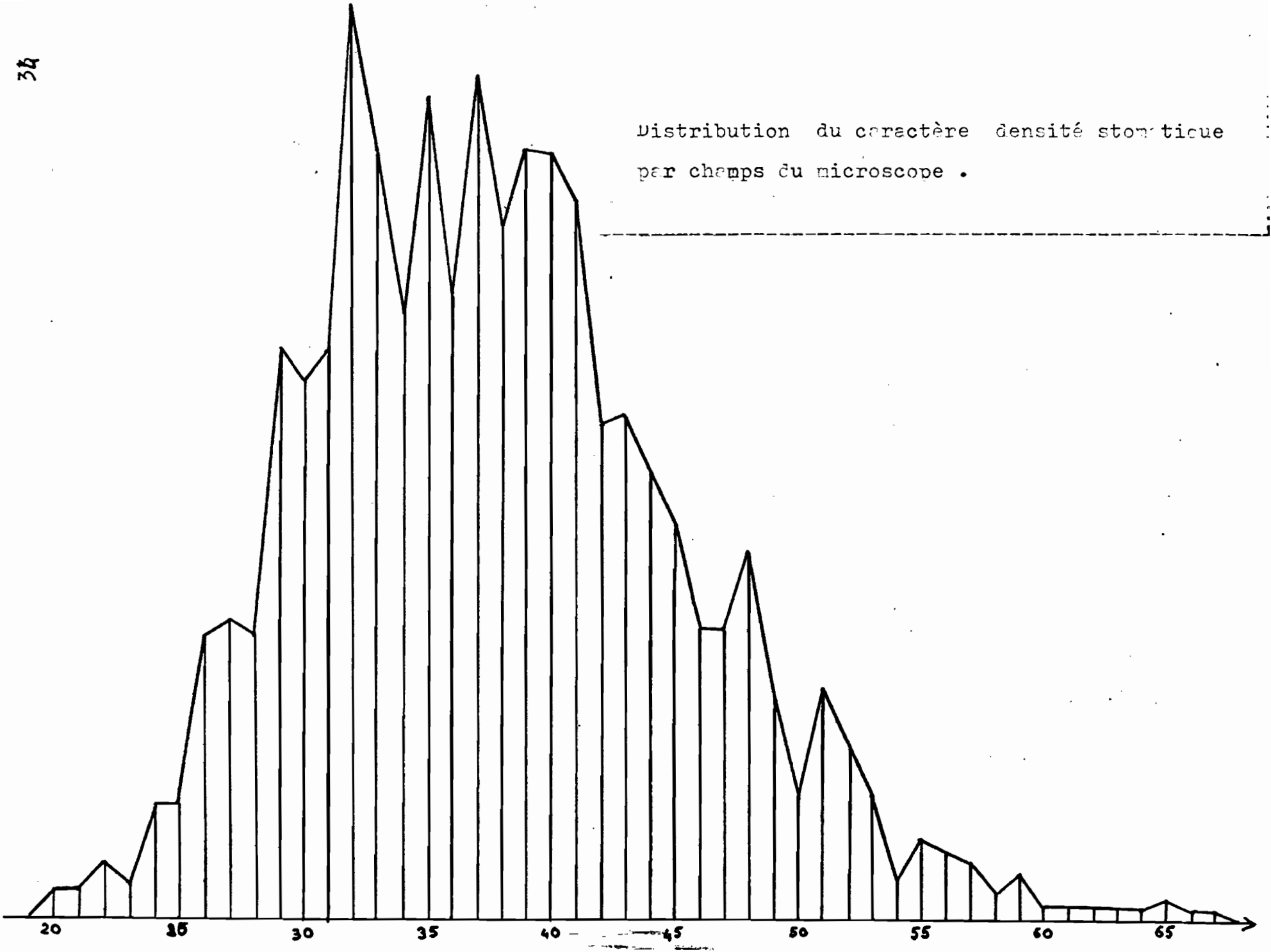
	Distribution des	
	Mesures	Empreintes
Moyenne	29,0 microns	29,0 microns
Variance	4,8	1,21
Ecart type	2,2	1,1

Caractéristiques de la longueur de la plus grande des cellules de garde du stomate chez C.canephora 2n=22



Relation entre écart type et moyenne pour le caractère densité stomatique chez C.canephora 25.1.57

Distribution du caractère densité stomatique par champs du microscope .



ne feuille . Le calcul des paramètres de la population diploide a lieu pour chaque clône en parc à bois sur les données logarithmiques avec 57 empreintes prises sur feuilles orthotrope sur 57 pieds.

b) Le choix du seuil

Pour la forme, le choix du seuil de rejet de l'hypothèse diploide a pu etre fixé, en tenant compte des couples de valeurs moyennes"diploide-tétraploide" fournies par CAPOT (1968), à $\alpha/2 = 2,5\%$. Pour chaque feuille ainsi retenue, on a donc une probabilité inférieure à 2,5% de se tromper en affirmant que sa couche L II est tétraploide .

Pour la longueur du stomate,les valeurs observées sur les premières feuilles obtenues ont permis de choisir le seuil de rejet à $\alpha/2 = 0,5\%$.

Dans le cas de la densité stomatique,en utilisant la loi émise par FRANCO(1939) selon laquelle la moyenne présumée du tétraploide est égale à la moitié de la moyenne diploide, le seuil de rejet fut fixé à $\alpha/2 = 2,5\%$.

L'indépendance entre les caractères densité et longueur du stomate a aussi été démontrée au niveau diploide (annexe 2). Les évènements étant indépendants, la probabilité pour que le cas observé (rejet de l'hypothèse diploide pour les deux ca-

ractères) soit dû au simple hasard est égale à 2,5% x 0,5% = 1, 5.10^{-4} .

De même l'indépendance au niveau diploide entre deux noeuds successifs pour les trois caractères respectifs permet d'affirmer que dès le troisième noeud au phénotype différent du diploide, les hypothèses 444 et 244 sont stochastiquement certaines puisque le risque maximal d'erreur est de 1,56. 10^{-5} .

Remarque:Lors du traitement sur graines, la sélection diffère sur trois points. En effet d'une part la forme de la feuille ne se stabilise que vers le cinquième noeud. D'autre part, le rejet a lieu par rapport à la population diploide issue de fécondation libre . Donc pour un même seuil de rejet, il y a augmentation du risque de suppression de polyploides. Enfin après l'élimination des cytochimères 224 et 424 par application du tri en baionnette, il est possible de confirmer de façon quasi certaine la nature des plants. La croissance sympodiale permet aussi d'acquerir une stabilité en enlevant les risques de réapparition ultérieure de secteurs diploides. Il est aussi à noter que c'est chez des plants issus de graines qu'il a pu être observé l'instabilitéde la mésochimère 424 chez le bourgeon axillaire.

Une étude ultérieure des grains de pollen a permis de vérifier toute l'efficacité de la technique.

C. Quelques caractéristiques foliaires

1. Action de la polyploidie sur le rapport d'allométrie foliaire

a) Sur les feuilles de l'axe orthotrope

La sélection effectuée sur les feuilles orthotropes ne permet pas les comparaisons sans un risque de biais. A titre indicatif, le tableau de la page 38 résume des valeurs observées .

b) Sur les feuilles des axes plagiotropes

L'hybride Congusta n°725 et le clône C.canephora 2n.1.57 étudiés ne présentent pas de différences pour la forme entre le type 244 et le type 444 (voir les calculs à l'annexe 3). Comme pour le diploide, il n'existe pas d'effet pied en parc à bois et la seule source de variation à l'interieur du clône reste le noeud . Le tableau 1 de la page 39 donne les caractéristiques résumées des deux populations, visibles aussi à la figure 1 (page 40) et sur les photos (p 41).

Les populations diploides et tétraploides diffèrent par leur moyenne et leur variance .

Groupes	Clônes	2x ou 3x	4x ou 6x
C.canephora	23.1.57	2,20	1,38
	K 52	1,98	1,33
	8.3.58	2,13	1,40
	25.11.58	2,16	1,55
	356.59	1,90	1,35
	32.1.57	2,25	1,40
	8.1.58	1,99	1,59
Hybrides Congusta	HB	2,43	1,47
	HA	2,42	1,49
	H 725	2,35	1,45
Hyb. C.arabica x Mascarocoffea	AM 140 *	2,21	1,61
	AM 1 *	2,46	1,70
Hybrides GC	GC 1 *	2,14	1,65

Action de la polyploidie sur la forme de la feuille orthotrope .

* AM 140 = C.arabica x C.resinosa

* AM 1 = C.arabica x C.perrieri

* GC 1 = C.eugenioides x C.canephora

Clônes	Paramêtres	Diploide	Tétraploide
23.1.57	Moyenne	2,13	1,50
	Variance	0,0830	0,0058
	Ecart type	0,1517	0,0762
H 725	Moyenne	2,48	1,78
	Variance	0,0511	0,0063
	Ecart type	0,2261	0,0794

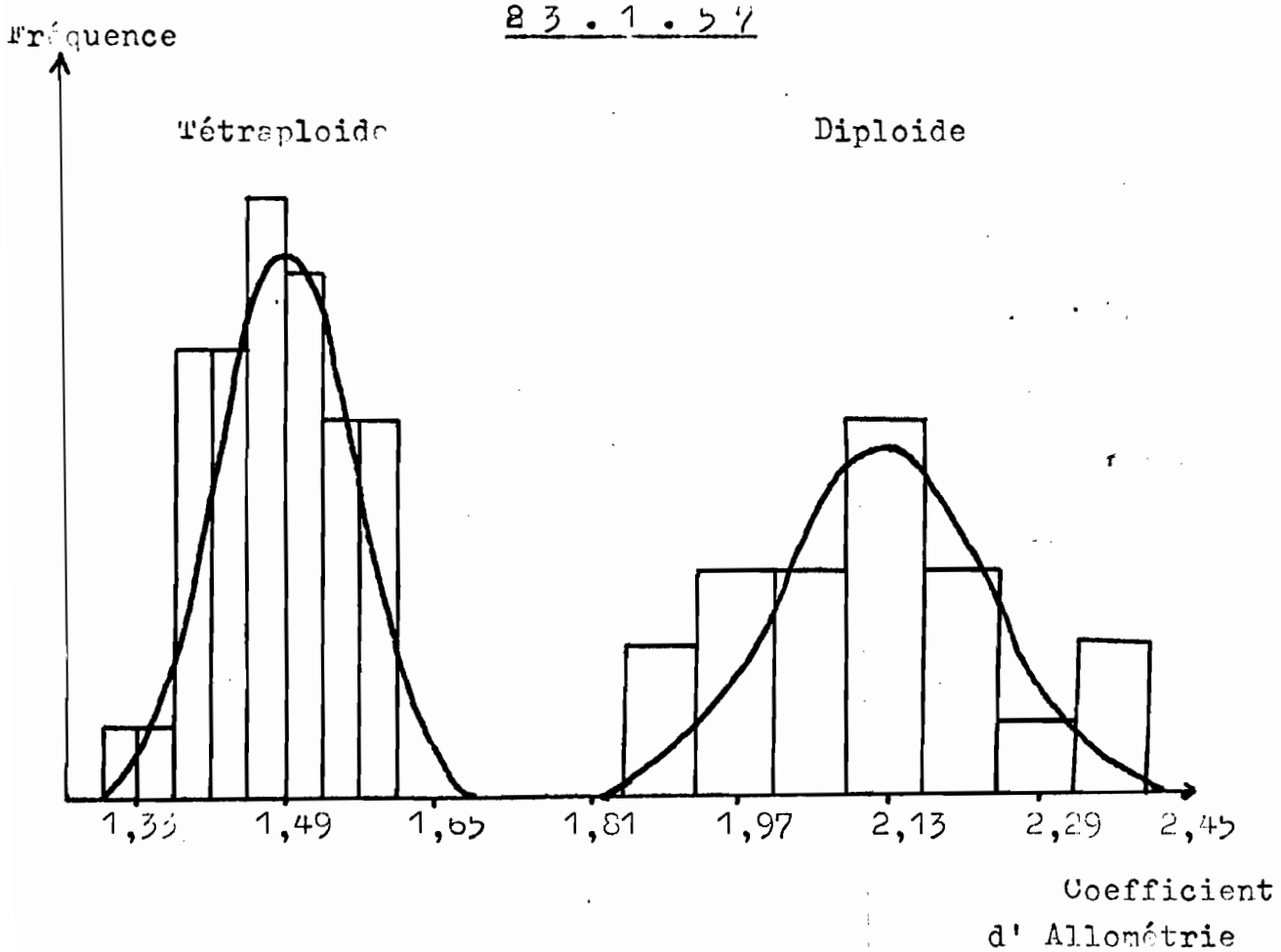
Comparaison entre le diploide et le tétraploide pour la forme de la feuille .

