

LES HAPLOÏDES DE *THEOBROMA CACAO* L. DIPLOÏDISATION ET OBTENTION D'INDIVIDUS HOMOZYGOTES

P. DUBLIN

Directeur de recherches ORSTOM
Chef de la Division de biologie cellulaire de l'IFCC en Côte d'Ivoire

INTRODUCTION

Ce sont les travaux de Chase (1960) sur maïs, de Peloquin et Hougas (1959) sur pomme de terre, de Thévenin (1968) sur asperge et de Pochard (1971) sur *Capsicum* qui ont apporté la preuve de l'utilisation possible de l'haploïdie à des fins pratiques.

Le regain d'intérêt que connaît depuis lors l'haploïdie a été récemment accru par les progrès réalisés dans les techniques d'androgénèse *in vitro* par culture d'anthere ou de pollen.

La quasi-totalité des travaux modernes effectués sur l'haploïdie chez les Angiospermes concernent presque exclusivement les végétaux herbacés et annuels.

Ce sont pourtant les végétaux arborescents, à cycle de reproduction long, souvent entachés d'auto-incompatibilité, pour lesquels le raccourcissement du cycle de sélection qu'offre l'haploïdie serait le plus bénéfique.

A l'exception des travaux de Stettler et Livingston (1969), les recherches sur les haploïdes des végétaux arborescents sont rares et on possède à l'heure actuelle très peu de données sur les problèmes liés à l'état d'haploïdie chez ceux-ci.

L'utilisation pratique de l'haploïdie dans l'amélioration d'un végétal est soumise à un certain nombre de conditions dont la première est évidemment la présence d'haploïdes; la possibilité de diploïdisation, l'absence de défauts réducteurs constituent également autant de garanties qu'il faut acquérir pour le franchissement des étapes

obligatoires qui jalonnent tout schéma d'utilisation de l'haploïdie en amélioration des plantes.

Trois techniques ont permis d'obtenir les premiers haploïdes connus chez *Theobroma cacao*, rendant dès lors possible la description du phénotype haploïde de cette plante et l'examen des particularités biologiques liées à cet état d'haploïdie.

La conservation de l'état d'haploïdie présente un grand intérêt pour les études cytogénétiques et de mutagenèse, qui permettront de mieux connaître le végétal.

La possibilité de multiplier un génotype haploïde quelconque en prévision des différentes phases expérimentales de tout schéma d'utilisation de l'haploïdie en amélioration des plantes présente également un intérêt évident.

Ce sont tous les problèmes que posent la croissance, le développement, la multiplication, la conservation de l'état d'haploïdie qui sont exposés dans les pages qui suivent.

Par ailleurs, le doublement du stock chromosomique des haploïdes en vue de l'obtention de diploïdes homozygotes constitue une étape primordiale dans ces recherches sur la méthodologie de l'emploi d'haploïdes dans l'amélioration génétique des cacaoyers.

Les techniques utilisées, qui ont abouti à l'obtention des premiers diploïdes homozygotes complets du cacaoyer au hasard des mutations qui peuvent être liées aux procédés classiques de diploïdisation, occuperont également une place importante dans cette étude.

LES HAPLOÏDES DE *THEOBROMA CACAO* MORPHOLOGIE, CROISSANCE ET DÉVELOPPEMENT

D'une façon générale, l'haploïde d'une espèce végétale se présente comme le modèle réduit de la version diploïde correspondante.

Chez le cacaoyer, l'haploïde ($n = 10$) se caractérise au premier abord par un aspect chétif et délicat.

Pendant les trois premières semaines qui suivent le semis, la plantule haploïde qui vit encore sur des réserves cotylédonnaires a une croissance apparemment normale, qui est fonction de l'importance des réserves cotylédonnaires d'origine. La première émission de feuilles comporte, comme chez la

16 JUL 1974

O. R. S. T. O. M. EXI

Collection de Référence

n° 6954 Div. 2. Final

Fig. 1. — *T. cacao*. Plantule haploïde ($n = 10$) âgée de six mois, issue de graine polyembryonnée

plantule diploïde issue de polyembryons, deux à quatre feuilles.

Par la suite, après la chute des cotylédons, cette croissance se ralentit, les émissions foliaires réduites à une ou deux feuilles deviennent de plus en plus espacées.

La tige reste grêle avec des entre-nœuds courts, garnis quelquefois de stipules, qui semblent persister plus longtemps que chez le diploïde.

Les feuilles, petites, oblongues, mesurent en moyenne 5 cm de long sur 2 cm de large contre 20 cm de long et 5 cm de large pour les feuilles de diploïdes âgés de quatre à six semaines. Elles sont portées par un pétiole court, dressé, ne prenant jamais l'allure horizontale classique comme chez le diploïde et qui est la conséquence de la traction exercée vers le bas par le poids de la feuille. Chez l'haploïde, la feuille reste davantage dressée le long de la tige.

Les dimensions de la feuille varient très peu avec l'âge et restent régulièrement très inférieures à celles du diploïde de même âge.

Le limbe, de contour irrégulier, surtout en ce qui concerne les premières feuilles, se régularise peu à peu. La coloration vert pâle présente par endroits comme de minuscules zones plus claires.

Ce qui caractérise principalement la feuille de l'haploïde du cacaoyer, c'est l'aspect particulier du limbe, dû à un gaufrage spécifique, constitué par une série d'invaginations plus ou moins importantes et localisées le long des nervures principale et secondaires de la feuille, plus rarement le long des bords de celle-ci.

Ce gaufrage, qui confère à la feuille de l'haploïde un aspect bien particulier et qui varie en importance d'un haploïde à un autre, est toujours visible sur les premières feuilles.

Il s'estompe peu à peu par la suite ; les premières invaginations se présentent alors comme de minuscules pustules disséminées à la surface du limbe, qui donnent à celui-ci un aspect chagrin reconnaissable et qui contraste avec l'aspect lisse de la feuille du diploïde.

La coloration anthocyanique des premières feuilles, toujours moins accentuée que chez le diploïde, varie d'un haploïde à un autre en fonction de l'origine génétique de celui-ci.

La pilosité des feuilles, difficile à mesurer, semble cependant moins abondante que chez le diploïde (fig. 1, 2, 3).

Du point de vue anatomique, les cellules soma-

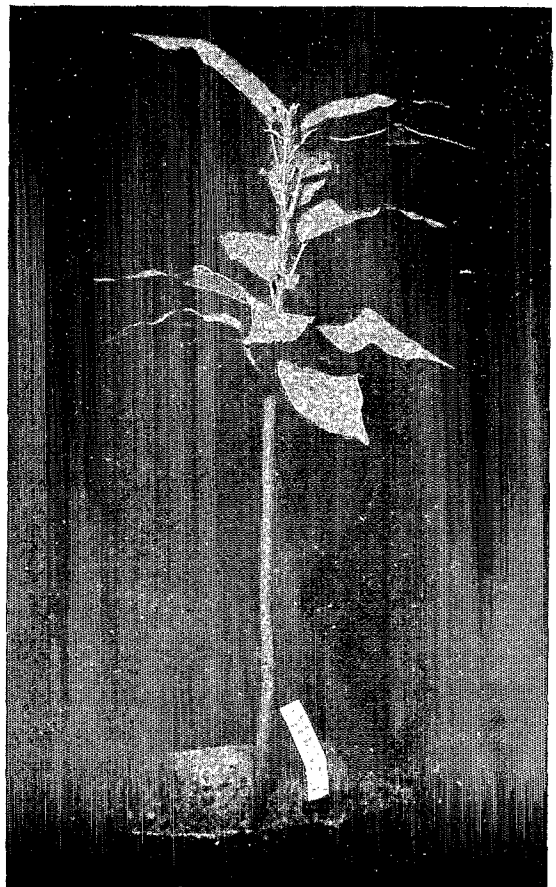
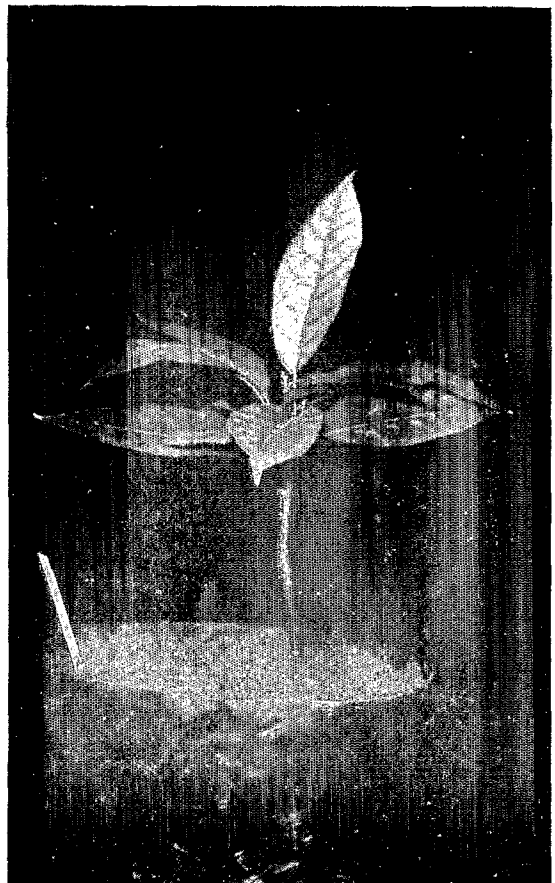


