

## RESTAURATION CHIMIQUE DE LA FERTILITE MALE CHEZ LE TOURNESOL

G. PIQUEMAL, A. BOUQUET, J. CLEOMENE (France)

On a pu douter assez longtemps de la possibilité d'obtenir des hybrides simples de tournesol alors même que l'avantage de tels hybrides était bien reconnu. Or, depuis une dizaine d'années, les recherches entreprises en plusieurs pays ont démontré que toutes les méthodes d'obtention d'hybrides imaginées pour d'autres espèces conviendraient au tournesol. Nous pensons même qu'avec le tournesol pourrait s'inaugurer une méthode originale rarement envisagée par ailleurs : la restauration chimique de la fertilité pollinique des lignées mâle-stériles.

La castration, à condition d'être de réalisation facile et économique, présente l'avantage de permettre l'exploitation immédiate de certaines combinaisons de lignées dès que leur supériorité a été reconnue. Dans ce but, depuis plus de quinze ans, ont été essayés de nombreux agents chimiques (F. WIT) (14) sans que leur emploi ne se soit, semble-t-il, généralisé autant qu'on pouvait l'espérer.

Beaucoup de ces produits, dits "gamétocides", sont phytotoxiques. Ils nécessitent un dosage précis et doivent être appliqués à un stade du développement parfois bien défini mais difficile à atteindre simultanément sur l'ensemble des plantes à traiter.

Chez le tournesol, tous ces inconvénients ne sont pas complètement exclus avec l'emploi des gibberellines malgré des résultats très satisfaisants enregistrés grâce aux données expérimentales de plusieurs chercheurs : SCHUSTER, W. (12), SPIROWA, M. (13), ANASCHENKO, A.V. (1), PIQUEMAL (10).

D'autre part, l'utilisation de la stérilité mâle simplement génique par couplage avec un gène marqueur a rencontré aussi quelques difficultés. La multiplication du parent femelle s'est avérée très délicate en raison du risque élevé de contamination par un pollen étranger et aussi par du pollen de plantes non marquées devenues fertiles après la rupture du "linkage". Il nous est apparu que toutes ces difficultés seraient évanouies dès lors que nous serions en mesure d'obtenir des phénotypes fertiles à partir de génotypes mâle-stériles.

Assez peu de travaux ont fait état de l'inversion dirigée d'une sexualité préalablement contrôlée par un gène. Citons les résultats de J.N.R. KASEMBE (7) qui a pu, par l'acide gibberellique, restaurer la fertilité d'un mutant d'Orge mâle-stérile, tandis que S.C. PHATAK, S.H. WITTEWITZ et autres (9) ont induit la formation d'anthères et de pollen sur des mutants de tomate dépourvus d'étamines.

En règle générale, à la suite de F. LAIBACH et F.I. KRIBBEN, 1949 (8), la plupart des auteurs

se sont attachés à obtenir des plantes mâle-stériles à partir d'individus bisexués. De la masse des données recueillies depuis vingt ans, il ressort que le développement d'un sexe au détriment de l'autre est largement dépendant des facteurs naturels de croissance ou de leurs homologues artificiels ainsi que des réducteurs de croissance capables de contrarier les premiers. Le cas des Cucurbitacées est particulièrement connu. En 1970, E. GALUN (5) ainsi que B. BORGHI et W. PIRONI (2) ont rappelé la bibliographie concernant cette famille et ont confirmé que parmi les espèces où l'expression du sexe mâle est favorisée par l'acide gibberellique, un réducteur de croissance tel que l'"Ethrel" (acide chloro-2-éthylphosphonique) était très efficace pour éliminer les fleurs mâles.

Il a été indiqué par ailleurs que le B.995 (acide N. dimethylaminosuccinique) permettait de diminuer la proportion des fleurs mâles chez Cucumis melo L. (HALEVY et RUDICH) (6) et chez Momordica charianta L. (BOSE et GHOSH) (3). BOSE et J.P. NITSCH (4) ont mis en évidence une action analogue sur Luffa acutangula Roxb. Mais cet effet était encore plus accusé avec le C.C.C. (Chlorure de 2-Chloro-éthyltriméthyl ammonium).