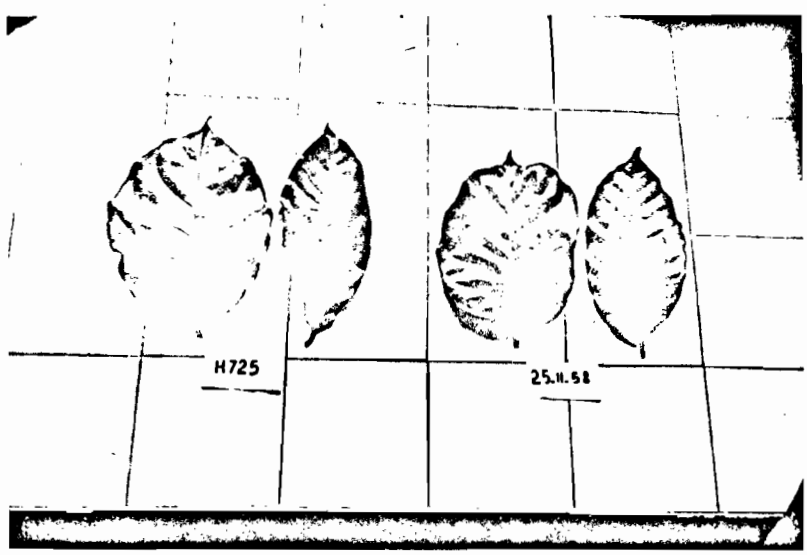
DISTRIBUTION DU RAPPORT

LONGUEUR / LARGEUR DE LA FEUILLE

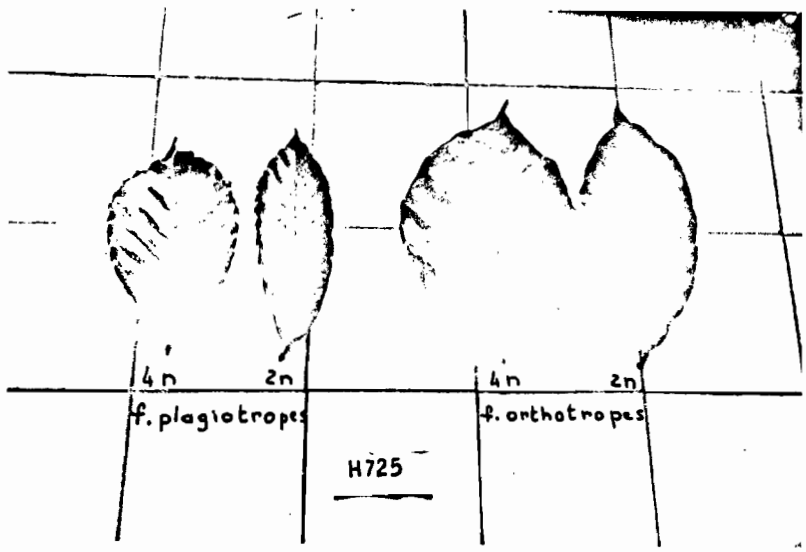
PLAGIOTROPE CHEZ COFFEA CANEPHORA

23.1.57





Action de la polyploidisation sur la forme de la feuille orthotrope chez les clônes H 725 et 25.11.58 .



Comparaison pour les deux types de feuilles entre diploide et tétraploide chez le clône H 725

2. Relation entre niveau de ploidie et longueur du stomate

Les mensurations sur les feuilles des axes plagiotropes concernent la plus petite des cellules de garde et sont données en unité de micromètre au grossissement 800 . Les formes 244 et 222 sont identiques . Elles diffèrent toutes les deux du type 444 à la fois par leur moyenne et leur variance . Le tableau de la page 43 et la figure de la page 44 résument la situation.

En microns, on a pour les types 222 et 244 24,57 microns et pour le type 444 32,31 microns. . Notons que lors de la confirmation sur feuille orthotropes, les mesures concernant la plus grande des cellules de garde donnaient pour le diploide 29,0 microns .

3. Rôle de la duplication chromosomique sur la densité stomatique

Le diploide et la cytochimère 244 ont la même densité stomatique comme le montre le tableau 2 de la page 43 calculé pour le clône 29.1.57 sur feuille plagiotrope . Ces valeurs correspondent au nombre de stomates par champs de microscope . Nous pouvons vérifier que pour un génotype donné ,placé

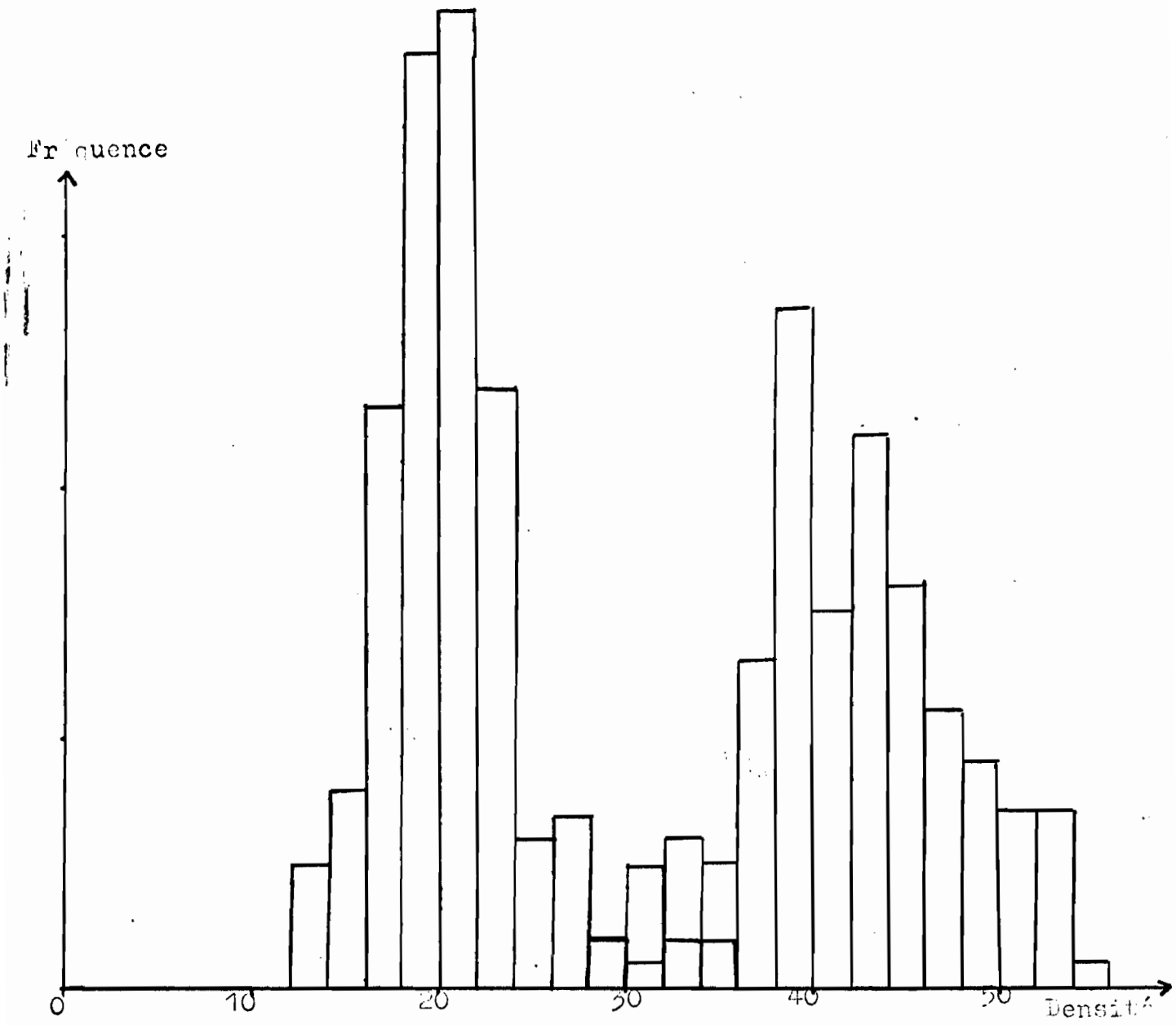
Parametres	Diploide 222	Tétraploide244	Tétraploide244
Moyenne	1,54	1,53	1,05
variance	0,0056	0,0057	0,0122
Ecart-type	0,0750	0,0750	0,1105

Tableau 1 : Comparaison entre le diploide et les deux types tétraploides obtenus pour la longueur de la plus petite des cellules de garde du stomate mesurée en unité de micromètre

Par mêtres	Diploide 222	Tétraploide244	Tétraploide4
Moyenne	40,62	40,20	10,31
Variance	25,39	20,88	11,34
Ecart type	5,04	4,57	3,68

Tableau 2 : Comparaison entre le diploide et les deux formes polyploides obtenues pour la densité stomatique comptée par champs du microscope.

HISTOGRAMMES DES DEUX TYPES SELECTIONNES DE TETRAPLOIDES POUR LA DENSITE DE STOMATES



Tétraploide 4.4.4 Tétraploide 2.4.4

dans les mêmes conditions, la densité du tétraploide 444 est égale à la moitié du diploide .(fig. p.46)

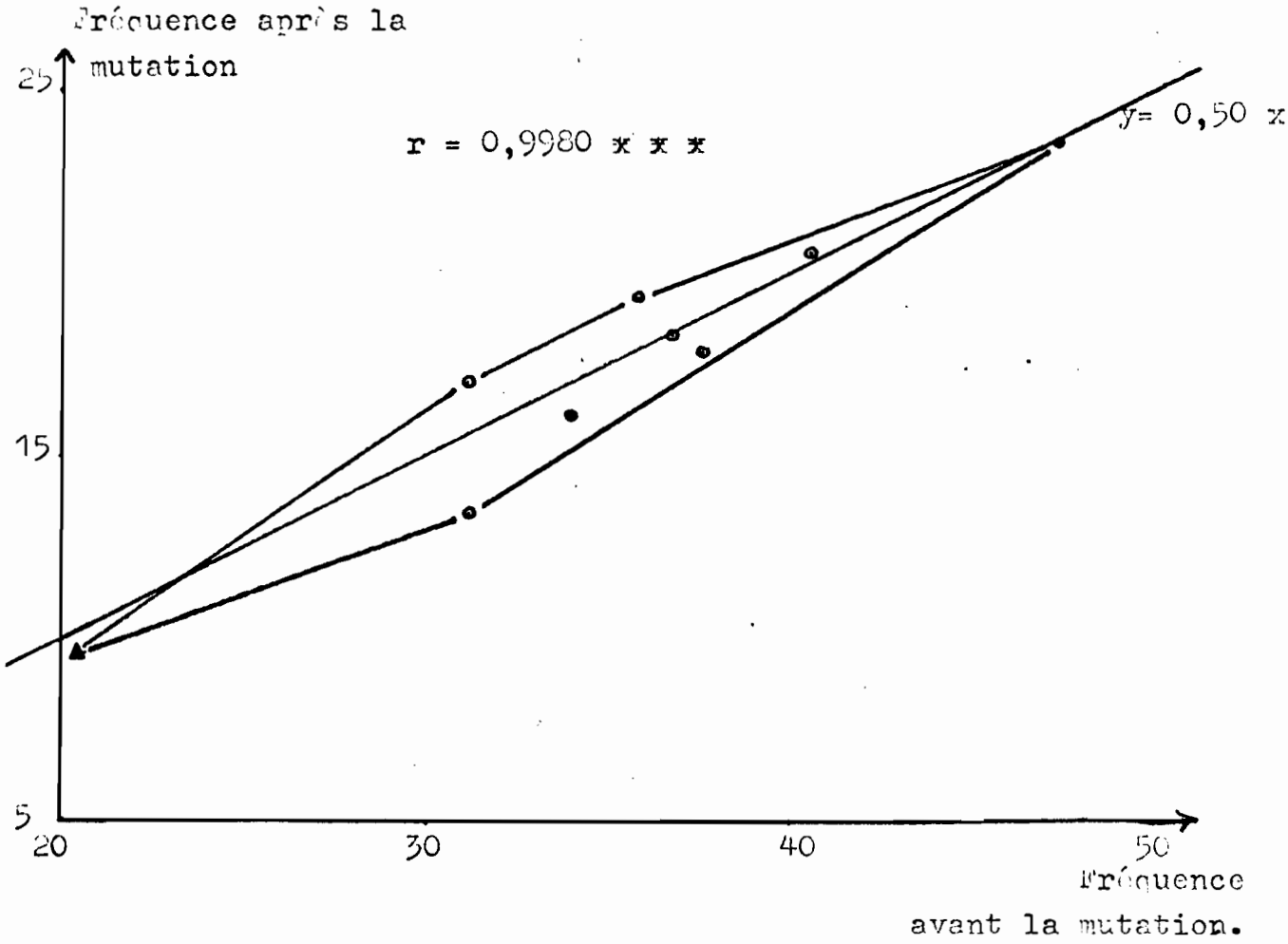
En densité par mm^2, on a pour le diploide 245 stomates ,pour le tétraploide 244:242 stomates et pour le tétraploide 444:122 stomates.

Chez C.canephora diploide, les valeurs trouvées par FRANCO et par CAPOT sont respectivement 318 stomates/mm^2 et 346 stomates/mm^2. Les différences observées sont dûes à l'extrême variabilité du caractère en fonction des conditions du milieu. La même variabilité existe aussi entre les génotypes pour un niveau de ploidie donné. Le cas de l'hybride GC_1 est très démonstratif. Alors que dans les mêmes conditions de milieu, les deux parents ont sensiblement la même valeur (C.canephora:58stomates par champs du microscope; C.eugénioides: 54stomates par champs), l'hybride possède une densité nettement inférieure et équivalente à celle observée chez le triploide AM 140 (C.arabica x C.résinosa) .

Ceci nous montre que la loi établie par FRANCO n'est valable que pour un génotype donné et dans les mêmes conditions de milieu. Sur ce principe, la relation a pu être vérifiée comme le montre la figure de la page 46. La densité du tétraploide est réduite de moitié par rapport au diploide. Ceci est aussi valable lorsqu'on compare triploide et he-

ACTION DE LA DUPLICATION CHROMOSOMIQUE SUR LA DENSITE DES STOMATES

(par champs du microscope)



Légende

- ○ Coffea canephora
- ▲ Hybride C.arabica x C.résinosa
- ● Coffea eugenioides FL

III . L'obtention de polyploides chez la luzerne

A . Le traitement sur graines prégermées

BERTHAUD traite des graines de trèfle violet prégermées (48 et 72 h) à une concentration de 50.10^{-5} pendant une heure sous un vide de 100mm Hg . Il constate d'autre part qu'une isothermie de 23°C depuis la prégermination jusqu'au repiquage en serre réduit la mortalité .

A Orsay, le matériel végétal est très varié et comprend diverses espèces diploides du genre Médicago. (M. orbicularis , M. Hispida , M.rigidula etc...).

Tous les traitements ont eu lieu à une durée fixe de 23h pour une concentration de 50.10^{-5} à pression normale, sur des graines prégermées (radicule = 2mm).