Fig. 2. — *T. cacao*. Plantule haploïde ($n = 10$) âgée de six mois, issue de graine monoembryonnée, d'une hybridation de UPA 3 par C 305 (porteur d'un marqueur génétique « axil spot »)

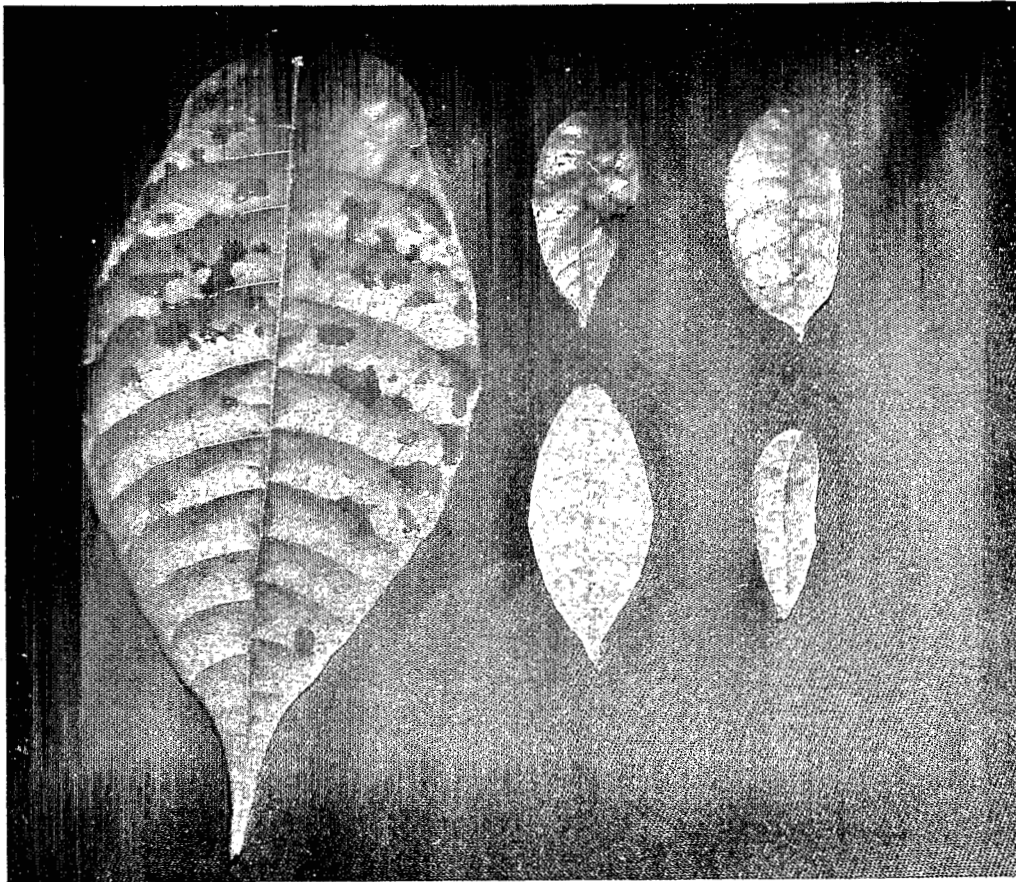


Fig. 3. — *T. cacao*. Dimensions comparées de la feuille diploïde ($2n = 20$) et des feuilles haploïdes ($n = 10$) de plantules âgées de huit semaines

tiques des haploïdes sont de dimensions nettement plus réduites que celles des diploïdes ; cet aspect particulièrement frappant est reconnaissable lors des contrôles chromosomiques effectués sur jeunes feuilles.

Chez de nombreux végétaux, on constate une relation assez étroite entre le niveau de ploïdie et les caractères stomatiques, tels le nombre de chloroplastes par cellule de garde, le diamètre des cellules de garde, ainsi que la densité stomatique.

Le comptage des chloroplastes se fait généralement par coloration, au nitrate d'argent à 2 %, de lambeaux d'épiderme de la face inférieure des feuilles.

Chez le cacaoyer, le prélèvement de ces fragments d'épiderme est une opération relativement difficile, à cause de la fragilité des feuilles dont le limbe est toujours très cassant.

Les observations n'ont pu être effectuées que sur un nombre réduit de stomates. On constate qu'il n'y a pas de différence sensible entre le nombre de chloroplastes des cellules de garde des stomates de l'haploïde et celui du diploïde ; par contre, la longueur moyenne des cellules de garde du diploïde est supérieure à celle de l'haploïde (tableau I).

TABLEAU I

Dimensions et nombre de chloroplastes des cellules de garde des stomates de *Theobroma cacao*

Origine	Longueur en μ des cellules de garde		Nombre de chloroplastes des cellules de garde	
	Nbre de stomates examinés	Longueur moyenne	Nbre de stomates examinés	Nbre moyen de chloroplastes
Diploïde $2n = 20$	55	13,26	25	3,9
Haploïde $n = 10$	30	10,4	21	3,0

Si la détermination du nombre de chloroplastes des cellules de garde se révèle difficile par suite de la fragilité de l'épiderme des feuilles de cacaoyer, les mesures des densités stomatiques sont par contre une opération facile à réaliser.

La technique utilisée pour l'étude de ce caractère est relativement simple. L'application, pendant quelques secondes, de la face inférieure d'une feuille de cacaoyer contre la surface d'une plaque

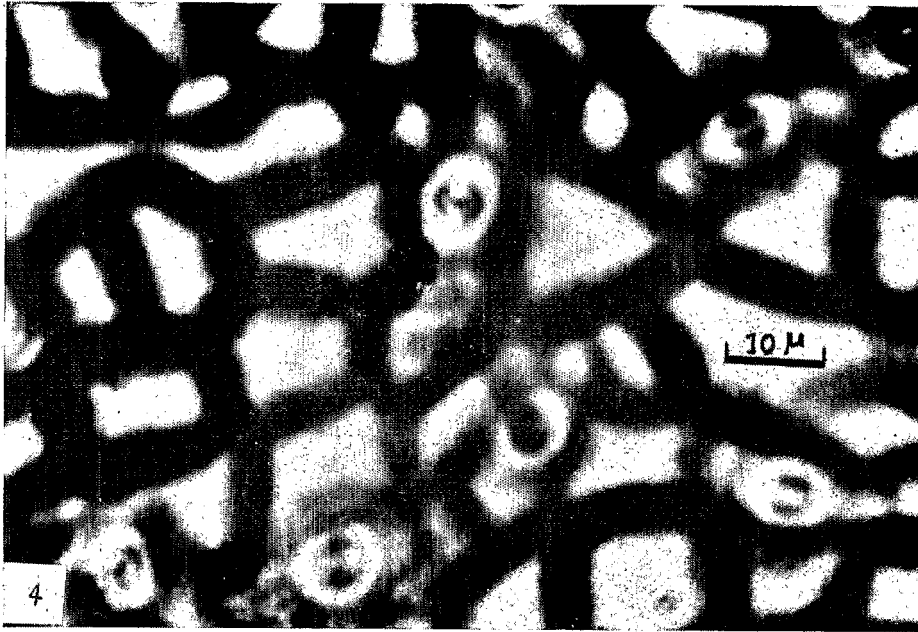


Fig. 4. — Stomates de la face inférieure d'une feuille de plantule haploïde ($n = 10$) âgée de huit semaines et cultivée sous ombrière