Nous étions donc naturellement amenés à expérimenter l'Ethrel, le B. 995 et le C.C.C. réducteurs de croissance réputés "antigibberelliques" pour tenter de restaurer la fertilité mâle chez le tournesol, connaissant les effets de la gibberelline dans cette espèce.

Nous avons également expérimenté une "morphactine" (méthyl-ester de chloroflurenol) à des concentrations variant de 0,05 p.p.m. à 80 p.p.m. N'ayant pas obtenu le résultat escompté, il n'en sera pas fait mention par la suite.

Le choix des doses et modes d'utilisation de l'Ethrel et du C.C.C. ont été déterminés d'après quelques résultats d'essais antérieurs à 1971 et qui ne seront pas rappelés ici.

#### MATERIEL ET METHODE :

##### 1 - Matériel végétal

Le semis a eu lieu le 26 avril 1971 au Domaine de Lavalette (Montpellier), sur un terrain normalement fumé et n'ayant subi aucun traitement herbicide. Les plantes, bien individualisées, ont été installées par semis de poquets espacés de 0,80 m x 0,30 m. Les plantes anthocyanées ou nettement hybrides ont été éliminées. La lignée "femelle 10" qui a été utilisée est l'un des parents de l'hybride INRA 6501. Elle devait nous fournir, théoriquement, 99 % de plantes mâle-stériles. Malheureusement, par suite d'accidents en cours de multiplication, on n'a pu en dénombrer que 74 % parmi les témoins non traités.

##### 2 - C.C.C.

Le produit commercial "Cycocel" a été dilué à 1 000 ou 2 000 p.p.m. de m.a. et appliqué en pulvérisations foliaires jusqu'à ruissellement (10 à 20 cm<sup>3</sup> par plante) ou au sol, à raison de 50 cm<sup>3</sup> des solutions indiquées (injection sur un rayon de 20 cm au pied des plantes, suivie d'un arrosage de 250 cm<sup>3</sup> d'eau par plante).

##### 3 - B. 995

Nous avons utilisé le produit commercial "Alar" dilué à 1 000 ou 2 000 p.p.m., selon les mêmes modalités que pour le C.C.C. sur feuilles.

##### 4 - Ethrel

Une formulation expérimentale, fournie par la Compagnie Française des Produits Industriels (C.F.P.I.) a été étendue à 600 et 900 p.p.m. de m.a. pour être pulvérisé aux mêmes dates que les autres produits.

Chacun des 24 traitements élémentaires ainsi que le traitement nul (témoin) a été appliqué à une trentaine de plantes distribuées au hasard.

Tableau 1 - Indication des traitements expérimentés

Produits et doses	Dates des traitements		
	2 juin (6 feuilles)	9 juin (12 feuilles)	15 juin (18 feuilles)
<u>C.C.C. au sol</u> 50 mgr/plante	s1	s2	s3
	S1	S2	S3
<u>C.C.C. sur feuilles</u> 1 000 p.p.m.	f1	f2	f3
	F1	F2	F3
2 000 p.p.m.			
<u>Ethrel sur feuilles</u> 600 p.p.m.	e1	e2	e3
	E1	E2	E3
900 p.p.m.			
<u>B.995 sur feuilles</u> 1 000 p.p.m.	b1	b2	b3
	B1	B2	B3
2 000 p.p.m.			

RESULTATS

1 - Effets généraux des traitements (tableau 2)

Tableau 2 - Effets moyens des traitements sur la taille des plantes et le diamètre des capitules (compte non tenu du moment des traitements).