Une série de petits essais montre un avantage certain aux traitements où les graines sont à peine recouvertes par la solution de colchicine (par rapport à l'immersion totale). De plus,le repiquage en isothermie (chambre à 24°C éclairée),dans des tubes à essai et sur agar-agar diminue nettement la mortalité dans les premiers 15 jours par rapport au repiquage direct en pot en tourbe à la serre.

Ceci a permis aussi l'observation de l'action toxique de la colchicine sur la radicule, laquelle a fait préferer à LESINS le traitement sur plantules cotylédonnaires. En effet, la croissance de la radicule s'arrête lorsque celle ci atteint 1 à 2 cm. On observe alors un renflement de l'extrémité donnant à l'ensemble la forme d'une massue. Parallèlement, la partie aérienne développe une première feuille unifolié souvent très déformée . L'apparition de rejets aériens est alors strictement liée à la reprise de croissance de la radicule. Lors des observations, celle ci n'a jamais eu lieu à partir de l'extrémité , Très souvent une ou deux racines secondaires à direction orthotrope prenaient naissance à environ 5mm de l'ancien apex . Dès lors la croissance aérienne reprenait avec l'apparition de rejets modifiés ou non. Les plantules traitées qui n'ont pas régénéré de nouvelles racines se dépigmentent au bout de trois semaines et meurent. La régénération de nouvelles racines est le premier obstacle à l'obtention de plantules plus développées. Il semble dans cette optique souhaitable d'utiliser des milieux de repiquage favorisant la rhizogénèse.

D'autre part, il a été traité des graines prégermées (radicule non visible) décuticulées. Ce traitement a diminué nettement la mortalité en permettant à la plantule une activité photosynthétique plus précoce . Cet effet positif s'est fait ressentir au niveau du nombre de plantes ayant reconstitué leur appareil souterrain. L'action de la colchicine y est aussi plus direct et il semble que dans ces conditions, une durée de traitement de 25h soit trop élevée.

En résumé, le traitement optimum apparait comme être le suivant:

- traitement de graines prégermées décuticulées, pendant 15 heures dans une solution de colchicine à 0,05%. Les graines sont déposées dans une boite de Pétri et recouvertes tangentiellement par la solution . La boite est mise en chambre éclairée à 24°C.

- Repiquage à l'interieur de tubes à essai sur un milieu contenant agar agar, KNOP et auxines à des concentrations favorisant la rhizogénèse.

- Mise en place définitive en serre dans des pots en tourbe lorsque les plantules présentent au moins deux feuilles trifoliées.

B. L'isolement des types sexuellement tétraploides

Les difficultés rencontrées par divers auteurs lors du tri des polyploides laisse envisager chez la luzerne la présence de cytochimères . Par analogie à ce qui a été fait personnellement sur le caféier et par DERMEN sur la vigne, la forme de la feuille à été le premier crible retenu pour sélectionner les formes sexuellement tétraploides.

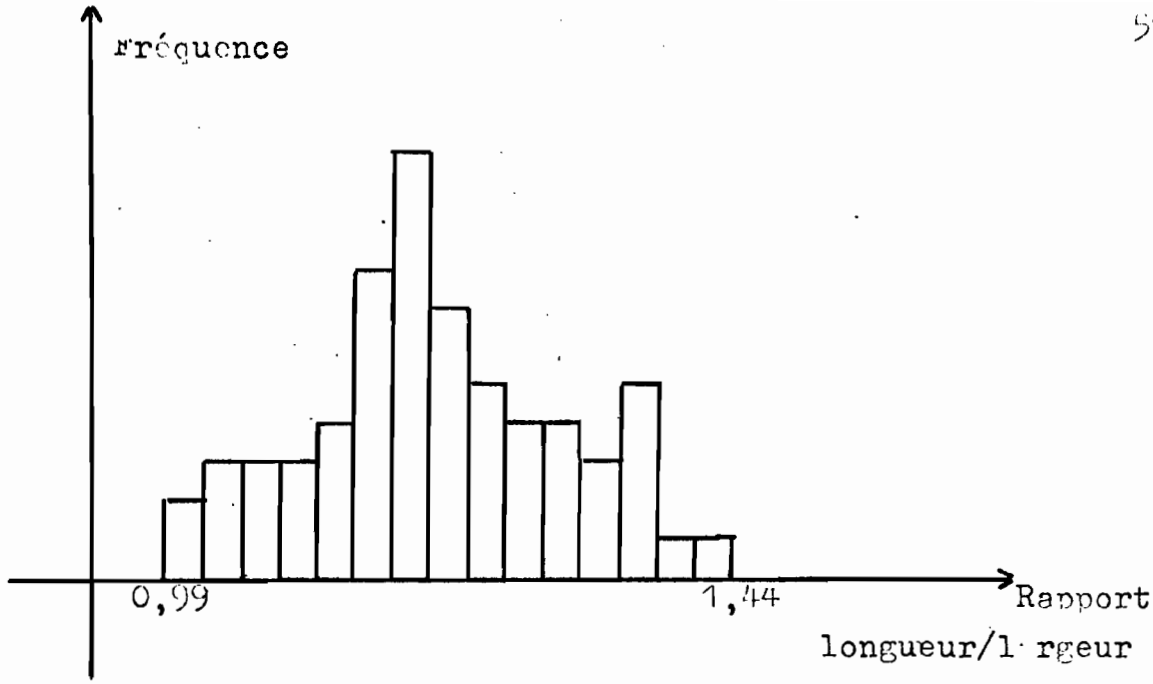
1° L'étude du caractère au niveau diploide

Les mensurations se font sur le foliole médian à l'aide d'un pied à coulisse. La plus grande largeur et la plus grande longueur ont été mesurées.

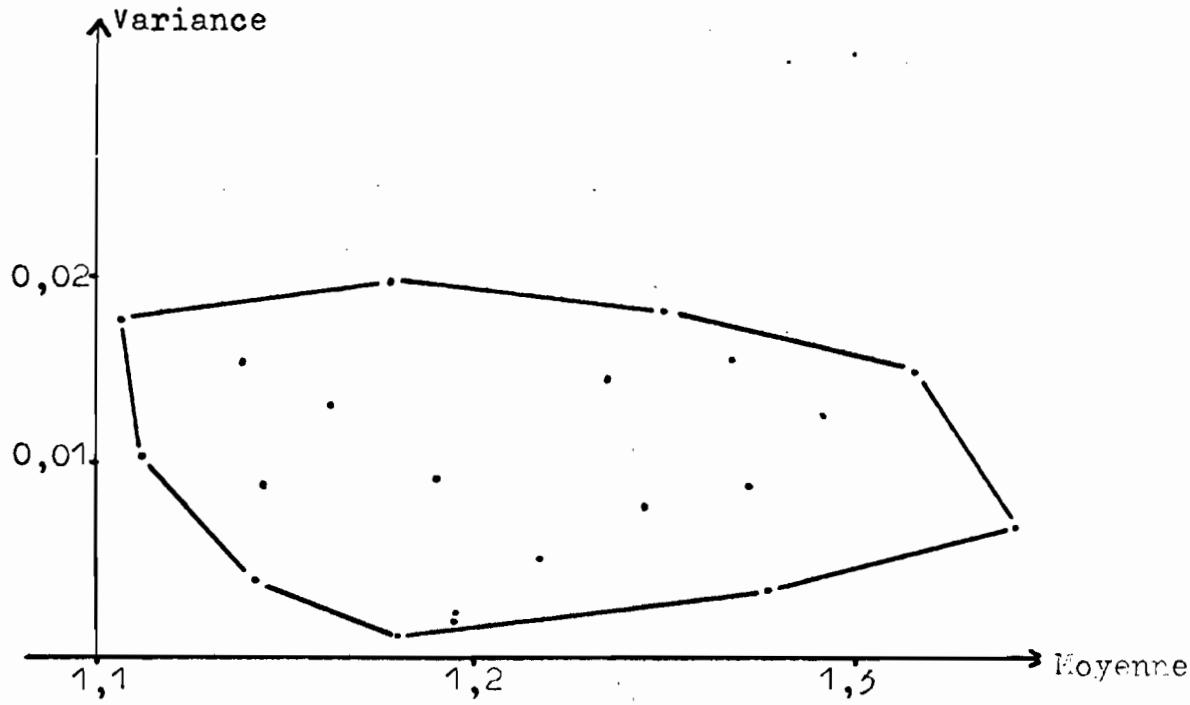
Huits feuilles sont suffisantes pour avoir la moyenne d'un pied avec une précision de 5%.

Le caractère"forme de la feuille",représenté par le rapport longueur/largeur s'apparente à une loi normale. La variance est indépendante de la moyenne et la distribution symétrique .(voir fig p.51).

L'analyse des facteurs de variations chez Medicago Hispida montre que le caractère est indépendant de la population . Par contre on observe un effet génotype à l'intérieur de la population, un effet tige à l'intérieur d'un plant et enfin un gradiant entre les feuilles le long de la tige.(voir annexe 4).



Distribution du rapport d'allométrie du foliole médian chez Medicago hispida



Graphique montrant l'absence de relation moyenne variance pour le rapport d'allométrie .

Une étude plus précise de ce gradiant montre qu'il est linéaire et ne dépend pas de la population à l'interieur de l'espèce . Cependant ,il est différent d'une espèce à l'autre;(voir les figures 1 et 2 des pages 53 et 54).

Cette variation continue de la forme rend impossible la mise au point d'un crible de sélection aussi simple que celui mis au point sur le caféier.

D'autres caractères comme la longueur ou la largeur présentent les mêmes caractéristiques et ne suffisent pas pour un tri efficace des plants sexuellement tétraploides.

L'utilisation de deux caractères simultanément fut alors envisagée . Elle permet d'éliminer l'effet noeud en effectuant le rejet de l'hypothèse diploide non plus par rapport à une distribution normale à une dimension mais par rapport à une éllipse de densité à deux dimensions.

Les différentes régressionsentre les trois caractères (L/l,l,L) furent faites. Si les trois caractères apparaissent comme très liés dans une régression multiple (r compris entre 0,977 et 0,995) la combinaison "Longueur- Largeur" fut retenue.

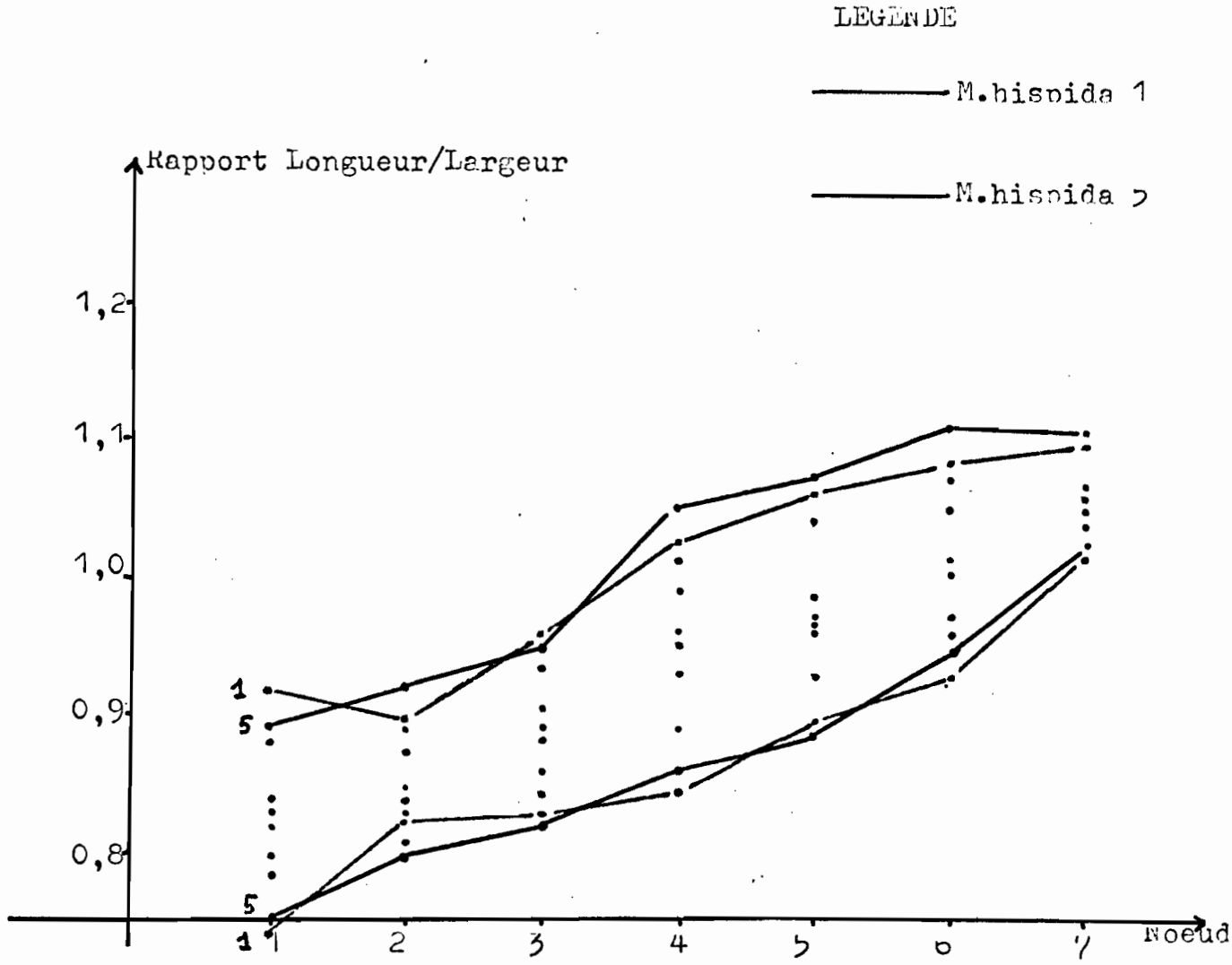


Diagramme de dispersion des points montrant l'absence de différences entre deux populations d'Hispida lors de l'évolution de la forme au cours de la croissance.

