



Développement et applications des techniques de coloration différentielle des chromosomes chez les végétaux : caryotypes et structures chromosomiques, identification des espèces et relations phylétiques

Michel Bernard, Sylvie Bernard

Société Française de Génétique

Président

E. Moustacchi

Vice-présidents

P.-H. Gouyon

A. Nicolas

C. Stoll

Secrétaire général

R. Motta

*Prière d'adresser toute correspondance au
Secrétariat général de la SFG, Roland
Motta, Institut de recherches scientifi-
ques sur le cancer, laboratoire de recher-
ches génétiques sur les modèles animaux,
7, rue Guy-Môquet, 94802 Villejuif
Cedex, France.*

Comité de rédaction

A. Bernheim

J.-C. Dreyfus

M. Fellous

J. Générmont

F. Minvielle

R. Motta

A. Nicolas

S. Sommer

D. de Vienne

Secrétaire

M.-L. Prunier

Il est connu, depuis le début de ce siècle, que chaque espèce animale ou végétale possède un jeu de chromosomes, définissable par son effectif et certains paramètres morphologiques (taille, position des centromères, des constriction secondaires). Le caryotype — cet ensemble de caractéristiques — constitue un élément important de classification des espèces.

L'intérêt qui a été porté aux chromosomes a été d'autant plus grand que leur rôle en tant que support du matériel héréditaire a été rapidement reconnu (élaboration de la théorie chromosomique de l'hérédité au début du siècle). Par ailleurs, à partir des années 1930, la cytogénétique végétale a connu de prodigieux développements. C'est à cette époque qu'on a découvert les propriétés de la colchicine, agent permettant de doubler le stock chromosomique de cellules végétales. On a donc pu imaginer faire des « super-plantes » en augmentant le nombre de chromosomes (plantes polyploïdes). On a aussi pu imaginer d'exploiter plus systématiquement les hybrides entre espèces ; en effet, ceux-ci sont normalement stériles pour cause de non-appariement des chromosomes

parentaux en méiose ; le doublement de leur nombre, rétablissant une situation disomique pour chacun d'eux, permet une méiose subnormale et restaure dans une certaine mesure la fertilité. C'est ainsi que l'hybride blé \times seigle (en latin : *Triticum* \times *Secale*) donne après traitement à la colchicine une structure amphidiploïde fertile, le triticales. A la même époque, on a émis l'hypothèse que ce même modèle pouvait être à l'origine de nombreuses espèces polyploïdes naturelles, c'est-à-dire d'espèces dont le nombre de chromosomes est multiple du nombre de base caractéristique du genre ou de la tribu (x) : blé tendre (*Triticum aestivum*, $2n = 6x = 42$), blé dur ($2n = 4x = 28$), colza (*Brassica napus*, $2n = 4x = 38$), coton (*Gossypium hirsutum*, $2n = 4x = 52$), tabac (*Nicotiana tabacum*, $2n = 4x = 48$), etc. La synthèse en laboratoire de certaines d'entre elles, à partir des ancêtres putatifs, a pu être réalisée et donna des individus très comparables à ceux de l'espèce « naturelle ».

Plus récemment, ont été mises au point chez de nombreuses espèces végétales des techniques permettant d'obtenir des individus haploïdes, géné-

ralement dérivés de microspores cultivées *in vitro*, ou à la suite de croisements interspécifiques ou intergénériques. Tous ces phénomènes suggèrent une extrême tolérance du végétal vis-à-vis de modifications de nombre, mais aussi de structure, de ses chromosomes : translocations, inversions, délétions, trisomie, monosomie, n'ont souvent qu'une incidence faible sur la viabilité et la fertilité des individus. De surcroît, il faut souligner que les chromosomes végétaux, présents sous forme condensée dans tous les tissus méristématiques ou sporogènes, sont d'accès facile. En revanche, leur taille peut être, dans certains groupes, un facteur limitant les possibilités d'observation.

Dans ce contexte de tentative de compréhension de certains mécanismes évolutifs, et d'exploitation d'événements identiques à des fins de sélection, il est intéressant de disposer de « marqueurs » moins grossiers que ne le sont les seuls chromosomes. A la fin des années 1960 se sont développées de nombreuses techniques de cytogénétique fondées sur l'exploitation de l'hétérogénéité de la structure des chromosomes, due notamment à l'existence de deux grands types de chromatine : l'euchromatine, peu visible en interphase, et correspondant aux gènes transcrits en ARN, et l'hétérochromatine, correspondant à des régions condensées en interphase, et comportant essentiellement des régions répétées non codantes. Suivant les techniques utilisées, on a pu faire apparaître des bandes Q (observables en fluorescence à la moutarde de quinacrine), des bandes G, C et N, par coloration au Giemsa à la suite de traitements spécifiques, des bandes R, complémentaires des bandes Q et G, par coloration à l'acridine orange [1-8]. Ces travaux se sont développés de façon quasiment simultanée chez les végétaux et les animaux, et ont connu un fantastique développement en cytogénétique humaine, où il a été démontré très rapidement l'incidence d'anomalies du caryotype sur l'apparition de maladies génétiques. Des phénomènes identiques ont été mis en évidence chez les animaux [9].