Traitements	Taille moyenne des plantes cm	Diamètre moyen des capitules cm
<u>C.C.C. sur feuilles</u> 1 000 p.p.m.	126	22,0
	121	22,0
2 000 p.p.m.		
<u>C.C.C. au sol</u> 50 mgr/plante	128	21,5
	130	22,0
100 mgr/plante		
<u>B. 995 sur feuilles</u> 1 000 p.p.m.	127	22,5
	125	22,0
2 000 p.p.m.		
<u>Ethrel sur feuilles</u> 600 p.p.m.	111	22,5
	101	21,0
900 p.p.m.		
Témoin	128	21,5
P.P.D.S. (p = 0,05)	4,5	N.S.

a) le C.C.C. sur feuilles a causé quelques brûlures et nécroses des bords du limbe. Ces symptômes ont été surtout marqués à 2 000 p.p.m. Mais la vigueur des plantes n'a pas été affectée et leur taille n'a été que très légèrement réduite.

b) le C.C.C. au sol n'a guère modifié la taille des plantes et le diamètre des capitules comparativement au témoin.

c) le B.995 sur feuilles n'a pas paru toxique aux concentrations essayées. Le diamètre moyen des capitules est demeuré voisin de celui des témoins et la taille n'a été que légèrement réduite.

d) l'Ethrel a eu des effets beaucoup plus marquants. Peu après les traitements, on a constaté pendant quelques jours un affaissement des feuilles qui ont ensuite retrouvé leur aspect normal. La floraison semble avoir été retardée de 2 à 3 jours, pour les traitements tardifs (différence non significative).

Si les diamètres des capitules étaient voisins de celui du témoin, par contre, une réduction significative de la taille a été enregistrée.

## 2 - Effets des traitements sur la production de pollen

Les capitules ont été examinés à pleine floraison et une notation binaire a été adoptée.

- + = plantes mâle-fertiles produisant un pollen abondant,
- o = plantes mâle-stériles ne produisant pas de pollen ou un pollen très rare et anormal (vérification après coloration au carmin acétique).

Faisant abstraction de la date d'application des traitements, on a analysé la variation du pourcentage de plantes mâle-fertiles selon les produits et les doses, les données étant recueillies sur 3 répétitions (tableau 3). Pour des raisons déjà signalées, on a rencontré 26 % de plantes fertiles parmi les témoins. Ce taux de fertilité mâle a été nettement accru dans 4 des cas et même doublé par l'emploi du C.C.C. au sol, à raison de 100 mgr par plante.

D'autre part, on a analysé la distribution des plantes dans les deux classes "fertiles" et "stériles" comparativement à celle observée pour les témoins (tableaux de contingence à 4 cases).

Tableau 3. - Effets des traitements sur le taux moyen de fertilité mâle

Traitements		Taux de fertilité mâle
<u>C.C.C. sur feuilles</u>	1 000 p.p.m.	27 %
	2 000 p.p.m.	29
<u>C.C.C. au sol</u>	50 mgr/plante	43*
	100 mgr/plante	50*
<u>B. 995 sur feuilles</u>	1 000 p.p.m.	36*
	2 000 p.p.m.	29
<u>Ethrel sur feuilles</u>	600 p.p.m.	46*
	900 p.p.m.	33
Témoin		26
P.P.D.S. (p = 0,05)		8,5 %

D'après les calculs des tests  $\chi^2$  pour les traitements les plus efficaces (doses et dates d'application), on a estimé les probabilités suivantes pour que les écarts au témoin ne soient pas le fait du hasard :

Ethrel 600 p.p.m.

e1 = P > 80 %

e2 = P > 90 %

e3 = P > 99 %

C.C.C. au sol (50 mg)

s1 : -

s2 : P > 80 %

s3 : P > 90 %

C.C.C. au sol (100 mg)

S1 : -

S2 : P > 90 %

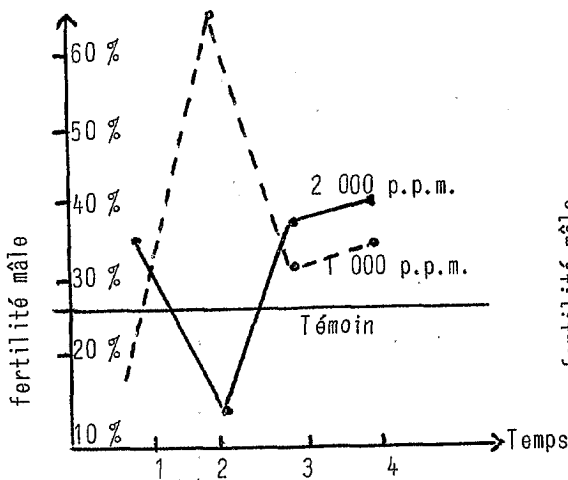
S3 : P > 99 %

Il y a là une confirmation du résultat obtenu par la comparaison des taux moyens de fertilité mâle et aussi une indication de l'augmentation de l'efficacité des traitements quand ceux-ci sont différés.