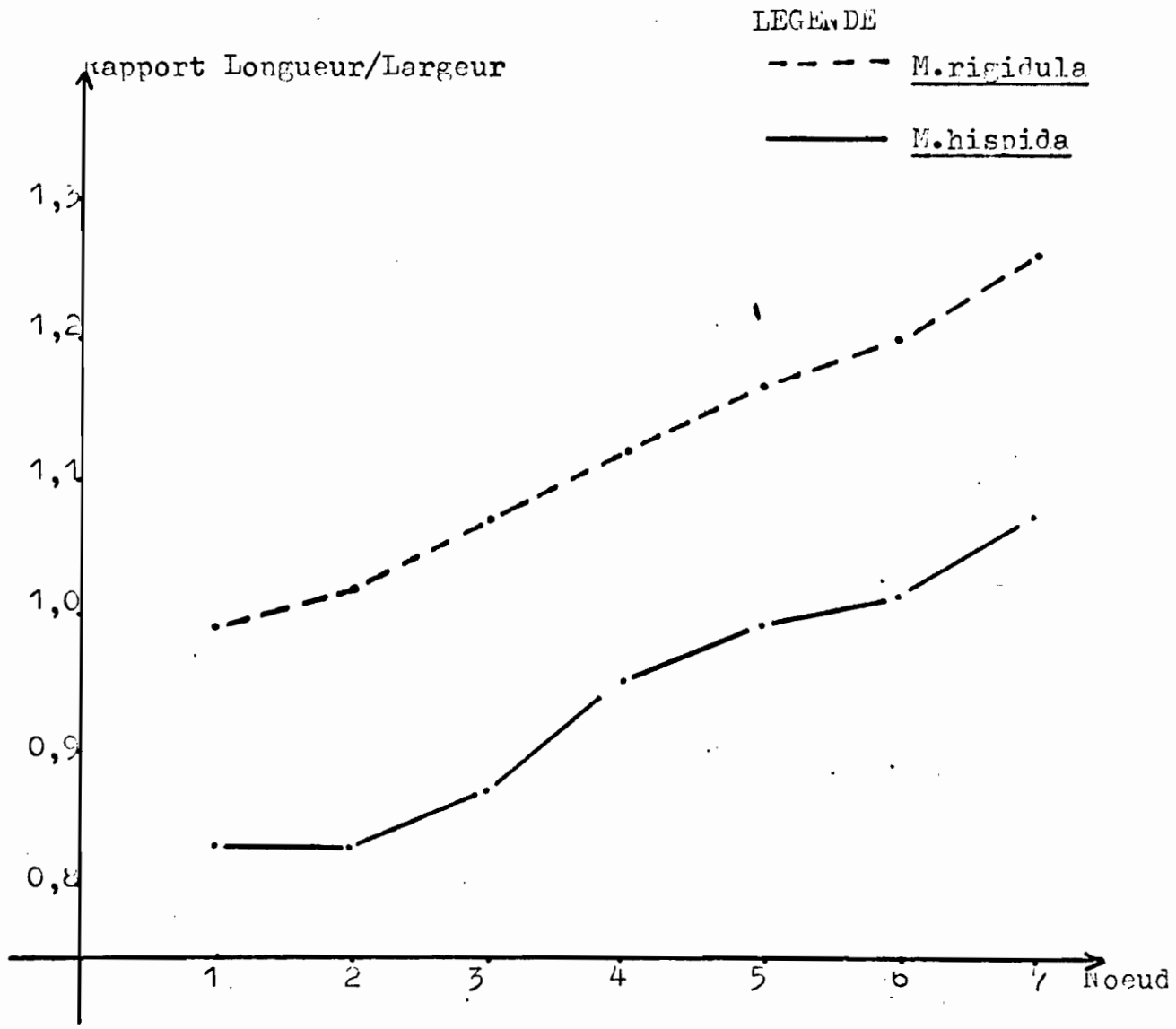
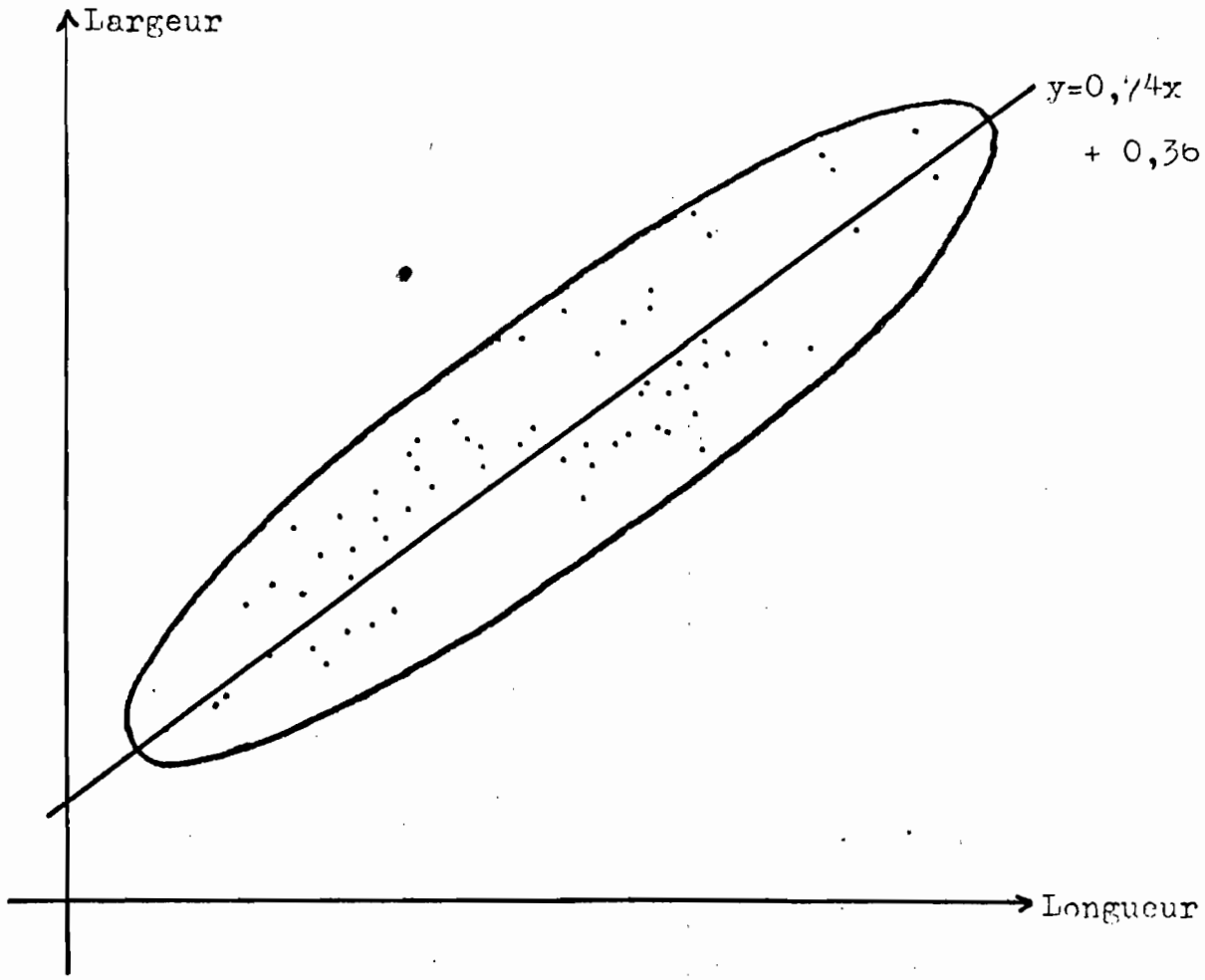


Diagramme de régression de la forme en fonction de la croissance chez deux espèces du genre Medicago

b) Le choix du seuil de rejet

Il a été choisi égal à 2,5%. La matrice de covariance étant connue, il a pu être calculé à l'aide de la calculatrice Programma les points de l'ellipse de densité à deux dimensions au seuil 2,5% représentée à la page 56.

La confirmation pour une feuille est alors de 97,5%. Il suffit alors que le plant présente plusieurs feuilles consécutives n'appartenant pas à l'ellipse diploide pour que l'on puisse considerer comme stochastiquement certain le fait tétraploide.



Ellipse de densité à deux dimensions de M.hispida diploide au seuil de 2,5% .

Iv. Discussion

A. Utilisation de la colchicine

1° Lors du traitement sur graines

Contrairement à la mutagénèse classique, la polyploidisation par la colchicine requiert une condition essentielle : la division cellulaire .

Le méristème n'apparait plus seulement nécessaire au niveau de multiplicateur , mais comme opérateur de la mutation.

Je m'explique : Lors du traitement aux rayons X par exemple, l'utilisation du méristème avait pour but l'obtention à partir d'une cellule initiale touchée d'un territoire permettant l''isolement de la mutation. Dans ce sens, il est important d'atteindre une cellule la plus apicale possible en raison de l'importance de sa future descendance. Par contre, avec la colchicine, seules les cellules en division à l'intérieur du méristème peuvent être polyploidisées. D'où la nécessité que ce méristème soit fonctionnel au moment de la pénétration de la drogue. Ceci est particulièrement visible avec l'utilisation de la prégermination caractéristique des traitements à la colchicine sur graines . Dès cet instant, le rôle multiplicateur est secondaire puisque dépendant du premier.

Entre autres conséquences, il importe de réunir toutes les conditions optimales de la mérésis. Au niveau de la température, on constate que les auteurs cités en bibliographie opèrent dans les valeurs optimums correspondant à la plante utilisée. D'autre part, afin d'augmenter le nombre de cellules en division, divers chercheurs produisent des chocs thermiques pour obtenir le maximum de cellules au stade préprophasique . De même BERTHAUT, sur le trèfle violet, préconise l'emploi de substances dites de croissance .

La pénétration de la colchicine et la diminution de la mortalité constituent les deux autres points vers lesquels se sont orientées les recherches. La présence d'une interaction entre la concentration et la durée du traitement montre l'existence d'un seuil quantitatif en dessous duquel la division se poursuit normalement. Le choix est cependant délicat en raison des répercussions secondaires. En effet, on pourrait pour atteindre le même seuil soit augmenter la concentration en diminuant la durée, soit inversement augmenter la durée en diminuant la concentration. Ceci est pratiquement impossible: En effet dans le premier cas, en dessous

d'un certain temps ,quelque soit la concentration, la pénétration n'aurait pas lieu. De plus,à des concentrations trop élevées, le traitement aurait pour effet la mort des cellules touchées laissant indemmes les autres cellules où la colchicine n'aurait pas eu le temps de pénétrer. Dans le deuxième cas, quelque soit la durée, en dessous d'un certain seuil de colchicine (10.10^{-5}),l'effet stathmocinétique n'a plus lieu. D'autre part, une augmentation de l'immersion aura pour effet la mort de l'embryon par asphyxie.

Afin de concilier ce difficile compromis plusieurs auteurs ont cherché à améliorer la pénétration de la colchicine. Ainsi à la concentration de 50.10^{-5} qui nécessite des temps d'immersion de 24 à 48h, l'utilisation du vide a permis à BERTHAUT de réduire la durée à une heure . D'autres auteurs ont choisi les agents mouillants (BLAKESLEE). Personnellement, en décuticulant les graines gonflées de luzerne, j'ai assuré une meilleure pénétration de la colchicine, rendant le temps nécessaire de 24h utilisé au départ,inutile voire néfaste.

Le deuxième obstacle à l'obtention de polyploides par graines étant la forte mortalité, de nombreuses études ont eu pour but l'étude du mécanisme conduisant à la mort de l'embryon. ESSAD et

CACHON ont bien montré l'action toxique de la colchicine au niveau des racines en dégageant la synergie existant entre l'action toxique intrinsèque de la drogue et l'asphyxie causée par l'immersion. Il est à noter qu'il ressort d'une manière générale que tout choc physiologique, thermique ou autre (asphyxie) aboutit en présence de colchicine à décupler les effets,en l'occurence la mortalité. Cette asphyxie possède une autre conséquence secondaire et non des moindres, elle diminue l'activité méristématique et par là,la probabilité de mutation.
Au cours des travaux réalisés sur la luzerne, nous avons opté pour la méthode décrite par DOMMERGUES qui consiste à immerger tangentiellement les graines par la solution de colchicine. Cependant, dans 99% des cas,il a pu être observé que l'apex radiculaire initial disparaissait. L'observation in vitro de l'apparition de racines secondaires orthotropes émises à environ 3mm au dessus de l'ancien apex et de sa relation avec la reprise de végétation de la partie aérienne, nous a conduit à admettre comme nécessité à la diminution de la mortalité la réapparition d'un système racinaire dans les trois semaines qui suivent le traitement. L'utilisation d'un milieu de repiquage favorisant la rhizogénèse doit

réduire considérablement la mortalité.

En résumé, il ressort de toutes ces données que le traitement doit avoir lieu dans des conditions d'isothermie optimales favorisant d'une part les divisions cellulaires et diminuant d'autre part les chocs physiologiques. Les graines prégermées sont décuticulées pour diminuer les risques dûs aux champignons, accélerer la mise en place de l'activité photosynthétique et augmenter la pénétration de la colchicine . Les graines ainsi préparées sont déposées dans une boite de Pétri et sont à peine recouvertes de solution. Cette dernière doit avoir une concentration variant entre 50 et 100.10^{-5} pour assurer le meilleur effet stathmocinétique.L'utilisation du vide ou d'agents mouillants est préconisée pour diminuer l'asphyxie consécutive à un temps d'immersion trop élevé. L'emploi d'agents favorisant la mérésis doit parfaire le tout . Enfin, le repiquage in vitro dans un milieu constitué d'agar agar, KNOP et substances favorisant la rhizogénèse doit assurer une bonne reprise et augmenter ainsi les probabilités de succès.

2°- Lors du traitement sur bourgeons axillaires

Comme dans le cas du traitement sur graines, les données bibliographiques et les expériences personnelles montrent bien l'influence du taux de divisions cellulaires et de l'asphyxie. Par contre, une nouvelle caractéristique apparait avec l'action particulièrement importante de la dominance apicale.