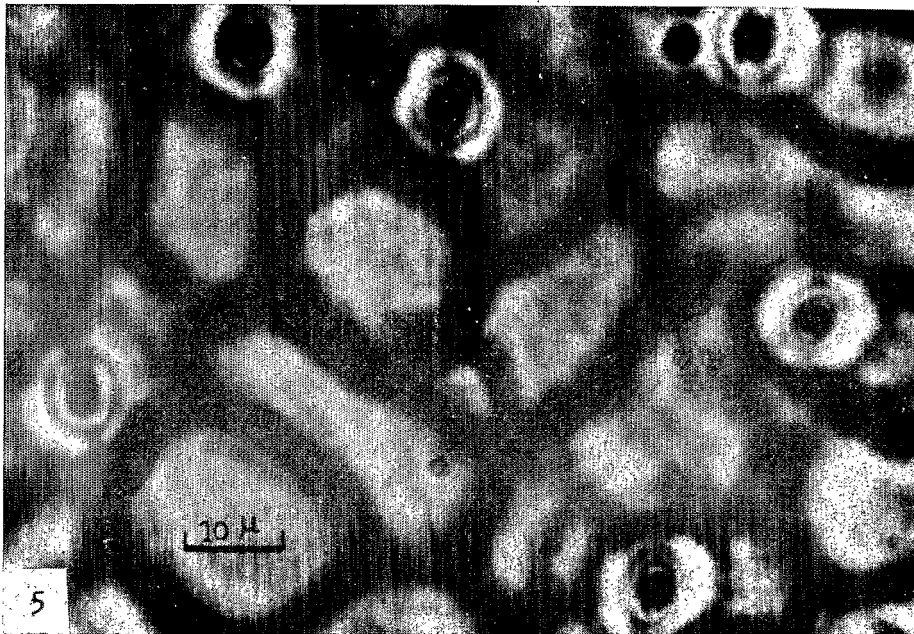


Fig. 5. — Stomates de la face inférieure d'une feuille de plantule diploïde ($2n = 20$) âgée de huit semaines et cultivée sous ombrière

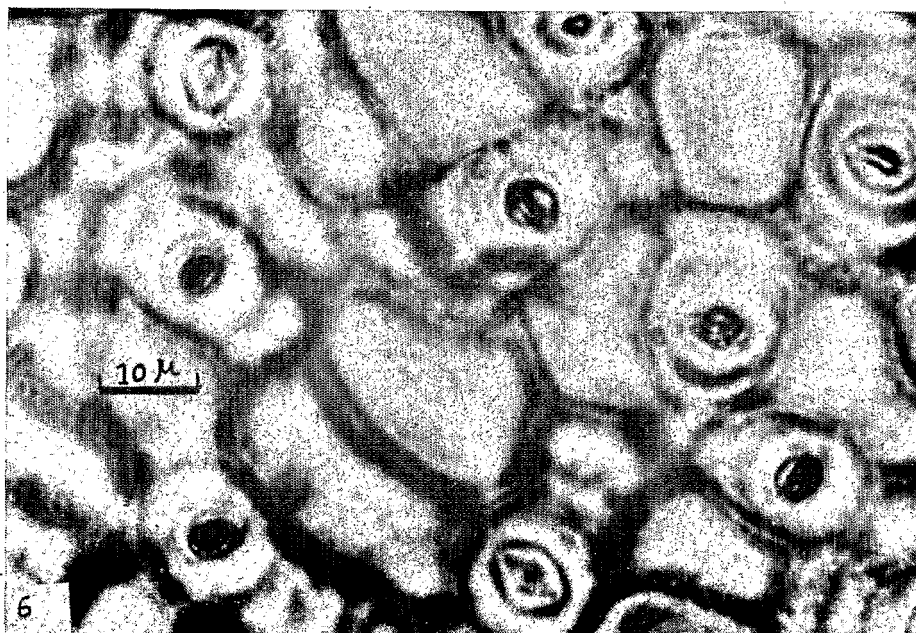


Fig. 6. — Stomates de la face inférieure d'une feuille d'un cacaoyer adulte ($2n = 20$) cultivé sans ombrage. On note un accroissement de la densité stomatique ainsi qu'une augmentation de la taille des stomates

de rhodoïd, fraîchement badigeonnée d'acétone, laisse après décollement de la feuille une empreinte sur laquelle les stomates deviennent facilement repérables au microscope.

En opérant avec un diaphragme fermé et en faisant varier la mise au point, les emplacements des stomates se détachent alors très nettement sur la trame des contours cellulaires (fig. 4, 5, 6).

Les comptages des stomates ont ainsi été effectués sur les parties médianes de la feuille, proches de la nervure principale.

Les densités stomatiques, bien que liées au génome et quelquefois corrélatives des niveaux de ploïdie, sont très fortement influencées par les conditions d'éclairément.

Schoch (1972) et d'autres auteurs ont montré que la densité stomatique chez un végétal était fonction du rayonnement global. Cette densité stomatique peut être réduite de façon considérable par un ombrage croissant et varier ainsi dans les rapports de dix à un, après l'arrêt total de la croissance de la feuille.

La densité stomatique n'est donc pas fonction uniquement du patrimoine génétique, mais dépend pour une grande part des conditions de culture et d'éclairément.

Il est par conséquent impératif, lors d'une étude comparative de ce caractère chez des individus à niveaux de ploïdie différents, que ceux-ci soient soumis aux mêmes conditions d'éclairément et soient d'âge comparable.

Les plantules haploïdes et diploïdes de *T. cacao*, dont les densités stomatiques furent mesurées, avaient été cultivées côte à côte sous ombrière.

Au moment des prélèvements des feuilles pour la prise des empreintes, les plantules étaient âgées de dix à douze semaines. Dans ces conditions, on constate que la densité stomatique des plantules haploïdes est régulièrement double de celle des plantules diploïdes (tableau II et fig. 7).

TABLEAU II

Densités stomatiques de plantules haploïdes et diploïdes cultivées sous ombrière

Plantules	Nombre de stomates par mm ²		Nombre de plages examinées
	Moyennes	Extrêmes	
Haploïde <i>n</i> = 10	881,0 ± 24,2	704—1.126	265
Diploïde <i>2n</i> = 20	496,3 ± 24,9	352— 739	302

Les densités stomatiques de plantules diploïdes, cultivées sous ombrière, sont sans rapport avec celles d'un cacaoyer adulte exposé à un éclairément plus important.

Ainsi, chez un Amelonado adulte cultivé en plein soleil, la densité stomatique, trouvée pour trente-cinq plages examinées, a été en moyenne de mille quatre vingt-deux stomates par mm², avec des extrêmes compris entre neuf cent quinze et mille trois cent deux.

En définitive, les « caractères » densité stomatique et longueur des cellules de garde peuvent être utilisés pour séparer les haploïdes des diploïdes,

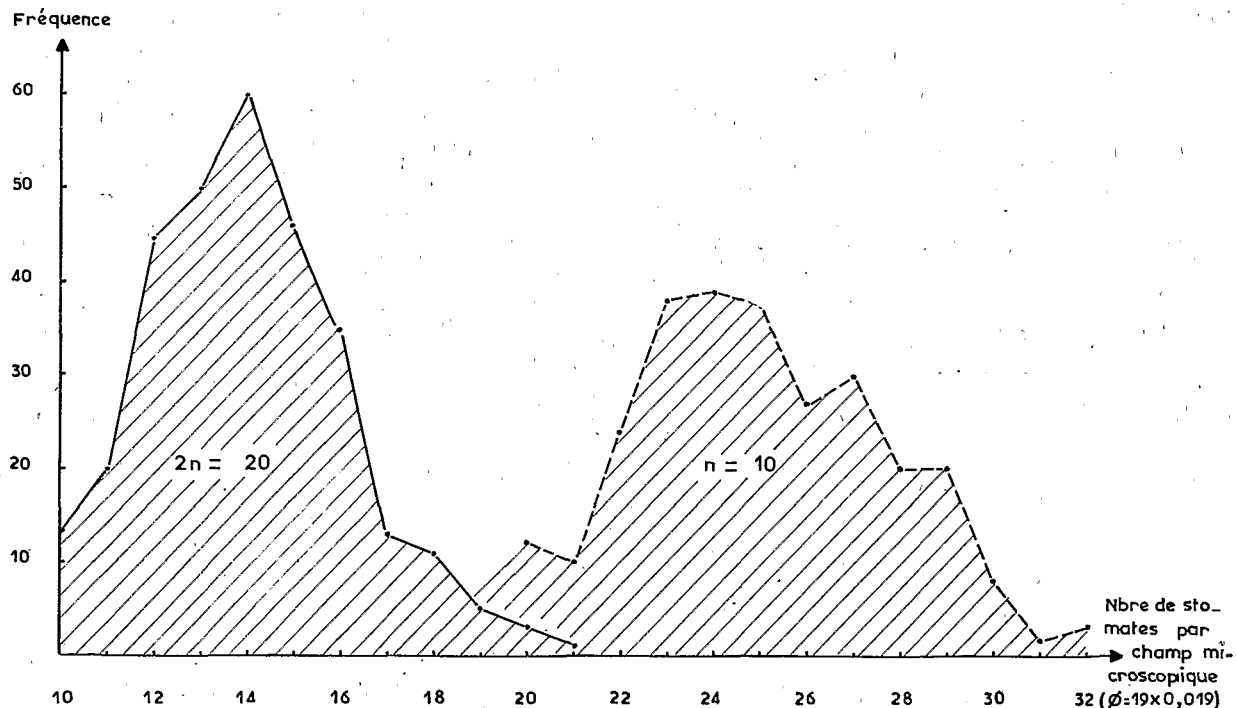


Fig. 7. — Courbe de répartition des densités stomatiques chez le diploïde ($2n = 20$) et chez l'haploïde ($n = 10$) de *T. cacao*