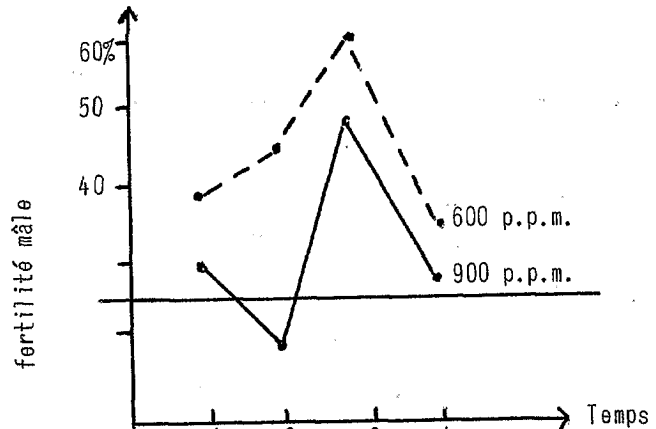
Pour plus de précision, on a défini le moment d'intervention par rapport à la date de floraison qui avait été notée pour chaque plante. (Rappelons que les dates moyennes de floraison ne différaient pas significativement entre elles, l'écart le plus important, 2 à 3 jours étant observé avec l'apport d'Ethrel). D'après le nombre de jours séparant la date des traitements de la date de floraison, les plantes ont été réparties en 4 classes de 4 jours :

- 1 : traitement 44 à 40 jours avant la floraison
- 2 : " 39 à 35 " " "
- 3 : " 34 à 30 " " "
- 4 : " 29 à 25 " (ou moins) "

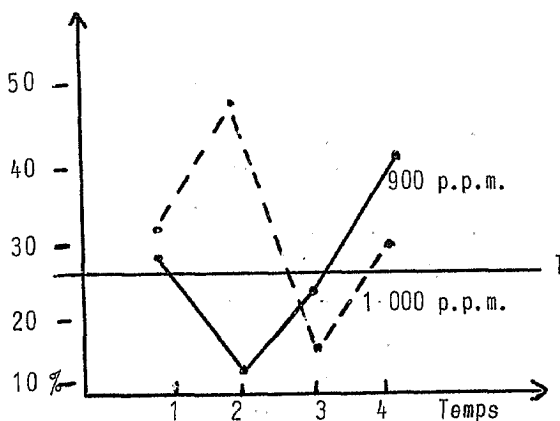
Dans chacune de ces classes, on a estimé le taux de fertilité mâle dont l'évolution apparaît sur les quelques graphiques de la figure 1. Les données, insuffisamment nombreuses, ne nous autorisent pas à considérer comme significatifs les écarts observés pour une même date de traitement. L'observation des graphiques fait cependant ressortir une réponse très régulière aux applications du C.C.C. dans le sol. Cette réponse, toujours positive, est constamment meilleure à la plus forte dose et elle s'accroît régulièrement quand on s'approche jusqu'à 26 jours de la floraison (classe 4), moment par ailleurs reconnu comme le plus favorable pour l'obtention de la stérilité mâle par l'acide gibberellique.