Le rôle de l'index mitotique apparait au travers de quelques exemples bien précis . Le premier de ceux ci est la réussite des traitements lorsque les conditions optimales de croissance sont réunies; ainsi pour le caféier, la période idéale sur la Côte Est malgache est l'intersaison (Septembre-Octobre; Mars- Avril). Le succès spectaculaire sur les espèces particulièrement vigoureuses a été relaté par DERMEN et BERTHOU respectivement sur la vigne et le caféier. Personnellement, nous avons pu observer aussi le rôle important de la vigueur au niveau des triploides C.arabica x Mascarocoffea . Ces arbres présentent en effet un fort hétérosis positif et il n'est pas nécessaire d'insister sur la relation existant entre l'héterosis et le taux de divisions au niveau de l'apex (DEMARLY 1972). Parallèlement, l'utilisation de l'eau de coco ,dont les propriétés excito-mito-

tiques ne sont plus à démontrer, a permis de suppléer au manque de vigueur de certains clônes. Tous ces exemples montrent l'importance du taux de cellules en division au niveau de l'apex traité.

Les avantages théoriques d'un contact constant entre le méristème et la drogue ont fait envisager à BLAKESLEE et DERMEN entre autres, l'utilisation de supports lipidiques . Ils ont cependant été peu utilisés en raison de la toxicité apparente qui résultait de leur utilisation. DERMEN montre que,pourtant,mélangée à l'eau, la glycérine donne de bons résultats. Cette action toxique est à rapprocher de l'effet d'asphyxie lors de l'immersion des graines. Chez le caféier une diminution des nécroses est observable lorsque la lanoline pure est remplacée par une émulsion contenant 50% d'eau (cas des traitements C_1K_0 de l'essai)

BARTHOU (1975) décrit chez le caféier le rôle de la dominance apicale. DERMEN en 1954 sur la vigne précise l'importance de la vigueur en interaction avec la dominance apicale. A Madagascar, les échecs de nombreux Mascarocoffea traités en champs sont imputables à ce facteur. Le traite-

ment systématique en parc à bois de tiges orthotropes doit permettre en éliminant le facteur plagiotrope un rétablissement plus aisé de la dominance apicale . De même, un léger retard entre la rupture de la dominance et le dépot de la colchicine a été utilisé. Sur la luzerne, plante à faible dominance apicale, KHOSROWCHAHLI a été contraint à traiter des boutures d'un noeud au détriment de la vigueur. Ceci l'a amené aussi à appliquer un retard de 24h entre la préparation et l'application de colchicine pour permettre aux bourgeons axillaires une reprise de croissance. MASSIHA (thèse en cours) utilise chez la tomate un décalage de 7 à 8 jours entre la décapitation de l'apex orthotrope et le dépot de colchicine.

En résumé, l'utilisation de la lanoline sous forme d'émulsion a montré les avantages théoriques d'un contact constant entre la drogue et les méristème en croissance. L'apport d'eau de coco a permis la duplication de certains clônes peu vigoureux ; il a permis de faire ressortir le rôle de la vigueur et son interaction avec la dominance apicale . Dans les cas rebelles, le greffage, la multiplication préalable en parc à bois et l'application d'un retard entre la coupe et le traitement sont les artifices à retenir pour

suppléer le manque de vigueur et rétablir au niveau des bourgeons axillaires traités la dominance apicale.

B. L'isolement et la confirmation des polyploides

Les travaux de mutagénèse classique récapitulés par DOMMERGUES dans son article "Destinée de la cellule mutée" et par DULIEU (1967), ainsi que les réflexions sur le comportement de l'apex (DEMARLY 1972)(NOZERAN 1971) font ressortir les avantages des méristèmes peu différenciés. Nous noterons la contradiction apparente lors du traitement à la colchicine entre la nécessité d'un grand nombre de cellules en divisions et la présence d'un méristème peu différencié. Actuellement aucune étude appliquée à la duplication chromosomique n'a permis de résoudre le problème.

Une cellule apicale se divise peu et sa probabilité d'être en mitose est faible. Cependant si elle a été touchée, sa descendance sera importante mais n'apparaitra que tardivement. En mutagénèse classique, DULIEU cite de nombreux cas où le territoire mutée apparait au 8^{e} et même au 14^{e} noeud. Par contre, une cellule de la zone sous apicale (ou

anneau initial) possède un taux de division élevé et aura une forte chance d'être atteinte par la colchicine. Sa descendance est plus réduite mais apparaitra presqu'immédiatement. Comme autres cellules touchées par la colchicine, il ne faut pas oublier les méristèmes des préfeuilles où l'activité mitotique est intense. En résumé, les secteurs les plus touchés sont les ébauches foliaires et la zone sous-apicale. Lors de la croissance, apparaitra dans presque tous les cas une première et une deuxième paire de feuille très touchées mais dont l'hétérogénéité est importante (juxtaposition de petits territoires diploides et tétraploides). Ceci correspond bien avec l'aspect extérieur de la mutation décrit par DERMEN sur la vigne et par BERTHOU sur le caféier. Les feuilles suivantes retournent assez rapidement à l'état diploide en croissance monopodiale. Cependant avec une faible probabilité, un territoire entièrement tétraploide peut apparaitre dans certains cas. Il sera le résultat d'une cellule touchée de la zone apicale. Ce cas a été observé une fois à Madagascar sur le clône 8.5.58 de C.canephora.Nous remarquerons aussi que dans ce cas, l'utilisation d'un support solide permettant un contact prolongé avait augmenté la probabilité de mutation de la cellule apicale.

Afin de concilier de compromis entre l'homogénéité (qui facilite le tri) et le rendement (obtention certaines de rejets polyploides), BERTHOU utilise les bourgeons les moins différenciés. Cependant,de par sa méthode de tri (utilisation de la deuxième paire de feuille comme crible visuel), il sélectionne sur des territoires issus de la zone sous apicale.

KHOSROWCHAHLI et MASSIHA respectivement sur la luzerne et sur la tomate détruisent préalablement les bourgeons les plus diff renciés. Mais chez ces deux plantes, ces derniers contrairement au caféier ne se présentent plus sous forme de points méristèmatiques plus ou moins gros; mais sous forme d'axes orthotropes plus ou moins développés.D'où la nécessité soit de traiter à leur niveau après rupture de leur apex terminal, soit de les éliminer. La deuxième solution a été retenue.Cette opération n'apparait plus alors comme une nécessité pour la mutation mais comme un problème de dominance apicale.L'utilisation d'un temps de retard entre la rupture de l'apex terminal et l'application du traitement revient à laisser se développer les méristèmes les plus petits et confirme la prépondérance du rôle opérateur dur le rôle multiplicateur.

Ce dernier reprend toute son importance,comme en mutagénèse classique, lors du tri des bourgeons situés à la base de la deuxième paire de feuille en mosaique . Si la composition de la série axillaire reflète en moyenne la structure de cette feuille, l'hétérogénéité de cette dernière laisse espérer,au niveau des bourgeons, la possibilité d'isoler des rejets plus riches en cellules tétraploides. L'utilisation de méristèmes peu différenciés augmente la probabilité d'apparition rapide de la mutation sur des territoires importants. Chez les plantes à forte dominance apicale, comme C.canephora, l'opération nécessite la destruction à chaque niveau foliaire de l'apex terminal (croissance sympodiale forcée). Pour assurer la pérénnité de la mutation, liée à l'absence de cellules diploides au niveau de l'apex, la croissance sympodiale forcée doit se poursuivre au moins sur trois noeuds après l'apparition de la première feuille symétrique tétraploide. Chez d'autres plantes comme la vigne se processus est naturel (DERMEN 1954).Chez les végétaux à dominance apicale réduite (luzerne) ou à fort thallage, on observe l'apparition spontanée de tiges entièrement tétraploides parmi un ensemble de rejets diploides ou mixoploides ; elles récapitulent naturellement le pro-

cessus de ségrégation des territoires diploides et tétraploides au niveau des bourgeons axillaires.

Les études faites sur les chimères périclines montrent que chez les dicotylédones, l'apex se comportent comme ayant trois couches indépendantes en croissance monopodiale. Celles ci ont été nommées par BLAKESLEE et SATINA LI, LII et LIII . Leur devenir au niveau des organes est spécifique, mais généralement, on attribue chez la feuille l'épiderme à la LI, le parenchyme à la LII et la nervure principale à la LIII. Dans certains cas, la LIII se réduit à la moelle du pétiole, dans d'autres, elle est à l'origine des nervures secondaires. Au niveau des racines obtenues par du bouturage, les comptages chromosomiques montrent leur origine dans la LIII. Chez les organes sexuels, la LII est à l'origine de la zone gamétogène. Pour isoler des plants sexuellement interessants, il est primordial de retenir des caractères morphologiques propres à cette couche. DERMEN, dont les premiers travaux ont eu lieu sur les chimères périclines chlorophylliennes, montra l'importance de la forme de la feuille dans le crible des polyploides . Il rejeta aussi d'emblée le comptage chromosomique d'extrémités racinaires.

Cependant à la vue de toutes ces données ,nous remarquerons que cette méthode méapporte un biais que dans le cas de la croissance monopodiale. Lors d'une croissance sympodiale, il dépendra de la stabilité des mésochimères. Si par exemple la structure 424 se transmet au niveau des bourgeons axillaires, le biais sera important aussi bien dans le risque de rejet de vrais tétraploides (formes 242 ou 442) que dans le risque d'acceptation de formes sexuellement diploides (types 224 ou 424). Par contre, si la LIII est instables ,l'homogénéisation à partir de la LII permet le comptages d'extrémités racinaires sans biais.

Par analogie, l'utilisation de caractères épidermiques est à roscrire dans un premier temps. Elle ne peut servir que pour définir parmi les formes sexuellement tétraploides les plants dont l'épiderme est diploide . La connaissance de la structure exacte du polyploide est importante en raison du - risque faible mais réel de réversion.

V. Conclusions

Les travaux exécutés sur le caféier et la luzerne, ainsi que les données bibliographiques montrent l'importance du rôle opérateur du méristème lors du traitement à la colchicine, aussi bien sur graines que sur bourgeons axillaires.

La prégermination (dans le cas de traitements sur graines), la réunion des conditions optimales de croissance, l'action favorable de l'eau de coco , le rôle de la vigueur sont autant d'exemples montrant la nécessité d'un grand nombre de mitoses dans la réussite du traitement.

Parallèlement, l'emploi de la lanoline dont le contact prolongé permet une synchronisation avec la périodicité journalière de la mérésis, nous fit réussir la polyploidisation chez les clônes peu vigoureux.

Dans le cas du traitement sur bourgeons axillaires, la dominance apicale, en interaction avec la vigueur, constitue un facteur important de succès. De même , l'application d'un retard entre la préparation et le dépôt de colchicine conduit à rétablir la dominance apicale au niveau des bourgeons traités et d'atteindre les conditions mitotiques optimales.

Comme autres facteurs de réussite, il convient d'éviter les chocs physiologiques (changement de température, asphyxie) dont les effets rentrent en synergie avec l'action toxique de la colchicine.

Enfin dans le cas de traitements sur graines, l'apport dans le milieu de repiquage de substances favorisant la rhizogénèse diminue la mortalité. Cette dernière étant étroitement liée à l'arrêt de croissance du système racinaire.

Par contre, le rôle multiplicateur du méristème prend toute sa signification lors de l'isolement de la mutation. En effet, l'action de la colchicine se traduit au cours de la croissance par l'apparition de feuilles en mosaiques (DERMEN) originaires des préfeuilles et de la zone sous apicale. En croissance monopodiale, les déformations s'estompent dès la troisième ou quatrième noeud. La desinsertion des méristèmes paucicellulaires hors du système des corrélations d'inhibition chez les feuilles en mosaique issues de la zone sous apicale permet un isolement rapide de la mutation sur des territoires importants. Afin d'éviter le retour de zones diploides sur un rejet fixé, le tri est poursuivi sur trois noeuds minimum. Chez les plantes à faible dominance

apicale, la ségrégation se fait naturellement et aboutit à l'apparition le long de la tige principale mixoploide de tiges secondaires tétraploides ou diploides.

Un certain polymorphisme pour les caractères foliaires des polyploides obtenus chez le caféier laisse penser à la présence de chimères périclines stables et fait reconsidérer le crible des tétraploides aussi bien issus de graines que de bourgeons axillaires. La forme de la feuille est le seul caractère précoce, facile à manipuler, capable de fournir la nature de la couche sexuellement interessante L II . Les caractères épidermiques ne peuvent servir qu'à distinguer les cytochimères 244 et les tétraploides 444 . La connaissance de la nature du polyploide est importante en raison du risque faible ,mais réel de réversions des types 244.

La technique de confirmation mise au point sur le caféier est efficace et se base sur le rejet de l'hypothèse diploide pour chacun des caractères. Trois feuilles suffisent pour considérer la structure observée comme stochastiquement certaine. Les critères de sélection sont les suivants:

- symétrie
- forme caractérisée par le rapport longueur/largeur
- longueur de la plus petite des cellules de garde du stomate
- densité stomatique

A un niveau de ploidie donné, les caractères sont indépendants entre eux. Le caractère densité stomatique est extrêmement variable et requiert l'emploi de transformations logarithmiques. Cependant, lorsque les comparaisons sont faites génotype par génotype et dans les mêmes conditions de milieu, la polyploidisation de l'épiderme diminue la densité de stomates de moitié ce qui confirme la relation décrite par FRANCO et RANDOLPH .

Chez la luzerne, la modification continuelle de la forme au cours de la croissance nous a permis d'étendre la méthode à un cas plus général. La confirmation des plants sexuellement tétraploides se fait non plus par rapport à une distribution normale à une dimension mais par rapport à une distribution à deux dimensions représentée par une éllipse de densité à deux variables : longueur et largeur.