à condition évidemment que les plantules d'âges comparables aient été cultivées dans les mêmes conditions d'éclairage. Néanmoins, seul un comptage chromosomique permet de lever toute ambiguïté dans ce domaine.

Le système racinaire de la plantule haploïde est constitué, comme chez le diploïde, par un pivot garni de radicelles, celles-ci étant comparativement beaucoup moins nombreuses et surtout beaucoup plus courtes que chez le diploïde.

Le sentiment qui prévaut quand on examine le système racinaire de l'haploïde de cacaoyer est qu'il existe un réel déséquilibre entre les développements du pivot et des radicelles latérales plagiotropes. Il y a une tendance nette au développement prioritaire du pivot au détriment des radicelles. Ce déséquilibre racinaire apparaît de façon encore plus accentuée lors des cultures en solution nutritive, telles qu'elles ont été réalisées ici.

En culture hydroponique, sur substrat neutre constitué par des copeaux de polystyrène, le système racinaire du diploïde est constitué par un abondant enchevêtrement de racines secondaires, tandis que le pivot est fortement réduit.

Dans les mêmes conditions, le système racinaire de l'haploïde est réduit à un seul pivot qui atteint

alors plusieurs dizaines de centimètres, tandis que les racines secondaires restent peu nombreuses et pratiquement inexistantes.

Les observations sur la croissance ont été effectuées sur des jeunes plantules haploïdes transplantées dans trois conditions de culture différentes :

- culture en pot sur « mélange pépinière » sans apport de solution nutritive ;
- culture en pot sur « mélange pépinière » avec apport de solution nutritive ;
- culture en solution nutritive sur substrat neutre.

Le mélange pépinière utilisé journellement ici pour le semis de cacao est composé de terre rouge de forêt et de terre noire de la Basse Côte, plutôt sableuse, conférant à ce substrat une certaine légèreté qui garantit un meilleur drainage.

Quelles que soient les conditions de culture, on note un arrêt de la croissance après la chute des feuilles cotylédonnaires. Cet arrêt de croissance, qui correspond au rythme biologique de croissance de l'espèce, peut être plus ou moins prolongé suivant les conditions de culture offertes.

Puis vient une phase de croissance ralentie au cours de laquelle la plantule émet, à intervalles de plus en plus espacés, des poussées foliaires

Fig. 8. — *T. cacao*. Technique de culture des plantules de cacaoyer en solution nutritive sur substrat neutre (copeaux de polystyrène)



constituées par une ou deux feuilles, dont les dimensions n'augmentent pratiquement pas ; il en résulte un net raccourcissement des entre-nœuds.

Cette phase peut se prolonger pendant plusieurs mois et la plantule atteint 10 à 20 cm de hauteur au bout de six mois pour les plus vigoureuses.

Les essais de transplantation en pleine terre sous ombrage de pépinière se sont soldés par un échec malgré les arrosages périodiques avec une solution nutritive. Après transplantation, la plantule entre dans une période de léthargie qui se prolonge pendant plusieurs semaines, puis meurt.

La culture en pot sur mélange de pépinière, avec apports périodiques d'une solution nutritive, améliore le développement de la plantule pendant les six premiers mois de croissance, période après laquelle la plantule commence à périr, perd ses feuilles et meurt.

Les cultures d'haploïdes en solution hydroponique ont été réalisées suivant une technique très simple utilisée pour l'étude d'équilibres minéraux chez le cacaoyer. Le substrat de culture est constitué par des copeaux de polystyrène contenus dans un seau en matière plastique d'une capacité de 5 l, rempli de solution nutritive (J. Snoeck, 1973).

Le fond du seau est relié à un petit tuyau qui

fait office de siphon et permet de soutirer la solution nutritive qui est ensuite reversée dans le récipient. Cette opération de siphonage effectuée une à deux fois par semaine suffit pour assurer l'aération du système racinaire (fig. 8).

En culture hydroponique, la plantule haploïde a une croissance nettement meilleure que dans les deux autres conditions de culture sur sol. Les poussées végétatives se succèdent à un rythme moins lent ; par ailleurs, les feuilles, qui généralement dans les deux autres conditions tombaient au fur et à mesure que de nouvelles feuilles se formaient, persistent ici pendant beaucoup plus longtemps. Cependant, même dans ces conditions, le développement de l'haploïde de cacaoyer reste toujours chétif.

Les tentatives de levée d'inhibition par addition de gibbérelline à la solution nutritive ont eu pour conséquence de provoquer un léger allongement des entre-nœuds sans amélioration réelle.

Il semble donc que l'haploïde de *T. cacao* soit incapable de survivre sur son propre système racinaire, quelles que soient les conditions de culture qui lui sont offertes.

Cette impossibilité de vivre au-delà d'un certain stade semble liée à un réel déséquilibre racinaire.

MULTIPLICATION ET CONSERVATION DE L'ÉTAT D'HAPLOÏDIE CHEZ *THEOBROMA CACAO*

Il est indéniable que, pour un végétal arborescent en particulier, la possibilité de multiplier végétativement chaque exemplaire d'haploïde obtenu présente un intérêt pour les recherches méthodologiques ainsi que pour toutes les études ultérieures de cytogénétique, de mutagenèse, etc...

La régénération en culture *in vitro* de cal d'haploïde représente très certainement la technique qui offrirait le meilleur coefficient de multiplication de ces haploïdes.

Les données qui précèdent ont montré que l'haploïde de *T. cacao* est incapable de se développer sur son propre système racinaire au-delà d'un certain stade, quelles que soient les conditions de culture qui lui sont offertes. Cette difficulté de croissance semble liée à un réel déséquilibre racinaire.

On a alors pensé que, par greffage sur un porte-greffe diploïde de *T. cacao*, il serait peut-être possible d'obtenir une amélioration sensible dans le développement végétatif de l'haploïde de ce végétal. Le recours au greffage pour pallier certaines déficiences physiologiques consécutives à un déséquilibre génétique ou à la présence de facteurs défavorables est fréquent dans le monde végétal.

C'est par greffage sur des porte-greffes normaux que l'on obtient le développement et la fructification des mutants chlorophylliens chez le tabac. Dans ce cas particulier, on conserve une ramification chez le porte-greffe qui supplée ainsi aux difficultés de photosynthèse du greffon.

Martinson (1966) a eu également recours au greffage pour aider le développement des hybrides interspécifiques de *Theobroma*, incapables d'une croissance normale sur leur propre système racinaire.

C'est également par greffage que l'on parvient à accélérer la croissance et le développement des hybrides interspécifiques de *Coffea* à Madagascar.

Dans le domaine de l'haploïdie, Pochard a dû faire appel au greffage sur diploïde pour conserver un haploïde de *Capsicum* porteur d'un marqueur génétique et qui, dans toutes les autres conditions, périssait rapidement.

Chez le cacaoyer, le greffage est une opération que l'on peut réussir très facilement, quelles que soient les variantes utilisées. Il a été, par ailleurs, prouvé que les chances de succès de ce procédé sont d'autant plus grandes que l'on s'adresse à des individus plus jeunes, encore éloignés de leur phase adulte.