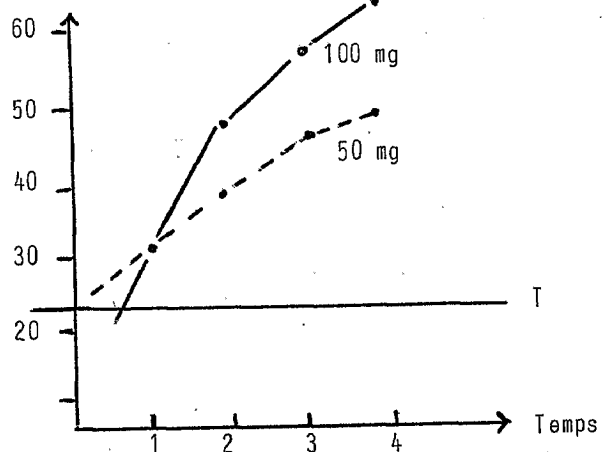
B. 995 sur feuilles



Ethrel sur feuilles



C.C.C. sur feuilles



C.C.C. au sol

Figure 1 - Variation du taux de fertilité mâle en fonction du moment d'application des traitements (les milieux des classes 1, 2, 3, 4 correspondent respectivement à 41, 36, 31 et 26 jours avant la floraison).

L'Ethrel sur feuilles a fourni deux graphiques "parallèles" qui se confirment l'un l'autre, montrant que la dose la plus faible a été la plus efficace et que le traitement devait être réalisé à un moment très précis se situant juste avant le stade "étoilé", un mois avant la floraison.

Le B. 995 et le C.C.C. sur feuilles semblent d'un emploi très aléatoire, les graphiques étant inversés lorsque l'on change de dose.

## CONCLUSION ET DISCUSSION

Le travail dont les résultats viennent d'être exposés n'est qu'une première approche du problème de la restauration de la fertilité mâle et il ne saurait être question de discuter des modes d'action hypothétiques des produits expérimentés. Nous pensons toutefois avoir démontré que certains réducteurs de croissance peuvent modifier l'expression phénotypique de la stérilité mâle génique chez le tournesol.

L'utilisation du C.C.C. apporté au sol quand apparaissent les bractées, semble particulièrement recommandable à raison d'au moins 150 mgr de produit pur par plante. Le C.C.C. fourni au sol a une action lente, progressive, sans manifestation de phytotoxicité. D'ailleurs, RAY, B.R. et SCHRODER, V.N. (11) ont signalé que des tournesols âgés de deux semaines pouvaient supporter une dose 14 fois supérieure à celle que nous avons expérimentée. Appliqué sur les feuilles, le C.C.C. a une action plus brutale qui se traduit par une réduction significative de la taille des plantes (tableau 2) ; mais cette action est limitée dans le temps et, pour parvenir régulièrement à une restauration de la fertilité mâle, sans doute faudrait-il intervenir à un stade assez avancé de la différenciation du capitule. En application foliaire, l'Ethrel présente quelque intérêt. Des doses inférieures à 600 p.p.m. seraient à essayer. Les traitements paraissent, en ce cas, devoir être réalisés relativement tôt, juste avant l'apparition des bractées, un mois avant la floraison. L'apport de l'Ethrel au niveau des racines méritera aussi d'être expérimenté.

Du point de vue pratique, ces résultats nous semblent satisfaisants car il n'est pas nécessaire de rechercher une restauration totale de toute une descendance mâle-stérile. Nous pensons en effet que 25 % des plantes devraient assurer une pollinisation suffisante de leurs voisines.

Afin de vérifier que les traitements n'ont pas entraîné de modification génotypique, 48 capitules mâle-fertiles prélevés sur des plantes traitées à l'Ethrel ou au C.C.C., ainsi que sur des témoins, ont été autofécondés. Les graines de ces capitules ont été semées séparément en 1972, pour observer la nature des descendances. Dans chacune de celles-ci 4 pieds seront de nouveau traités au C.C.C. (150 gr. au sol) afin de reconduire ceux dont la descendance se sera bien révélée mâle-stérile. On devrait ainsi développer rapidement un parent "femelle 10" pur qui ne nécessiterait plus un intense travail de sélection ni le démariage des pieds anthocyanés. Il reste à discuter de l'avenir de cette méthode relativement aux autres méthodes proposées pour l'obtention de semences hybrides de tournesol.