En résumé, la présence de facteurs limitatifs a permis d'analyser leur impact et d'envisager les moyens de les contrôler. Par exemple, le rôle de la vigueur sur l'activité mitotique et sur la résistance aux chocs physiologiques prendra un aspect capital lors de la duplication chromosomique de plants haploides d'espèces allogames.

Parallèlement, les chimères périclines auront un impact sur le tri des diploides homozygotes obtenus. Celui ci devra être efficace et tenir compte de la structure histologique du matériel de départ ; toutes les combinaisons étant possibles si la plante haploide est une chimère péricline issue d'un cal impur.

B I B L I O G R A P H I E

- - - - - - - -

A. Citée dans le texte

- BERTHAUT : Obtention de trèfles violets tétraploides. Quelques essais d'amélioration des techniques de doublement. (Ann. Amelior. Plantes, 1965,15 (1),)

- BERTHOU : Méthode d'obtention de polyploides dans le genre Coffea par traitements localisés de bourgeons axillaires à la colchicine.(Café Cacao Thé: en cours de publication)

- BINGHAM : Stomatal chloroplasts in alfafa at polyploidy level.(Crop Science, vol.8, 1968)

- BLAKESLEE: Dédoublement du nombre de chromosomes chez les plantes par traitement chimique.(C.R. Ac.Sc.,15 Sept.1937, p.476-479.)

- BLAKESLEE : Effect of induced polyploidy in plants (Amer.Nat.,75, 1941)

- BUTTERFASS: Die praktische Ermittlung des Ploidiegrads von Zuckerrüben durch Zählen der Schliesszellen Chloroplasten. (Züchter 28, 1958)

- CAPOT, DUFAUTEX et DURANDEAU : L'amélioration du caféier en Côte d'Ivoire. Duplication chromosomique et hybridation . (Café Cacao Thé: 1968, n°2)

- COCHRAN et COX : Expérimental désigns. Wiley, New York 1968

- DENARLY : hétérosis et régulation. (Ann.Amél.Pl. 1972)

- DERMEN : Colchicine polyploidy and technique.(Bot. Rev.: 6 , 1940)

- DERMEN : Simple and complex périclinal tétraploidy in peaches induced by colchicine. (Proc.Amer. Soc.Hort.Sci.: 38, 1941)

- DERMEN : The méchanism of colchicine induced cytohistological changes in cranberry.(Amer.Journ.Bot. 32, 1945)

- DERMEN : Périclinal cytochimeras and histogenesis in cranberry.(Amer.Journ.Bot.:34, 1947)

- DERMEN : Histogenesis of some bud sports and variegations. (Proc.Amer.Soc.Hort.Sci.: 50, 1947)

- DERMEN : Inducing polyploidy in peach varieties. (Journ.Héred.: 38, 1947)

- DERMEN : Chiméral apple sports and their propagation through adventitious buds.(Journ.Hered.: 39, 1948)

- DERMEN : Pattern reversal in variegated plants. (Journ.Hered.: 41, 1950)

- DERMEN : Ontogeny of tissues in stem and leaf of cytochiméral apples.(Amer.Jour.Bot.: 38, 1951)

-DERMEN : Tetraploid and diploid adventitious shoots from a giant sports of Mac Intosh apple.(Jour. Hered.: 42, 1951)

- DERMEN : Polyploidy in apple found seven years after colchicine treatment. (Jour.Hered.: 43, 1952)

- DERMEN : Pattern of tetraploidy in the flower and fruit of cytochimeral apple. (Jour. Hered.: 43,1952)

x - DERMEN : Periclinal cytochimeras and origin of tissues in stem and leaf of peach. (Amer.Jour.Bot. 40, 1953)

- DERMEN : Colchiploidy in grappes .(Jour.Hered.: 45, 1954)

- DERMEN : Nature of plant sports.(Amer.Hort.Mag.: July 1960)

- DERMEN et SCOTT : A note on natural and colchicine induced polyploidy in peaches. (Proc.Amer.Soc.Hort. Sci.: 36, 1938)

- DOMMERGUES : Action de la colchicine sur l'orge cultivée. (Ann.Amel.Pl.: 5, 1951)

- DOMMERGUES : La destinée de la cellule mutée: conséquences dans le cas des plantes à multiplication végétative et dans le cas des plantes à reproduction sexuée. (Eucarpia : III Congrès, Paris)

- DULIEU : Etude de la stabilité d'une déficience chlorophyllienne induite chez le Tabac par traitement au méthane sulfonate d'éthyle.(Ann.Amel.Pl. 17, 1967)

- EIGSTI et DUSTIN : Colchicine in Agriculture, Médecine, Biology and Chemistry.(1955)

- EINSET, BLASER et IMHOFE : Chimeral sports of apple. (Jour.Hered.: 38, 1947)

- EINSET et LAMB : Chimeral sports of grapes. (Jour. hered.: 42, 1951)

- EINSET et PRATT : "Giant" sports of grapes. (Proc. Amer.Soc.Hort.Sci.: 63, 1954)

- ESSAD et CACHON : Recherches préliminaires sur l'orge pour une tentative d'amélioration des traitements à la colchicine. (Ann.Amel.Pl.: 15, 1965)

- ESSAD et TOUVIN : Techniques de production et de contrôle des betteraves polyploides. (Ann.Amel.Pl.: 1959)

- FRANCO : Relation between chromosome number and stomata in Coffea . (Bot.Gaz.:100, 1939)

- FROST et KRUG : Diploid-tétraploid périclinal chiméras as bud variants in Citrus. (Genetics:27, 1942)

- FUNKE : Vergleichende morphologische and physiologische Untersuchungen am Pollen diploides and autotétraploides Kulturplanzen. (Z.pflanzens.:56, 1956)

- KHOSROWCHAHLI : Mise au point d'une méthode de polyploidisation chez la luzerne diploide . (D.E.A. Amélioration des Plantes, 1970, Orsay)

- KUZDOWICZ : Définition du dégré de polyploidie d'après le nombre de pores du pollen de betteraves. (Inst.Int.Rech.Batt.,XXI^{e} Congrès d'hiver 1956)

- LESINS : Techniques for rooting cuttings, chromosomes doubling and flower émasculation in alfafa. (Can.Jour.of Agr.Sci.:1955)

- MASSIHA : (Thèse de 3^{e}cycle en cours,Orsay)

- MENDES : Induced polyploidy by treatement with colchicine . (Nature:3616, 1939)

- MOCHIZUKI et SUEOKA : Genetic studies on the nomber of plastids in stomata. 1. Effets of autopolyploidy in sugar beets. (Cytologia : 20, 1955)

- NOZERAN : Intervention of internal correlations in the morphogénésis of higher plants. (Adv. Morphogénésis :9 , 1971)

- PRATT : Radiation damage in shoot apices of Concord grape .(Amer.Jour.Bot.: 46, 1959)

- RANDOLPH : Cytogenetics of tetraploid maize. (Jour. of Agr.Res.: 50, 1935)

- SATINA : Periclinal chimera in Datura in relation to development and structure (A) of the style and stigma (B) of calyx and corolla .(Amer.Jour. Bot. : 31, 1944)

- SATINA ET BLAKESLEE : Périclinal chimeras in Datura stramonium in relation to developpment of leaf and flower . (Amer. Jour. Bot.: 28, 1941)

- SAVITSKY : Polyploid sugar beets. Cytological study and méthods of production .(Proc.Amer.Sugar Beet.Tech. 1952)

- SAX et SAX : Stomata size and distribution in diploid and polyploides plants. (Plant Breed.Abs.: 1937)

- SCHOH : Variation de la densité stomatique de Capsicum annuum L. en fonction du rayonnement global. (C.R.Acad.Sc.,1972, Paris,série D)

- SCHWANITZ : Einige kritische Bemerkungen zur Methode des Bestimmung des Polyploidie durch Messing der Pollen und Spaltöffnungsgrösse. (Züchter : 22, 1952)

- SONDAHL, MONACO et CARVALHO : Novo método de obtenção de poliploidia em café usando colchicina Ciencia e cultura .(vol 25, 1971, Suplemento)

* - THOMPSON et OLMO : Cytohistological studies of cytochimeric and tétraploid grapes.(Amer.Jour. Bot.: 1963)

x - TILNEY-BASSET : The structure of périclinal chimeras. (Heredity: 18,5)

+ - VISHVESHWARA et CHINNAPPA : Induced autotétraploid in Coffea canephora Pierre Ex Froehner .(Curr.Sci. 34, 5, 1965)

B. Consultée

- ANDERSON : Introduction to multivariate analysis. (Wiley, New York)

- BREMER-REINDERS et BREMER : Methods used for producing polyploid agricultural plants. (Euphytica 1, 1952)

- COSTE : Les cafeiers et les cafés dans le monde. (Ed.Larose, Paris 1961)

- DAGNELIE : Théorie et méthodes statistiques.(2vol.) Les presses agronomiques de Gembloux,1970)

- DERLEN et SCOTT : Potentials in colchiploid grapes. (Econ.Bot.: 16,1962).

- DORSEY : Chromosomes doubling in the céréals.(Jour. Hered. : XXX, 1939)

- EMSWELLER et STEWART : Diploid and tétraploid pollen mother cells. (Proc.Amer.Soc.Hort.Sci: 57, 19-51)

*- ERNOULD : L'autopolyploidie expérimentale chez la betterave. (Pub.Inst.Belge Amel.Bett.:14, 1946)

- ESSAD : La polyploidie et ses aspects évolutifs en relation avec l'amélioration des plantes. (Ann.Amel.Pl.: 1957, n°2)

- FISHER et YATES : Statistical tables for biological, agricultural and medical research.(Oliver and Boyd, Edinburg, 1963)

- FRANDSEN : Colchicininduzierte Polyploidie bei Beta vulgaris :(Züchter, 11. 1939)

- GARGIULO : Induccion artificial de Poliploidia mediante colchicina en Vitis vinifera .(Vitis: 1960)

- JOHNSON et HOLTZ : Colchicine treatment techniques for sprouted seeds and seedlings. (Can.Jour.Res. 24, 1946)

- KLOEN : La création de betteraves polyploides.(Méth.Jour.Agric.Sci.:5, 1957)

- LELAKIS : Induction de la polyploidie chez Vitis vinifera .(Anh.Ec.Nat.Agric.Montpellier: xxx, 1957)

x - MARGARA et TOUVIN : La polyploidie chez la betterave sucrière. (C.R.Acad.Agric.: 44, 1958)

- MENDES : Observaçoes cytologicas em Coffea .XI. Métodos de tratamento pela colchicina. (Bragantia VII, 1947)

- RASMUSSON et LEVAN : Tétraploid sugar beets from colchicine treatment. (Hereditas 25, 1939)

- ROSENTHAL : Ein Vergleich der Méthoden zur Gewinnung poylploiden Ausgangsmaterials für die Beta Ruben-züchtung. (Wissenschaftliche Abhandlungen 34, 1958)

- RUSCONI CAMERINI : Aspetti citologici e genetici relativi alle costituzione di barbatietole poliploidi .(Ann.Sper.Agrar. 12, 1958)

-

- SALESSES et BONNET : Etude morphologique et cytologique d'un hybride amandier x pêcher et de la forme 4x induite par un traitement à la colchicine. (Ann.Amel.Pl. 1971, 21 (1))

- SCHEFFE : The analysis of variance .(Wiley, New-York)

- SCHWANITZ : Di Herstellung polyploider Rassen bei Beta Rüben and Gemüssarten durch Behandlung mit colchicine. (Züchter : 10, 1938)

x - SHAO-LIN-CHEN et TANG : Studies of colchicine induced autotétraploid barley. (Amer.Jour.Bot.: XXXII 1945)

- SIMONET, DOMMERGUES et LANGLADE : Sur l'obtention d'un engrain tétraploide après traitement colchicinique. (Ass.Fr.Ava.Sci.:68e Congrès, Clermond Ferrand ,1949)

x - SIMONET et FARDY : tétraploide chez l'orge nue à deux rangs provoquée par l'action de la colchicine sur le coléoptile. (Rev.Sci.Paris, t.81, 1943)

x - VAN DILLEWIJN : Some technical remarks about the colchicine treatment of Graminées.(Proc.Ned. Acad.Wet.: 44,9, 1941)

x - VON ROSEN : Problems and methods in the production of tétraploids within the genre Beta . (Beta Socker Handlingar : 5, 1949)

- WARMKE et BLAKESLEE: Induction of simple and multiple polyploidy in Nicotiana by colchicine traitment. (Jour. Hered.: 30 (10), 1939)

x - WILLIAMS : A méthod for differentiating between Coffea arabica and C.canephora plants and their hybrids . (Turrialba, 22 (3) ,1972)

A N N E X E

Annexe 1

RECHERCHE SUR L'AMELIORATION DE LA METHODE DE POLYPLOIDISATION SUR AVEX

I. Les facteurs

1° - Colchicine (3nive ux) :

* C_0 : 2 applications de l'émulsion sans colchicine séparées de 15 jours .
* C_1 : 1 application de l'émulsion à la colchicine suivie à 15 jours d'une application sans colchicine .
* C_2 : 2 applications de l'émulsion à la colchicine séparées de 15 jours .

La colchicine rentre à la dose 1% dans C_1 et C_2 .

2° - Eau de coco (3niveaux) :

* K_0 : 2 applications d'émulsion sans eau de coco séparées de 15 jours
* K_1 : 1 application d'émulsion avec eau de coco suivie à 15 jours d'une application sans eau de coco .
* K_2 : 2 applications avec eau de coco séparées de 15 jours .

L'eau de coco constitue 50% de l'émulsion dans K_1 et K_2, elle est remplacée par de l'eau distillée dans les autres cas .

3° - Protection par un manchon en polyéthylène de l'apex traité (2 niveaux) .

* P_0 : pas de protection .
* P_1 : protection pendant 3 semaines .