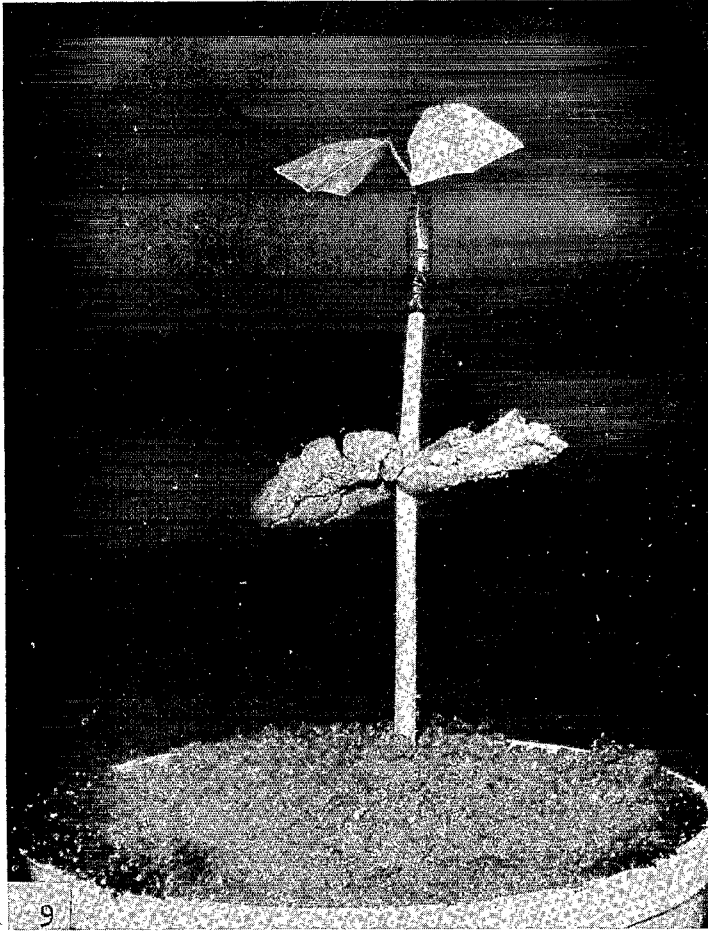


Fig. 9. — Greffage précoce d'un haploïde de *T. cacao* sur un porte-greffe de la même espèce, âgé de quatre semaines

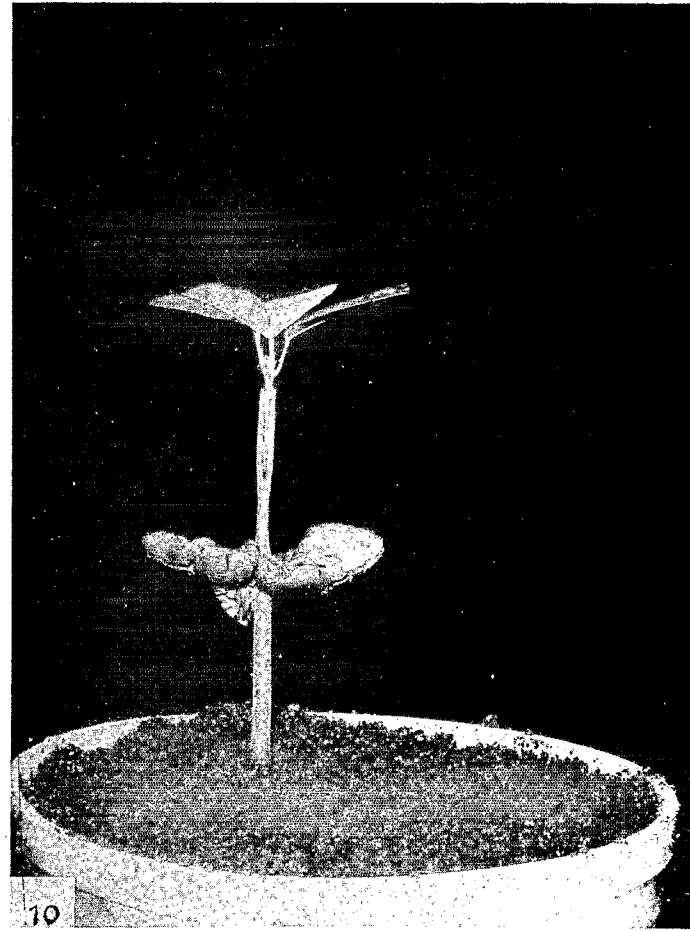


Fig. 10. — Reprise de la greffe précoce, quinze jours après greffage

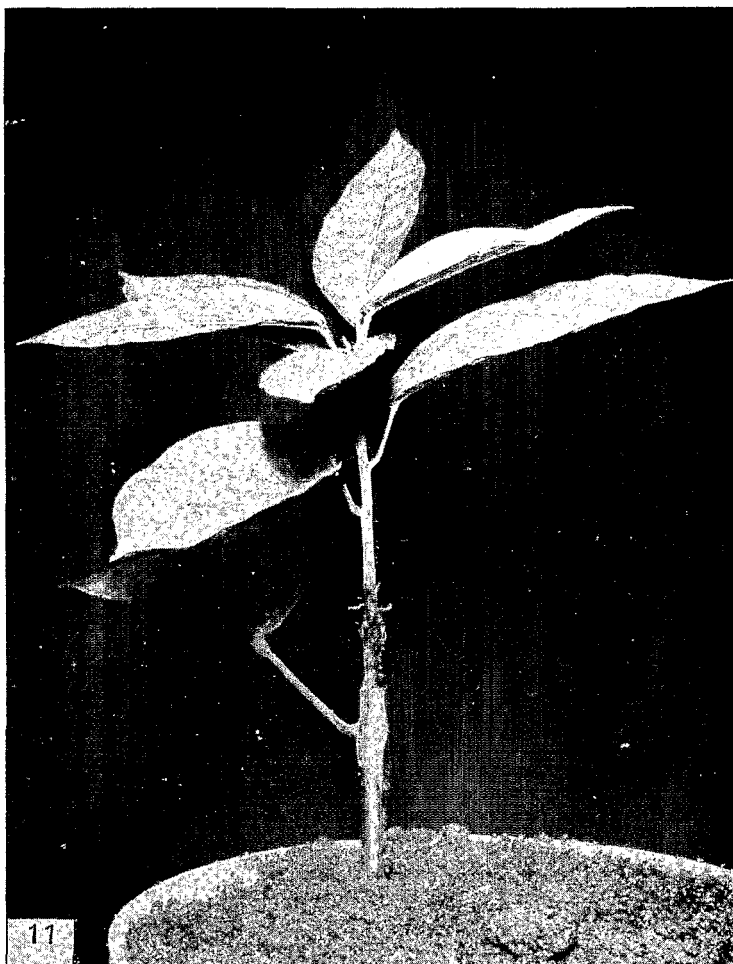


Fig. 11. — Greffe-bouture d'un greffon haploïde sur un fragment orthotrope diploïde. Deux mois après greffage, la demi-feuille d'origine adhère encore au porte-greffe

Plusieurs travaux ont en effet montré que la plante en phase juvénile présente une vigueur plus grande, une meilleure aptitude à l'enracinement des boutures et au greffage que la plante adulte.

La plus grande aptitude à la régénération des tissus jeunes est d'ailleurs souvent mise à profit en culture de tissus pour obtenir des cals dans les cas où on échoue régulièrement avec un tissu plus âgé.

Pour pallier les difficultés de développement que présente l'haploïde de *Theobroma cacao* poussant sur son propre système racinaire, nous avons eu recours au greffage sur porte-greffe *T. cacao* diploïde.

Le porte-greffe était constitué par un seedling de quatre semaines dont les cotylédons, encore en bon état, adhéraient parfaitement à la tige. La greffe est effectuée sur l'épicotyle recépé à quelque 3-4 cm des cotylédons qui sont conservés.

La fente est faite perpendiculairement à l'axe des cotylédons. Le greffon encore chlorophyllien, constitué par la partie épicotylaire d'une plantule haploïde à peine plus âgée que le greffon, est ligaturé à l'aide d'une fine bandelette en polyéthylène noir.

Les plantules greffées sont ensuite mises sous

châssis, dans l'ambiance humide et fraîche des bacs de bouturage. La reprise des greffes est effective au bout de huit à dix jours et le pourcentage de réussite est régulièrement de 100 %.

Dans le cas de greffage d'haploïdes âgés de plusieurs mois, on fit appel à la technique de greffe-bouture, utilisée avec succès sur un autre genre de la famille des Sterculiacées (Dublin, 1970). Le porte-greffe est alors constitué par un fragment de 15 cm de long d'une tige orthotrope d'un seedling diploïde de trois à quatre mois, munie d'une feuille réduite de moitié.