Il ne fait aucun doute que la castration chimique par l'acide gibberellique ne peut plus être ignorée par le sélectionneur. Son utilisation par les producteurs de semences tendra-t-elle à se développer ? Cela dépendra en partie des efforts qui seront faits par ces derniers pour trouver des solutions pratiques aux problèmes que posent les traitements chimiques à une échelle autre que celle de la Station de recherches. Ces traitements exigent une réussite parfaite de la stérilisation.

Du point de vue du multiplicateur de semences, l'utilisation d'un parent entièrement femelle sans aucun traitement est certainement beaucoup plus commode. La stérilité mâle génique maintenue par restauration chimique ou la stérilité mâle cytoplasmique le permettrait.

Pour le sélectionneur, l'exploitation de la stérilité cytoplasmique imposera, au moins dans les prochaines années, la conversion des meilleures lignées dans les 3 formes : mâle-stérile cytoplasmique, mainteneuse de stérilité et restauratrice. Par l'emploi des restaurateurs chimiques, les lignées seraient à convertir seulement en lignées mâle-stériles géniques stables. Cette conversion serait assez rapide puisqu'on userait d'autofécondations et non plus de croisements "sibs", comme il fallait le faire jusqu'ici.

Quant à la production d'hybrides "3 voies", elle peut aussi être envisagée en croisant tout d'abord deux lignées mâle-stériles dont l'une aura été rendue fertile.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ANASCENKO, A.V. (1967) Chemical castration of Sunflower (Dokl.-Vsesojuz. Akad. sel'skokhoz. Nauk V.I Lenina SS.SR, 2, 1718).
- (2) BORGHI, B. et PIRONI, W. (1970) Les effets de divers biostimulateurs sur la biologie florale de certaines Cucurbitacées (Eucarpia, 9-12 juin 1970 C.R. 191).
- (3) BOSE, T.K. et GHOSH, M.S. (1968) Effect of B. nine on sex expression of Cucurbits. (Sci. and Culture, Calcutta, 34, 216-217)
- (4) BOSE, T.K. et NITSCH, J.P. (1970) Chemical alteration of sex expression in Luffa acutangula Roxbg. (Physiol. Plant., 23, 1206-1211)
- (5) GALUN, E. (1970) Hybrid seed production in cucumis : production procedure based on sex control by genic and chemical factors. (Proc. XVIIIth. Int. Hort. Cong.).
- (6) HALEVY, A.H. et RUDICH, Y. (1967) Modification of sex expression in muskmelon by treatment with the growth retardant B. 995 (Physiol. Plant., 20, 1052-1058)
- (7) KASEMBE, J.N.R.V. (1967) Phenotypic restoration of fertility in male-sterile mutant by treatment with gibberellic acid (Nature, vol. 215, Aug. 5, 668)
- (8) LAIBACH, F. et KRIBEN, F.I. (1949) Ber. deut. botan. Ges. 62 (d'après WITTWER, S.H., Science, vol. 120 893-894).
- (9) PHATAK S.C., WITTWER S.H., HONMA S. et BUKOVAC M.J. (1965) Gibberellin induced anther and pollen development in a stamen - less tomato mutant (Nature, 209, 635-636).
- (10) PIQUEMAL G. (1970) How to produce hybrid sunflower seeds by inducing male sterility with gibberellic acid. (Proceedings of the IV<sup>o</sup> Intern. Conf. of Sunflower. 127-135).
- (11) RAY, B.R. et SCHROEDER, V.N. (1966) Effect of growth regulator Cycocel on Sunflower plants as affected by method of application. (Soil Crop. Sc. Society of Florida, 26, 245-248).
- (12) SCHUSTER W. (1969) Beobachtungen über männliche sterilität beider Sonnenblume (Helianthus annuus L.) Ausgelöst durch genetische, physiologische und induzierte Chemische Faktoren. (TAG, 6, 261-273).
- (13) SPIROWA, M. (1968) Essai pour provoquer artificiellement la stérilité mâle chez le tournesol (Helianthus annuus L.) traduction (Vissh. Selesk. Inst. G. Dimitrov, Nauk. T.R. ser. Rasteniev, 16, 145-157).
- (14) WIT F. (1960) Chemical inducing male sterility a new tool in Plant Breeding (Euphytica, 9, mai 1960, 1-12).