II. Schéma expérimental

L'essai trifactoriel " 3 x 3 x 2 " avec confounding, décrit dans " Expérimental Désigns" de COCHRAN et COX , est constitué de deux répétitions de 18 traitements chacune, correspondant aux répétitions 1 et 3 du plan donné par les précédents auteurs . Selon la notation de YATES, on s'aperçoit que les composantes I et J de l'interaction "colchicine - eau de coco " sont respectivement confondues partiellement dans les répétitions 1 et 3 . L'interaction triple se confond dans les deux répétitions. Cette dernière, peu importante dans ses conséquences pratiques, sera mise dans la résiduelle pour simplifier les calculs .

Pour chaque parcelle éléméntaire, le nombre de pieds étant de trois, les données originales seront donc les nombres entiers 0, 1, 2, 3. Comme dans le cas d'un pourcentage, l'analyse de la variance est appliquée aux données transformées suivant

Sources de variation	S.C.E.	D.D.L.	C.M.	F
Totale	192,654	287	////////	//////////
Semaines	3,792	7	0,542	2,67 *
Répétitions	0,003	1	0,003	0,01 NS
Blocs sans repétitions	1,372	4	0,343	1,69 NS
Colchicine	140,612	2	70,506	346,61***
Eau de coco	8,015	2	4,007	19,76***
Protection	2,560	1	2,560	12,62***
Colchicine x Protection	0,825	2	0,412	2,03 *
Eau de coco. Protection	0,526	2	0,263	1,30 NS
Colchicine. Eau de coco	1,454	4	0,363	1,79 *
Répétitions.Semaines	0,084	7	0,012	0,06 NS
(Blocs - Rép.).Semaines	1,991	28	0,047	0,23 NS
Colchicine . Semaines	1,387	14	0,099	0,49 NS
Coco . Semaines	0,898	14	0,064	0,32 NS
Protection . Semaines	0,201	7	0,029	0,14 NS
Colc. Protect.Semaines	0,433	14	0,031	0,15 NS
Coco. Protect.Semaines	0,555	14	0,039	0,19 NS
Colc. Coco .Semaines	1,024	28	0,036	0,18 NS
Erreur	27,582	136	0,203	//////////

L'absence d'interactions significatives "traitements-semaines" autorise la comparaison des traitements à partir des moyennes générales.

b) Régression

* Effets principaux

- Colchicine

Comparaison orthogonale

	C_0	C_1	C_2	
L	+1	0	-1	2r= 192
Q	+1	-2	+1	2r= 576

	SCE	DDL	F
L	134,62	1	663,8 ***
Q	5,99	1	29,5 ***

Le nombre de pieds ayant rétabli leur dominance apicale diminue suivant une régression curvilinéaire en fonction de la dose de colchicine apportée.

- Eau de coco

Comparaison orthogonale

	K_0	K_1	K_2	
L	+1	0	-1	2r=192
Q	+1	-2	+1	2r=576

	SCE	DDL	F
L	0,001	1	0,005 NS
Q	8,014	1	39,7 ***

On observe un effet activateur de K_1 sur le nombre de pieds dont au moins un bourgeon axillaire est entré en croissance .

- Protection par sac en polyéthylène

Comparaison orthogonale

	P_0	P_1
L	+1	-1

	SCE	DDL	F
L	2,560	1	12,62

La régression linéaire est décroissante.

* Interactions

- Colchicine Protection

	C_0P_0	C_0P_1	C_1P_0	C_1P_1	C_2P_0	C_2P_1
C_LP_L	+1	-1	0	0	-1	+1
C_QP_L	+1	-1	-2	+2	+1	-1

	SCE	DDL	F
$C_L P_L$	0,055	1	0,27 NS
$C_Q P_L$	0,773	1	3,81 *

A la dose 1 de colchicine, les deux actions inhibitrices rentrent en synergie .

- Colchicine Eau de coco

Après ajustement des données originales par l'effet blocs, il est possible de faire une comparaison orthogonale .

	C_0K_0	C_0K_1	C_0K_2	C_1K_0	C_1K_1	C_1K_2	C_2K_0	C_2K_1	C_2K_2
C_LK_L	+1	0	-1	0	0	0	-1	0	+1
C_LK_Q	+1	-2	+1	0	0	0	-1	+2	-1
C_QK_L	+1	0	-1	-2	0	+2	+1	0	-1
C_QK_Q	+1	-2	+1	-2	+4	-2	+1	-2	+1

	SCE	DDL	F
C_LK_L	0,112	1	0,55 NS
C_LK_Q	0,003	1	0,01 NS
C_QK_L	1,124	1	5,54 **
C_QK_Q	0,214	1	1,05 NS

B. Conclusions

Pour rétablir partiellement la dominance apicale en levant l'inhibition dûe à la colchicine il convient d'utiliser le traitement $C_1K_1P_0$

2. Mortalité

A. Etude de l'action des traitements sur ce caractère

a) Analyse de variance

(voir le tableau à la page suivante)

Sources de variations	S C E	DDL	C M	F
Totale	49,5895	431	////////	//////////
Répétitions	0,0229	1	0,0229	0,19 NS
Semaines	3,4376	11	0,3125	2,59 **
Blocs sans Répétitions	2,4194	5	0,4839	4,01 **
Colchicine	3,7821	2	1,8910	15,68 ***
Eau de coco	0,3215	2	0,1607	1,33 NS
Protection	0,0025	1	0,0025	0,02 NS
Colchicine Protection	2,0265	2	1,0132	8,40 ***
Eau de coco Protection	0,4646	2	0,2323	1,92 NS
Colchicine Eau de coc	1,9370	4	0,4842	4,01 **
Répétitions Semaines	1,9677	11	0,1789	1,48 NS
(Blocs-Rép.) Semaines	1,1351	55	0,0206	0,17 NS
Colchicine Semaines	2,5879	22	0,1176	0,97 NS
Eau de coco Semaines	0,5366	22	0,0244	0,20 NS
Protection semaines	0,1506	11	0,0137	0,11 NS
Colc/ Protec.Semaines	0,4516	22	0,0205	0,17 NS
Coco ; Prot. Semaines	1,8629	22	0,0847	0,70 NS
Colc. Coco. Semaines	3,3266	44	0,0756	0,63 NS
Erreur	23,1590	192	0,1206	//////////

Com e précedemment, les résultats nous p r-me tent de comparer les traitements à partir des moyennes générales pour l'ensemble des douze semaines.

b) Régression.

* Effets principaux

- Colchicine

Comparaison orthogonale

	C_0	C_1	C_2	
C_L	+1	0	-1	2r = 288
C_Q	+1	-2	+1	2r = 864

La régression est linéaire; la mortalité augmente avec la dose de colchicine.

* Effets d'interactions

- Colchicine protection

	C_0P_0	C_0P_1	C_1P_0	C_1P_1	C_2P_0	C_2P_1	
C_LP_L	-1	+1	0	0	+1	-1	4r=288
C_QP_L	-1	+1	+2	-2	-1	+1	12r=864

	SCE	DDL	F
C_LP_L	0,46	1	3,81 x
C_QP_L	1,56	1	12,94xxx

L'effet toxique de la colchicine augmente en présence d'une protection .

- Colchicine Eau de coco

Après l'ajustement des données par l'effet bloc il est possible de faire une comparaison orthogonale.

	C_0K_0	C_0K_1	C_0K_2	C_1K_0	C_1K_1	C_1K_2	C_2K_0	C_2K_1	C_2K_2
C_LK_L	+1	0	-1	0	0	0	-1	0	+1
C_LK_Q	+1	-2	+1	0	0	0	-1	+2	-1
C_QK_L	+1	0	-1	-2	0	+2	+1	0	-1
C_QK_Q	+1	-2	+1	-2	+4	-2	+1	-2	+1

	SCE	DDL	F
C_LK_L	0,084	1	0,7 NS
C_LK_Q	0,024	1	0,2 NS
C_QK_L	0,288	1	2,39 NS
C_QK_Q	1,528	1	18,01 xxx

L'eau de coco à la dose K_1 diminue l'effet toxique de la dose C_1 de colchicine.

B. Conclusions

Le traitement $C_1K_1P_0$ entraine le moins de mortalité.

IV. Conclusions

Le meilleur traitement envisagé à la suite de cet essai est le suivant: Une application d'une émulsion à 1% de colchicine sans protection. L'émul-

sion est obtenue par homogéneisation de 50% de lanoline et 50% d'eau de coco en présence de trois gouttes de teepol .

Annexe 2

Etude de quelques caractères morphologiques foliaires chez C.canephora diploide

Trois caractère de la feuille ont été étudiés au niveau diploide afin de mettre au point un système de sélection des autotétraploides.

A. La longueur du stomate

1° - Technique

a) Préparation de la lame avec rhodoide

Un carré de rhodoide de 2cm est maintenu sur une lame de verre par du ruban adhésif.

b) Prise d'empreinte

Je dépose sur le rhodoide une goutte d'acétone. Lorsque cette dernière devient suffisamment visqueuse, j'applique le tout sur la face inférieure préalablement essuyée de la feuille mature. J'attends alors 45 secondes en serrant fort. Mais je laisse l'empreinte encore une minute avant de l'enlever de la feuille .

c) Mensurations

Les mensurations se font avec le microscope ZEISS (grossissement 800) sur la plus grande des cellules de garde.

2° - Essais préliminaires

Pour déterminer le nombre de mesures nécessaires, j'ai effectué sur une empreinte de feuille orthotrope du clône 23.1.57 trente deux mesures. J'ai obtenu $\bar{x}$ = 1,84 divisions du micromêtre et s^2=0,017. D'après la formule $n = 4\ s^2 / d^2$, il faut 8 mesures pour avoir la moyenne de l'empreinte avec une précision de 5% pour un risque d'erreur de 5% .

3° - Résultats

a) Caractéristiques statistiques du caractère

Elles ont été déterminées sur les feuilles orthotropes de C.canephora clône 23.1.57 en parc à bois. Quatre vingt dix empreintes à raison d'une empreinte par pied ont été faites . Nous avons au total 720 mesures.

La distribution est symétrique et la variance est indépendante de la moyenne. Elle peut être apparentée à la loi normale. De plus trois empreintes sont suffisante pour estimer la moyenne du clône avec une précision de 5% et pour un risque d'erreur de 5%

b) Déterminisme phénotypique du caractère

* Sur l'existence d'une éventuelle source de variation à l'interieur du génotype

Il a été pris l'empreinte de 20 feuilles

orthotropes d'un même clône à raison d'une feuille par pied, le tout en randomisation totale.

—. Analyse de variance d'un modèle aléatoire à un critère de classification

Variation	S.C.E.	D.D.L.	C.M.	F	S
Totale	13,36	719	0,018	///////	/////////
Empreintes	3,29	89	0,037	2,30	x x x
Résiduelle	10,07	630	0,016	///////	/////////

—. Conclusions: il existe une source de variation intérieure au génotype .

x S'agit-il d'une variation à l'intérieur de la feuille ?

Il a été pris 10 empreintes à l'intérieur d'une même feuille en randomisation totale.

—. Analyse de variance d'un modèle aléatoire à un critère de classification

Variation	S.C.E.	D.D.L.	C.M.	F	S
Empreintes	0,21	9	0,0233	1,83	NS
Résiduelle	0,88	70	0,0125		F5% =2,0 F1% =1,7
Totale	1,09	79	//////////	///////	///////

—. Conclusion : le présent modèle ne permet pas de conclure sur la nature de la variation .

Dans le premier modèle ,nous avions : variation empreinte = variation intra empreinte + variation intrafeuille + variation interfeuille sens large . Dans le deuxième modèle ,nous avons :variation empreinte = variation intraempreinte + variation intrafeuille . Pour déterminer si la variation observée est d'origine intra ou interfeuille, il suffit de comparer les deux carrés moyens correspondants ; on obtient F = 1,58 ($F_{0,05}$= 2,76) . Je peux maintenant dire que la variation intragénotype est constituée par la variation intrafeuille .

* La longueur du stomates varie-t-elle suivant le génotype et le type de feuille étudiée ?

Sur chacun des 5 clônes pris au hasard en parc à bois, je fais 8 empreintes à raison de quatre empreintes sur une feuille plagiotrope et quatre sur une feuille orthotrope.

—. Analyse de variance : j'utilise un modèle partiellement hiérarchisé mixte à trois critères de classification (type de feuille:fixe ; clône:aléatoire ; empreinte : aléatoire et subordonnée).

Nature de la variation	SCE	DDL	CM	F
Totale	5,20	319	////////	/////////
Clône	0,19	4	0,0475	1,70 NS
Type de feuilles	0,06	1	0,06	3,00 NS
Clône.Type de feuilles	0,08	4	0,02	0,71 NS
Empreintes	0,83	30	0,028	2,00 xx
Résiduelle	4,04	280	0,014	/////////

—. Conclusions: Le présent modèle confirme l'hétérogéneité de la feuille . Le déterminisme génotypique du caractère est le même pour l'ensemble des clônes de C.canephora . L'information ne dépend pas de l'état de différenciation foliaire (plagi trope, orthotrope).

4° - Conclusions générales

Le caractère longueur du stomate n'est pas sujet aux conditions extérieures et ne varie ni avec le génotype, ni avec le type de feuille chez C.canephora diploide .

B . La densité stomatique

1° - Technique

Pour la prise d'empreinte, la même technique que pour la longueur du stomate est utilisée. Le comptage se fait avec le microscope Wild (grossissement 200) .

2° - Essais préliminaires

Il a été estimé à 10 le nombre de mesures suffisantes pour avoir une précision de 5% sur la moyenne d'une empreinte avec un risque de 5%.

3° - Résultats

a) Caractéristiques statistiques du caractère

Quatre vingt quatorze empreintes à raison s'une empreinte par pied ont été faites sur les feuilles orthotrope du clône 23.1.57 de C.canephora en parc à bois. Nous avons en tout 10 x 94 = 1520 dénombrements.

La distribution est dissymétrique et l'écart-type est proportionnel à la moyenne

Variation	SCE	DDL	CM	F	S
Totale	2054	93	//////	//////	/////
Régression linéaire	1914	1	1914	1259	***
Résiduelle	140	92	1,52	//////	/////

Ceci nous permet d'apparenter la distribution observée à une loi binomiale agrégative, d'où la nécessité d'opérer une transformation logarithmique des données pour l'analyse de variance.