Après greffage, la bouture greffée est mise dans un bac de bouturage, dans les mêmes conditions qu'une bouture classique de cacaoyer.

Un trempage prolongé de la base de la bouture porte-greffe dans une solution de Murashige et Skoog additionnée d'acide indole-acétique, à la concentration $2,50 \cdot 10^{-4}$, influe favorablement sur la vitesse et le développement des racines du porte-greffe. Le taux de réussite (reprise des greffes et enracinement) a été, dans ces conditions, identique à celui obtenu lors des greffages précoces au stade cotylédonnaire.

Chez les haploïdes greffés, la vitesse de débournement des bourgeons est variable. Dans certains

cas de greffes précoces, au stade cotylédonnaire, la reprise de l'activité méristématique de l'apex haploïde est immédiate ; dans le cas de greffe sur un bois plus âgé, les débourrements se produisent au bout de quelques semaines.

Après débourrement et formation des premières feuilles de l'haploïde greffé intervient une phase de repos, qui est toujours très courte. Les poussées végétatives deviennent régulières et se succèdent à un rythme accéléré.

La croissance et le développement de l'haploïde greffé sur diploïde sont donc nettement supérieurs à ceux de l'haploïde poussant sur son propre système racinaire. Cette croissance accélérée de l'haploïde greffé s'accompagne d'un allongement des entre-nœuds, d'une augmentation des émissions de feuilles, dont les dimensions augmentent très progressivement pour atteindre rapidement une

taille limite. On note également un léger renforcement de la pigmentation anthocyanique chez les jeunes feuilles de nouvelles pousses foliaires.

Comparativement à l'haploïde non greffé, les feuilles ne varient pas de façon spectaculaire ni dans leurs dimensions, ni dans leur texture. Elles restent petites et dressées le long de la tige comme chez l'haploïde non greffé.

La vitesse de croissance mesurée par l'allongement de la tige et la fréquence d'apparition des nouvelles feuilles est quatre à cinq fois plus importante que chez l'haploïde non greffé.

Deux à trois mois après greffage, la tige formée est suffisamment développée pour fournir de nouveaux greffons. Le greffage précoce sur diploïde est donc, dans les conditions actuelles, la meilleure méthode de conservation et de multiplication de l'haploïde de *T. cacao* (fig. 9, 10 et 11).

DOUBLEMENT DU STOCK CHROMOSOMIQUE ET CRÉATION DE GÉNITEURS DIPLOÏDES HOMOZYGOTES CHEZ *THEOBROMA CACAO*

L'obtention d'haploïdes diploïdisés constitue l'objectif essentiel de ce programme d'utilisation pratique de l'haploïdie chez le cacaoyer.

Cette transformation d'haploïdes en diploïdes constitue également une étape délicate étant donné que ces premiers haploïdes représentent un matériel particulièrement précieux dont il faut éviter toute perte. Il est donc indispensable d'entreprendre cette étape uniquement pour les individus déjà représentés par au moins deux exemplaires. La diploïdisation des haploïdes pose quelquefois de réelles difficultés, certains supportant plus facilement que d'autres d'être doublés.

À côté d'haploïdes qui subissent spontanément des doublements chromosomiques, en totalité ou par secteur, il en existe qui résistent à toute tentative de diploïdisation, que ce soit par colchicine ou par d'autres agents mitoclasiques tels que le protoxyde d'azote (Thévenin, 1972).

Des tétraploïdes de *T. cacao* ont été obtenus par divers auteurs par traitement de diploïdes avec une solution de colchicine. Ces essais de traitement sur diploïdes ne peuvent pas fournir d'indications précises sur la technique la mieux adaptée aux traitements des haploïdes. Ils permettent cependant d'établir les limites supérieures des concentrations en produits actifs ainsi que celles des durées de ces applications.

À la suite d'une expérimentation préliminaire faite sur diploïde, il est apparu que le cacaoyer réagissait favorablement à toute une gamme de concentrations de colchicine (Dublin, 1972).

On peut admettre que les haploïdes, dont la

fragilité est plus grande, présentent une sensibilité plus grande aux traitements colchiciniques et qu'il est nécessaire d'expérimenter des concentrations plus faibles que celles utilisées sur plantules diploïdes.

Les essais de doublement du stock chromosomique ont été effectués uniquement sur haploïdes greffés qui, grâce à un système racinaire diploïde, avaient une vigueur et une activité méristématique nettement accrues par rapport aux haploïdes poussant sur leur propre système racinaire. La technique utilisée est la même que celle employée lors des doublements des stocks chromosomiques de diploïdes chez *T. cacao*.

Après un recépage du méristème terminal destiné à provoquer un débourrement des bourgeons axillaires situés en dessous, la solution de colchicine est appliquée à l'aisselle de la feuille porteuse d'un bourgeon réactivé.

Deux applications, à vingt-quatre heures d'intervalle, d'une solution de colchicine à 0,25 % en suspension dans de l'agar-agar à 1,5 ‰ et additionnée de 10 ppm de gibbérelline sont faites sur chaque bourgeon.

Après traitement, les plantules sont mises en chambre humide, constituée tout simplement par les bacs de bouturage classiques, dont les châssis sont maintenus fermés pendant toute la durée du traitement.

70 % des haploïdes traités ont produit un gourmand diploïde dès les premières applications de colchicine. Les contrôles cytologiques ont été effectués par comptages des chromosomes sur



Fig. 12. — *T. cacao*. Haploïde diploïdisé. Développement d'un rameau orthotrope diploïde ($2n = 20$) à la suite d'un traitement à la colchicine de bourgeons d'un haploïde greffé, cinq semaines après le traitement

jeunes feuilles, suivant la technique plusieurs fois exposée lors des publications antérieures (Dublin, 1972).

Les rameaux diploïdes qui apparaissent à la suite de ces traitements sont d'ailleurs facilement reconnaissables à leurs feuilles beaucoup plus

grandes, plus riches en anthocyane et dont le limbe lisse et luisant contraste avec l'aspect terne et chagrin de la feuille haploïde (fig. 12).

Ces feuilles diploïdes ont également un port décombant, qui les différencie nettement des feuilles haploïdes érigées, au pétiole dressé le long des tiges.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'haploïdie ($n = 10$) de *Theobroma cacao*, quels que soient l'origine génétique et le mode d'obtention utilisé, se caractérise par un aspect chétif, une croissance limitée, des feuilles petites à contour irrégulier et dont le gaufrage particulier confère au phénotype haploïde un aspect spécifique facilement identifiable.

Les caractères stomatiques, tels que la densité, la longueur des cellules de garde, sont réellement différents de ceux du diploïde ; néanmoins, le comptage chromosomique constitue le seul critère valable pour une discrimination sûre des haploïdes ; ce contrôle doit être de préférence effectué sur les bourgeons aériens.

Quelles que soient les conditions de culture sur

sol, avec ou sans apport de solution nutritive, ou en culture hydroponique, l'haploïde de *Theobroma cacao* est incapable de poursuivre son développement au-delà d'un certain stade. Cette incapacité de croître semble liée au développement insuffisant et déséquilibré du système racinaire haploïde.

L'haploïdie spontanée existe sous différentes formes chez le *T. cacao* ; il en résulte que les haploïdes de cacaoyer ont obligatoirement apparu au hasard des semis de millions de graines faits en pépinière ; incapables de survie, ces haploïdes ont donc disparu au bout de quelques semaines. Dans les conditions naturelles, l'haploïde de cacaoyer n'est pas viable et est incapable de dépasser le stade juvénile.

Le greffage sur diploïdes apparaît alors comme indispensable au développement et à la conservation de l'état d'haploïdie chez le cacaoyer. Il est évident que le développement complet de l'haploïdie permettrait des investigations de grand intérêt sur la morphogénèse et sur l'origine génétique du cacaoyer.

Le maintien de l'état d'haploïdie chez le cacaoyer est également indispensable pour les recherches de mutagenèse en vue d'un accroissement de la variabilité génétique ou de la recherche de mutant d'intérêt pratique.

Les techniques de culture de tissu et de régénération *in vitro* constituent très certainement la méthode la plus efficace pour la multiplication d'un génotype haploïde de *T. cacao*.

Les opérations de doublement du stock chromosomique des haploïdes sont également facilitées chez les haploïdes greffés sur diploïdes ; en effet, chez ceux-ci, grâce à une activité mitotique plus

grande, les néoformations de bourgeons sont beaucoup plus rapides. Par ailleurs, les risques de mortalité consécutive aux traitements de colchicine sont moins élevés que dans le cas de l'haploïde intégral.

A la suite des travaux qui précèdent, il apparaît que l'obtention de cacaoyers diploïdes parfaitement homozygotes est une opération désormais possible.

Ainsi, deux des étapes les plus importantes qui jalonnent la voie de l'utilisation pratique de l'haploïdie chez le cacaoyer ont été franchies.

Il importe maintenant de pouvoir accélérer le développement complet de ces homozygotes pour contrôler leur degré de fertilité et vérifier qu'ils ne comportent aucun vice rédhibitoire interdisant leur utilisation dans l'amélioration génétique des cacaoyers.

Si ces obstacles sont levés, la voie de l'utilisation pratique de l'haploïdie chez le cacaoyer sera ainsi ouverte.

BIBLIOGRAPHIE

- AALDERS (L. E.), 1958. — Monoploidy in cucumbers. *J. Hered.*, 49, p. 41-44.
- ANUBHAVANARAIN, SINGH (P.), 1968. — Haploid meiosis and its bearing on the constitution of the castor oil plant. *J. Hered.*, 59, p. 287-288.
- ASCENSO (J. C.), 1968. — Cacao budding in São Tomé. *Trop. Agriculture*, vol. 45, n° 4, p. 323-329.
- BINGHAM (E. T.), 1971. — Isolation of haploids of tetraploid alfalfa. *Crop Sci.*, vol. II, p. 133-135.
- BRAUDEAU (J.), 1969. — Le cacaoyer. Maisonneuve & Larose (Paris), 304 p.
- CHARRIER (A.), 1969. — Contribution à l'étude de la morphogénèse et de la multiplication végétative du cacaoyer. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. 13, n° 2, p. 98-115.
- CHASE (S. S.), 1969. — Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.). *The Botanical Review*, 35, p. 117-167.
- CHEESMAN (E. E.), 1927. — Fertilization and embryogeny in *Theobroma cacao* L. *Annals of Botany*, vol. XLI, n° 161, p. 107-125.
- COE (E. H.), SARKAR (K. R.), 1964. — The detection of haploids in maize. *J. Hered.*, 55, p. 231-233.
- DUBLIN (P.), 1970. — La multiplication végétative et l'amélioration du *Cola nitida*. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. 14, n° 4, p. 275-294.
- DUBLIN (P.), 1972. — Technique de polypléidisation chez *T. cacao*. Rap. Ann. IFCC Côte d'Ivoire, p. 20.
- DUBLIN (P.), 1972. — Sur la recherche et l'utilisation des haploïdes dans l'amélioration et l'étude génétique des plantes stimulant en Côte d'Ivoire. Comité Technique de l'IFCC en Côte d'Ivoire, annexe, 8 p. mult.
- DUBLIN (P.), 1972. — Polyembryonie et haploïdie chez *Theobroma cacao* L. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. 16, n° 4, p. 295-311.
- DUBLIN (P.), 1973. — Haploïdie chez *Theobroma cacao*. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, série D, 276, 29, p. 757-759.
- DUBLIN (P.), 1973. — Les « fèves plates » : une nouvelle source d'haploïdie chez le cacaoyer (*Theobroma cacao*). *Café Cacao Thé* (Paris), vol. 17, n° 1, p. 25-36.
- DUBLIN (P.), 1973. — Note sur l'utilisation d'un marqueur génétique dans les recherches d'haploïdes chez le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). *Café Cacao Thé* (Paris), vol. 17, n° 3, p. 205-209.
- DYANAT-NEJAD (H.), 1971. — Corrélations intervenant dans la morphogénèse de l'appareil souterrain du cacaoyer (*Theobroma cacao*). *Café Cacao Thé* (Paris), vol. 15, n° 2, p. 105-114.
- HARLAND (S. C.), FRECHVILLE (G. E.), 1927. — Natural crossing and genetics of axil spot in cacao. *Genetica*, p. 278-288.
- HESSE (D. C.), 1971. — Monoploid peaches, *Prunus persica* B., description and meiotic analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 96 (3), p. 326-330.
- JACOB (V. J.), OPEKE (L. K.), 1969. — Interspecific hybridizations in *Theobroma*. 3rd International Cocoa Research Conference, Accra, Ghana, p. 552-555.
- KATAYAMA (Y.), 1969. — Studies on the haploidy in relation to plant breeding. IV. Parthenogenetic development induced by alien pollen. *Seiken Zihô*, 21, p. 31-35.
- KIHARA (H.), 1940. — Delayed pollinisation in *T. monococcum*. *Bot. Mag.*, Tokyo, 54, n° 611, 20 mai, p. 123 et 185.
- KIMBER (G.), RILEY (R.), 1963. — Haploid angiosperms. *Bot. Review*, oct.-déc., p. 480-531.
- KIRILLOVA (G.), 1966. — The phenomenon of haploidy in angiosperms. *Genetika*, vol. 2, p. 137-147.
- KNIGHT (R.), 1957. — Induced polyploidy in *Theobroma cacao* L. and related species. *J. Hort. Sci.*, vol. 32, n° 1, p. 1-8.
- LIVINGSTON (G. K.), 1972. — Experimental studies on the induction of haploid parthenogenesis in Douglas-fir and the effects of radiation on the germination and growth of Douglas-fir pollen. *Diss. Abstr. Intern.*, sér. B, t. 32, 8, p. 4.331-B.
- MAGOON (M. L.), KHANNA (K. R.), 1963. — Haploids. *Caryologia*, vol. 16, n° 1, p. 191-235.
- MAIZONNIER (D.), 1971. — Utilisation de plantes haploïdes pour l'analyse du caryogramme de *Petunia hybrida*. *Hort. Ann. Amélior. Plantes*, 21, 3, p. 257-264.
- MARTINSON (V. A.), 1966. — Hybridization of cacao and *Theobroma grandiflora*. *J. Hered.*, 57, p. 134-136.
- MELCHERS (G.), 1972. — Haploid higher plants for plant breeding. *Eucarpia*, CNRA, Versailles.
- OPEKE (L. K.), JACOB (V. J.), 1967. — Cytological irregularities in *Theobroma cacao* L. 2^e Conférence Internationale sur les Recherches Cacaoyères, Bahia, Brésil, vol. 1, p. 9-11.
- POCHARD (E.), DUMAS DE VAULX (R.), 1971. — La monoploïdie chez le piment (*Capsicum annum* L.). — Réalisation pratique d'un cycle de sélection accéléré par passage à l'état monoploïde en troisième génération. *Pflanzenzüchtg.*, 65, p. 23-96.
- SCHOCH (P. G.), 1972. — Variation de la densité stomatique de *Capsicum annum* L. en fonction du rayonnement global. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, t. 274, série D, p. 2496-2498.
- SNOECK (J.), 1973. — Etude de la nutrition minérale du cacaoyer suivant la méthode des variantes systématiques. Rap. Ann. IFCC Côte d'Ivoire.
- STETTLER (R. F.), BAWA (K. S.), LIVINGSTON (G. K.), 1969. — Haploidy, an approach to the development of high yield varieties. Second Consultation on forest tree breeding. Août.
- THEVENIN (L.), 1968. — Les problèmes d'amélioration chez *Asparagus officinalis* L. (1) Haploïdie et amélioration. *Ann. Amélior. Plantes*, 18 (4), p. 327-365.
- TURCOTTE (E. L.), FEASTER (C.), 1973. The origin of 2n and n sectors of chimerical Pima cotton plants. *Crop Science*, 13, n° 1, p. 111-112.

DUBLIN (P.). — Les haploïdes de *Theobroma cacao* L. Diploïdisation et obtention d'individus homozygotes. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XVIII, n° 2, avril-juin 1974, p. 83-96, fig., tabl., 37 réf.

L'obtention et la conservation d'haploïdes présentent un grand intérêt pour l'étude cytogénétique et l'amélioration des plantes.

L'auteur expose dans cet article d'une part l'étude de la morphologie, de la croissance et du développement des haploïdes de *Theobroma cacao* et d'autre part le doublement du stock chromosomique de ces haploïdes en vue de l'obtention de diploïdes homozygotes.

Les « caractères » densité stomatique et longueur des cellules de garde peuvent être utilisés pour séparer les haploïdes des diploïdes, à condition que les plantules soient d'âge comparable et aient été cultivées dans les mêmes conditions d'éclairage. Chez l'haploïde, le pivot se développe au détriment des racelles qui sont peu nombreuses et pratiquement inexistantes.