Sur ces données transformées, il a été établi qu'il faut 57 feuilles à raison d'une feuille par pied pour avoir une précision de 5% sur la moyenne du clône au risque de 5% .

b) Déterminisme phénotypique du caractère

* Recherche d'une éventuelle variation dans l'expression génotypique du caractère .

Il a été pris 16 empreintes à raison d'une empreinte par pied sur les feuilles orthotropes du clône 23.1.57 en parc à bois.

—. Analyse de variance: mod le aléatoire à un critère declassification .

Variation	SCE	DDL	CM	F	S
Totale	1,407	255	////////	//////	/////
Empreinte	0,822	15	0,0548	20,3	***
Résiduelle	0,[illegible]645	240	0,0027	//////	/////

—. Conclusions: Il existe une variation à l'interieur d'un génotype.

* La densité stomatique est-elle homogène à l'interieur d'une feuille ?

Il a été pris 8 empreintes au hasard sur une même feuille.

—.Analyse de variance: modèle aléatoire à un critère de classification

Variation	SCE	DDL	CM	F	S
Totale	0,3390	127	////////	////////	/////
Empreinte	0,0554	7	0,0079	2,828	*
Résiduelle	0,3354	120	0,0028	////////	/////

—.Conclusions: Il existe une variation entre les territoires d'une même feuille. Il faut 4 empreintes pour estimer la moyenne d'une feuille avec une précision de 5% .

* Existe-t-il une autre source de variation ?

Je compare les deux CM obtenus lors des deux modèles précedants. J'obtiens F= 7,21 * * . J'en conclue que la variation intra-feuille ne suffit pas à expliquer la variation intra génotype.

* Recherche des autres sources de variation à l'interieur du clône .

Il a été fait 24 empreintes à raison de 2 empreintes par feuille, de deux feuilles par

noeud, de deux noeuds par pied et de trois pieds; soit au total 384 mesures.

—. Analyse de variance d'un modèle mixte partiellement hiérarchisé à 4 critères de classification (pied:aléatoire testé par rapport à feuille; noeud: fixe testé par rapport à l'interaction ;feuille:aléatoire testé par rapport à empreinte; empreinte:aléatoire testée par rapport à la résiduelle.

Variation	SCE	DDL	CM	F	S
Totale	2,0847	383	////////	///////	////
Pied	0,9319	2	0,4659	20,8	**
Noued	0,0194	1	0,0194	0,15	NS
Pied x Noeud	0,3040	2	0,1520	6,79	*
Feuille/Pied x Noeud	0,1345	6	0,0224	6,22	**
Empreinte/Feuille	0,0429	12	0,0036	2,00	*
Résiduelle	0,0520	360	0,0018	///////	////

—.Conclusions: Lors de cette analyse, je confirme la présence d'une variation intra feuille (empreinte). D'autre part, le caractère varie d'un pied à l'autre et , à l'intérieur d'un pied, d'un noeud à l'autre sans qu'on puisse établir un ordre sur l'axe orthotrope (bas - haut). On constate aussi une différence pour les feuilles situées sur le même noeud .

* Le déterminisme phénotypique du caractère dépend-il de la valeur génotypique du clône?

Il a été pris 75 empreintes réparties sur 3 clônes à raison de 25 pieds par clône .

—. Analyse de variance d'un modèle hiérarchisé à deux critères de classification aléatoires.

Variation	SCE	DDL	CM	F	S
Totale	7,978	1199	////////	//////	/////
Génotype	1,165	2	0,5825	10,1o	***
Pied	4,131	72	0,0574	23,95	***
Résiduelle	2,682	1120	0,0024	//////	/////

—.Conclusions: La densité stomatique dépend du génotype.

4°-Conclusions générales

Le caractère densité de stomates suit une loi binomiale agrégative . Il est très sujet aux conditions extérieures et dépend aussi du génotype .

C . Le coefficient d'allométrie du limbe

1° -Technique

La feuille est mesurée sur sa plus grande largueur et , pour la longueur de la base du limbe jusqu'à l'extrémité de l'acumen. Le rapport établi est le suivant :longueur/largeur .

2° - Essais préliminaires

Sur un clône,il a été fait 120 mesures Il faut 24 feuilles pour estimer la moyenne du clône avec une précision de 5% pour un riscue de 5% .

3° - Résultats

a) Caractéristiques statistiques

La distribution est symétrique et la variance indépendante de la moyenne. Il a été estimé à 6 le nombre de pieds nécessaires pour définir le clône .

b) Déterminisme phénotypique du caractère

* Existe-t-il une variation à l'intérieur d'un clône?

Il a été pris 120 feuilles sur 30 pieds du clône 25.1.57 en parc à bois .

—. Analyse de variance d'un modèle aléatoire à un critère de classification.

Variation	SCE	DDL	CM	F	S
Totale	8,48	119	////////	//////	////
Pieds	1;98	29	0,0682	0,93	NS
Résiduelle	6,50	90	0,072	//////	////

—.Conclusions: Il n'existe pas de variation entre les pieds en parc à bois .

* Recherche de la variation à l'intérieur d'un pied et entre les différents génotypes

Il a été pris 360 feuilles à raison de deux feuilles par noeud, de deux noeuds par pied,de dix pieds par clône et de neuf clônes.

—. Analyse de variance d'un modèle hiérarchisé aléatoire à trois critères de classification.

Variation	SCE	DDL	CM	F	S
Totale	33,35	359	////////	//////	/////
Clône	6,48	8	0,810	7,94	***
Pieds	8,27	81	0,102	1,14	NS
Noeuds	8,03	90	0,0892	1,52	*
Résiduelle	10,87	180	0,0587	//////	/////

—• Conclusions : L'allométrie varie d'un noeud à l'autre à l'intérieur d'un pied et entre les différents génotypes de C.canephora en parc à bois . On constate , d'autre part, toujours l'absence d'effet pieds .

* Existe-t-il une différence entre les feuilles portées par les axes plagiotropes et orthotropes et entre les pieds situés en champs ou en parc à bois?

Il a été pris 4 clônes situés en champs et en parc à bois; dans chaque, sur 10 pieds, il a été prélevé 8 feuilles réparties à raison de 2 feuilles par noeud et de deux noeuds par types d'axes; soit au total 640 feuilles.

—• Analyse de variance d'un modèle partiellement hiérarchisé à 5 critères de classification (terrain: fixe; type de feuille:fixe; clône:aléatoire; pied: aléatoire subordonné à l'interaction "terrain clône" et croisé à "type de feuille"; noeuds: aléatoire subordonné à l'interaction "pieds type de feuille".

On a $SCE_t = SCE_T + SCE_C + SCE_F + SCE_{TC} + SCE_{FC} + SCE_{TF} + SCE_{FTC} + SCE_{P/TC} + SCE_{PF/TC} + SCE_{N/PF} + SCE_{Résiduelle}$.

Le calcul de l'espérance mathématique de chacun des termes de l'équation conduit aux comparaisons suivantes :

Effet	Testé par rapport à :
Terrain	Terrain-Clône
Clône	Pieds
Type de feuille	Type de feuille-Clône
Terrain-Clône	Pieds
Type.Feuille-Clône	Pieds-Type de feuille
Terrain-Ty.feuil.	Ty.feuil.-Terrain -Clône
Ty.feuil.-Ter.-Clône	Pieds-Type de feuille
Pieds	Noeuds
Pieds-Type de feuil.	Noueds
Noeuds	Résiduelle

variation	SCE	DDL	CM	F	S
Totale	44,94	639	///////	///////	//////////
Terrains (T)	3,39	1	3,39	3,85	NS
Clônes (C)	9,94	3	3,31	30,1	* * *
Type de feuille (F)	2,30	1	2,30	8,51	S à 1%
T x C	2,65	3	0,88	8,00	* * *
F x C	0,81	3	0,27	1,86	NS
T x F	0,01	1	0,01	0,08	NS
F x T x C	0,37	3	0,12	0,82	NS
Pieds (P) /TC	7,95	72	0,11	4,07	* * *
P x F / TC	10,47	72	0,145	5,37	* * *
Noueds	4,34	160	0,027	3,37	* * *
Résiduelle	2,71	320	0,008	///////	//////////

—• Conclusions : Je confirme la présence d'une variation entre les noeuds et entre les génotypes. En outre, on s'aperçoit que la variation de la forme dûe au terrain dépend du clône, que celle dûe au type de feuille dépend du pied à l'interieur du clône. Nous observons aussi dans ce présent modèle la présence d'un effet pied, or si ici $SCE_{P/TC}$ correspond dans un modèle croisé à $SCE_{P\ s.s.}$ + SCE_{PC} + SCE_{PT} + SCE_{PTC}, dans les modèles précedents, il correspondait à $SCE_{P\ s.s.}$ + SCE_{PC} ; nous pouvons émettre que le présent effet pied est composée essentiellement par l'interaction PT.

4° - Conclusions générales

Le caractère allométrie dépend du génotype. En parc à bois, sa seule source de variation est le noeud. En champs, par contre, elle varie d'un pied à l'autre. La différence entre les champs et le parc à bois dépend du génotype et, entre les plagiotropes et orthotropes, du pied .

Annexe 3

ETUDE COMPARATIVE DES DIPLOIDES, DES CYTOCHIMERES 244 ET DES TETRAPLOIDES VRAIS 444 .

A . Sur le caractère allométrie du limbe

I_._Entre_cytochimères et_tétraploides vrais

Ils ont été comparés par l'analyse de variance d'un modèle hiérarchisé à trois critères de classifications: population (fixe), pied (aléatoire), noeud (aléatoire). La feuille plagiotrope du clône C. carephora 29.1.57 colchicinée en parc à bois constitue le matériel de travail .

Variation	SCE	DDL	CM	F	S
Population	0,0858	1	0,0858	8,58	NS
Pieds	0,0199	2	0,0100	0,47	NS
Noeuds	0,7577	36	0,0210	2,56	**
Résiduelle	0,3289	40	0,0082	//////	/////
Totale	1,1923	79	////////	//////	/////

Il n'est pas possible de différencier les deux types sexuellement tétraploides sur la forme.

II._Entre_les_tétraploides_(244_+_44+)_et_les_diploides

Le rapport des variances est très hautement significatif : $F_c = 3,97$; $F_{0,001} = 2,70$.

La comparaison des moyennes ne peut se faire par l'analyse de variance. On utilise le test des médianes .

	Tétra.	Di.	Totaux
$x \leqslant 1,76$	20	0	20
$x \geqslant 1,76$	0	20	20
Totaux	20	20	40

On a $\chi^2_c = 40$ *** ($\chi^2_{0,001} = 10,8$)

Les deux populations diffèrent de façon très hautement significative .

B . Sur le caractère longueur du stomates

I. Entre les cytochimères 244 et les diploides

Le rapport des variances des deux populations n'est pas significativement différent.($F_c = 1,22$; $F_{0,05} = 1,70$). La comparaison de leurs moyenne est effectuée par l'analyse de variance à deux critères de classification hiérarchisés : population (fixe) et empreinte (aléatoire) hiérarchisé à population.

Variation	SCE	DDL	CM	F	S
Totale	0,3999	79	////////	//////	////
Population	0,0012	1	0,0012	0,11	NS
Empreinte	0,0850	8	0,0106	2,36	*
Résiduelle	0,3137	70	0,0045	//////	////

Il n'existe ucune différence pour la longueur du stomates entre la cytochimères 244 et le diploide .

II. Entre tétraploides 444 et 244

La comparai on des variances donne F= 2,14 * ** . Malgré ce biais, il a été effectué une analyse de variance à deux critères de classification hiérarchisés: population (fixe) et empreinte (aléatoire) hiérarchisé à population .

Variation	SCE	DDL	CM	F	S
Totale	12,2240	159	/////////	/////////	///////
Population	10,8160	1	10,8160	565,52	* * *
Empreinte	0,3905	18	0,0217	2,97	* * *
Résiduelle	0,0175	140	0,0073	/////////	///////

La longueur du stomates permet bien de séparer nettement les deux types de tétraploides aussi bien sur la moyenne que sur la variance.

C . Sur le caractère Densité stomatique

1. Entre le diploide et le tétraploide 244

Les comparaisons se font par l'analyse de variance sur les données transformées logarithmiques.

Variation	SCE	DDL	CM	F	S
Totale	0,386452	54	//////////	///////	////
Population	0,000067	1	0,000067	0,006	NS
Résiduelle	0,386385	53	0,011709	//////	////

Il n'existe pas de différence entre le diploide et la cytochimère 244 pour la densité de stomates.

II. Entre les deux types sexuellement tétraploides

Comme précedemment, j'effectue une analyse de variance à un critère de classification .

Variation	SCE	DDL	CM	F	S
Totale	0,8200	19	///////	///////	///////
Population	0,4579	1	0,4579	22,76	***
Résiduelle	0,3621	18	0,0201	///////	///////

La densité stomatique permet bien de distinguer deux types de tétraploides dont les différences portent sur la nature de l'épithélium.

III. Action de la duplication chromosomique sur la densité des stomates

1° Calcul de la droite des moindres rectangles

a) Ne passant pas par l'origine

SCE_x = 436,86 ; SCE_y = 129,36 ; SPE_{xy} = 227,57

On a c= 0,544 et r= 0,9572 *** (D.D.L.= 7)

b) Passant par l'origine

On a c= 0,4951 et r= 0,9980 x x x

2°Comparaison du coefficient"c" observé avec un coefficient"c" théorique.

a) Entre c= 0,544 et c= 0,4951

On a t= 0,86 NS

b) Entre c= 0,544 et c= 0,5

On a t = 0,77 NS

3° Conclusions.

La droite passe par l'origine, elle a pour équation y= 0,5 x.

La densité stomatique est divisée par deux lorsque l'épithélium diploide devient tétraploide.