Les observations sur la croissance des haploïdes ont été effectuées sur de jeunes plantules transplantées dans trois conditions de culture différentes : 1) culture en pot sur mélange pépinière sans apport de solution nutritive ; 2) culture en pot sur mélange pépinière avec apport de solution nutritive ; 3) culture en solution nutritive sur substrat neutre ; quelles que soient les conditions de culture, les haploïdes de *T. cacao* sont incapables de survivre sur leur propre système racinaire ; pour pallier cette difficulté, l'auteur a eu recours au greffage sur *T. c.* diploïde.

Que le greffage soit effectué au stade cotylédonnaire ou avec des plantes âgées de plusieurs mois, la croissance et le développement de l'haploïde greffé sur diploïde sont nettement supérieurs à ceux de l'haploïde se développant sur son propre système racinaire. Deux à trois mois après greffage, la tige formée peut fournir de nouveaux greffons.

Les essais de doublement du stock chromosomique ont été effectués uniquement sur haploïdes greffés. Après un recépage du méristème terminal, on effectue deux applications, à vingt-quatre heures d'intervalle et sur chaque bourgeon, d'une solution de colchicine à 0,25 % en suspension dans de l'agar-agar à 1,5 ‰ et additionnée de 10 ppm de gibbérelline ; puis les plantes sont mises en chambre humide. 70 % des haploïdes traités ont produit un gourmand diploïde dès les premières applications de colchicine.

DUBLIN (P.). — Die Haploiden von *Theobroma cacao* L. Diploidierung und Erzielung von homozygoten Individuen. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XVIII, n° 2, avril-juin 1974, p. 83-96, fig., tabl., 37 réf.

Die Erzielung und die Erhaltung von Haploiden stellen ein grosses Interesse für das zytogenetische Studium und die Verbesserung der Pflanzen dar.

Der Autor legt in vorliegendem Artikel einerseits das Studium der Morphologie, des Wachstums und der Entwicklung der Haploiden von *Theobroma cacao* und andererseits die Verdopplung des Chromosomvorrats dieser Haploide zwecks Erzielung von homozygoten Diploiden dar.

Die Merkmale Dichte der Stomata und Länge der Schutzzellen können dazu dienen, die Haploiden von den Diploiden zu trennen unter der Bedingung dass die Keimlinge ein vergleichbares Alter besitzen und unter den selben Belichtungsbedingungen angebaut wurden. Bei dem Haploid entwickelt sich die Pfahlwurzel zum Nachteil der Nebenwurzeln die wenig zahlreich und praktisch unbedeutend sind.

DUBLIN (P.). — Haploids of *Theobroma cacao* L. Diploidization and production of homozygote individuals. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XVIII, n° 2, avril-juin 1974, p. 83-96, fig., tabl., 37 réf.

The production and conservation of haploids is of great interest in the cytogenetic study and improvement of plants.

In this article, the author exposes, on the one hand, the study of the morphology, growth and development of haploids of *Theobroma cacao* and, on the other hand, the doubling of the chromosome stock of these haploids for the purpose of producing homozygote diploids.

The stomatic density and guard cell length characteristics can be used to separate haploids from diploids provided the plantlets have comparable ages and have been cultivated under the same conditions of illumination. In haploids, the tap-root develops to the detriment of the radicles which are very few in number and practically non-existent.

The observations on the growth of haploids were made on young seedlings transplanted under three different culture conditions : 1) culture in the pot on a seed-bed mixture without any supply of nutrient solution ; 2) culture in the pot on a seed-bed mixture with a supply of nutrient solution ; 3) culture in a nutrient solution on a neutral substrate ; whatever the culture conditions may be, haploids of *T. cacao* are unable of surviving on their own root system ; to palliate this difficulty, the author resorted to grafting on *T. c.* diploid.

Whether the grafting was effected at the cotyledon stage or with plants several months of age, the growth and development of the haploid grafted onto the diploid were definitely superior to those of the haploid developing on its own root system. Two to three months after grafting, the stem which forms can provide new grafts.

Tests designed to double the chromosome stock were carried out only on grafted haploids. After cutting down of the apical meristem, two applications were effected at a twenty-four hour interval and on each bud, with a 0.25 % colchicine solution in suspension in 1.5 ‰ agar-agar to which had been added 10 ppm of gibberellin ; the plants were then placed in a wet chamber. 70 % of the haploids treated gave rise to a diploid sucker upon the very first applications of colchicine.

DUBLIN (P.). — Los haploides de *Theobroma cacao* L. Diploidización y obtención de individuos homocigotos. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XVIII, n° 2, avril-juin 1974, p. 83-96, fig., tabl., 37 réf.

La obtención y la conservación de los haploides es de gran interés para el estudio citogenético y la mejora de las plantas.

En este artículo el autor presenta de una parte el estudio de la morfología, del crecimiento y del desarrollo de los haploides de *Theobroma cacao* y de la otra la duplicación de la cantidad de cromosomas al objeto de obtener diploides homocigotos.

Los caracteres densidad estomática y longitud de las células de custodia pueden usarse para separar los haploides de los diploides con tal que las plantitas sean de edad similar y hayan sido cultivadas en las mismas condiciones de iluminación. En los haploides el nabo se desarrolla causando perjuicio a las raicillas que se hallan poco numerosas y apenas existen.

Die Beobachtungen über die Entwicklung der Haploiden wurden an jungen Keimlingen vorgenommen, die unter drei verschiedenen Anbaubedingungen umgepflanzt worden waren: 1) Anbau im Topf auf einer baumschulmässigen Mischung ohne Zufuhr einer Nährlösung; 2) Anbau im Topf auf einer baumschulmässigen Mischung mit Zufuhr einer Nährlösung; 3) Anbau in Nährlösung auf neutralem Substrat; welches die Kulturbedingungen sein mögen, sind die Haploiden von *T. cacao* unfähig, mit ihrem eigenen Wurzelsystem zu überleben; um dieser Schwierigkeit abzuweichen nahm der Autor ein Pfropfen auf diploidem *T. c.* vor.

Das Wachstum und die Entwicklung des auf Diploid gepropften Haploids sind den des sich auf seinem eigenen Wurzelsystem entwickelnden Haploids klar überlegen, ob das Pfropfen im Stadium des Keimblatts oder mit mehrere Monate alten Pflanzen ausgeführt wurde. Zwei bis drei Monate nach dem Pfropfen kann der gebildete Stengel neues Pfropfreis liefern.

Die Versuche für die Verdopplung des chromosomischen Vorrats wurden ausschliesslich auf gepropften Haploiden ausgeführt. Nach einem Zurückschneiden des Endmeristems wird mit einem Zeitabstand von vier und zwanzig Stunden und auf jede Knospe zweimal eine Lösung von Colchizin zu 0,25 % suspendiert in Agar-Agar zu 1,5 ‰ und versetzt mit 10 ppm Gibberellin aufgetragen; sodann werden die Pflanzen in einen Feuchtraum gebracht. 70 % der behandelten Haploide brachten einen diploiden Trieb bei den ersten Auftragungen von Colchizin hervor.

Las observaciones relativas al crecimiento de los haploides se hicieron sobre plantitas jóvenes trasplantadas en tres condiciones de cultivo diferentes: 1) cultivo en maceta con mezcla de tierra de criadero sin aporte de solución nutritiva; 2) cultivo en maceta con mezcla de tierra de vivero y con aporte de solución nutritiva; 3) cultivo en solución nutritiva sobre substrato neutral; cualesquiera sean las condiciones de cultivo, los haploides de *Theobroma cacao* se hallan incapaces de sobrevivir con su propio sistema de raíces; el autor superó dicha dificultad con injerto en *Theobroma cacao* diploide.

El injerto puede efectuarse tanto durante la fase cotiledonaria como con plantitas de algunos meses de edad y el crecimiento y desarrollo del haploide injertado en diploide son netamente superiores a los del haploide que se desarrolla con su propio sistema de raíces. Dos o tres meses después del injerto, el tallo puede dar ramas para otros injertos.

Los ensayos de duplicación de la cantidad de cromosomas se hicieron únicamente con haploides injertados. Después de desmochar el meristemo terminal, se efectúan en cada yema dos aplicaciones, separadas por un espacio de tiempo de veinticuatro horas, de una solución de colquicina al 0,25 % en suspensión en el agar-agar al 1,5 ‰ con adición de 10 ppm de gibberelina; después se ponen las plantas en una cámara húmeda. El 70 % de los haploides tratados dieron ya un chupón diploide una vez hechas las primeras aplicaciones de colquicina.