Ces techniques révèlent donc sur les chromosomes un « zonage » plus ou moins important, constitué de bandes

sombres et claires, caractéristique de chaque chromosome, qui permet donc d'identifier chacun d'eux. Un point intéressant est cependant que, pour un chromosome donné, le « zonage » peut présenter de légères variations d'un individu à un autre (à condition qu'ils n'aient pas le même génotype : deux individus tirés d'une même lignée de blé auront le même zonage, deux individus appartenant à deux lignées différentes pourront avoir des zonages différents pour un ou plusieurs chromosomes). Ce polymorphisme entre individus (on dira aussi : entre génotypes) peut être utilisé pour leur identification.

Nombre d'espèces végétales ont été testées au cours de la période 1970-1975 et par la suite, avec des résultats positifs pour la plupart : on peut citer parmi elles des espèces appartenant aux genres *Vicia*, *Trillium*, *Hepatica*, *Friillaria*, *Crepis* [1], *Rhoeo* [10], *Tulipa* [11], *Scilla* [12], *Allium* [13], *Anemone* [14], *Nicotiana* [15], *Hordeum* [8, 16], *Zea* [17], *Elymus*, *Agropyron* [18, 19], *Secale* [20, 21], *Triticum* [22], *Triticale* [23], *Phleum* [37].

Globalement, les techniques de caryotypes à bandes, ou « *chromosome banding* », chez les végétaux, sont probablement plus délicates à mettre en œuvre que sur les animaux, en raison de problèmes liés à l'existence d'une paroi cellulaire coriace, de la difficulté de travailler sur des cultures de cellules synchronisées, de l'état physiologique du matériel (âge des plantes et des organes — racines le plus souvent — sur lesquels sont prélevés les méristèmes, teneur en eau des cellules). Il est, par exemple, pratiquement impossible de travailler sur la première mitose pollinique, en raison de l'importance de la paroi, malgré l'intérêt que cela présenterait. Par ailleurs, le nombre et l'intensité des bandes sont généralement plus faibles chez les espèces végétales que chez les animaux.

Cependant, sur l'ensemble des espèces de céréales à paille — blé, orge, seigle, triticale — et sur de nombreuses espèces voisines, les travaux faisant intervenir les techniques de *banding* chromosomique ont été nombreux au cours des quinze dernières années, et ont apporté des informations intéressantes. Ce développement tient à différentes raisons : traditionnelle facilité d'observation des

chromosomes de ces espèces, bonnes performances des techniques de *banding*, possibilité d'obtention d'hybrides interspécifiques et de variants chromosomiques de toute nature, importance économique. Parmi les techniques de *banding*, celle qui a eu la faveur des cytogénéticiens travaillant sur les Triticinées (blé et espèces voisines) a été celle du *C-banding*, marquant l'hétérochromatine constitutive, qui, bien que conservant le même principe de base (traitement des chromosomes dans une base faible, et renaturation dans un tampon, le SSC), a fourni des résultats de plus en plus performants. En 1977, Gerlach [8] a proposé une autre technique (dite *N-banding*), en fait décrite antérieurement chez l'homme par Dutrillaux [4], qui fait appel à une dénaturation thermique des chromosomes ; cette technique donne aussi des résultats très performants sur orge et blé, mais, contrairement au *C-banding*, a l'inconvénient de ne pas marquer tous les chromosomes du blé.

Les quelques exemples que nous allons développer concernent donc essentiellement les céréales à paille, et plus particulièrement le blé, à partir des résultats obtenus en *C-banding*, soit dans des situations intraspécifiques, soit dans des situations interspécifiques. Nous réserverons un paragraphe particulier pour les observations réalisées sur méiose et sur les spéculations concernant le rôle de l'hétérochromatine dans certaines fonctions de la plante.

Exploitation des techniques de *banding* pour la connaissance du caryotype d'une espèce

Dans le cas de blé tendre (*Triticum aestivum*), on peut identifier, avec plus ou moins de facilité, tous les chromosomes de cette espèce ($n = 21$, *figure 1*). Ces chromosomes peuvent être classés en trois groupes élémentaires, ou génomes, dénommés A, B et D, qui proviendraient chacun d'un ancêtre diploïde, en l'occurrence *Triticum monococcum* pour A, *Triticum tauschii* pour D, et un *Triticum* (ou *Aegilops*) de la section *Sitopsis* pour B, eux-mêmes dérivant d'une espèce diploïde ancestrale. De ce fait, pour tout chromosome appartenant à

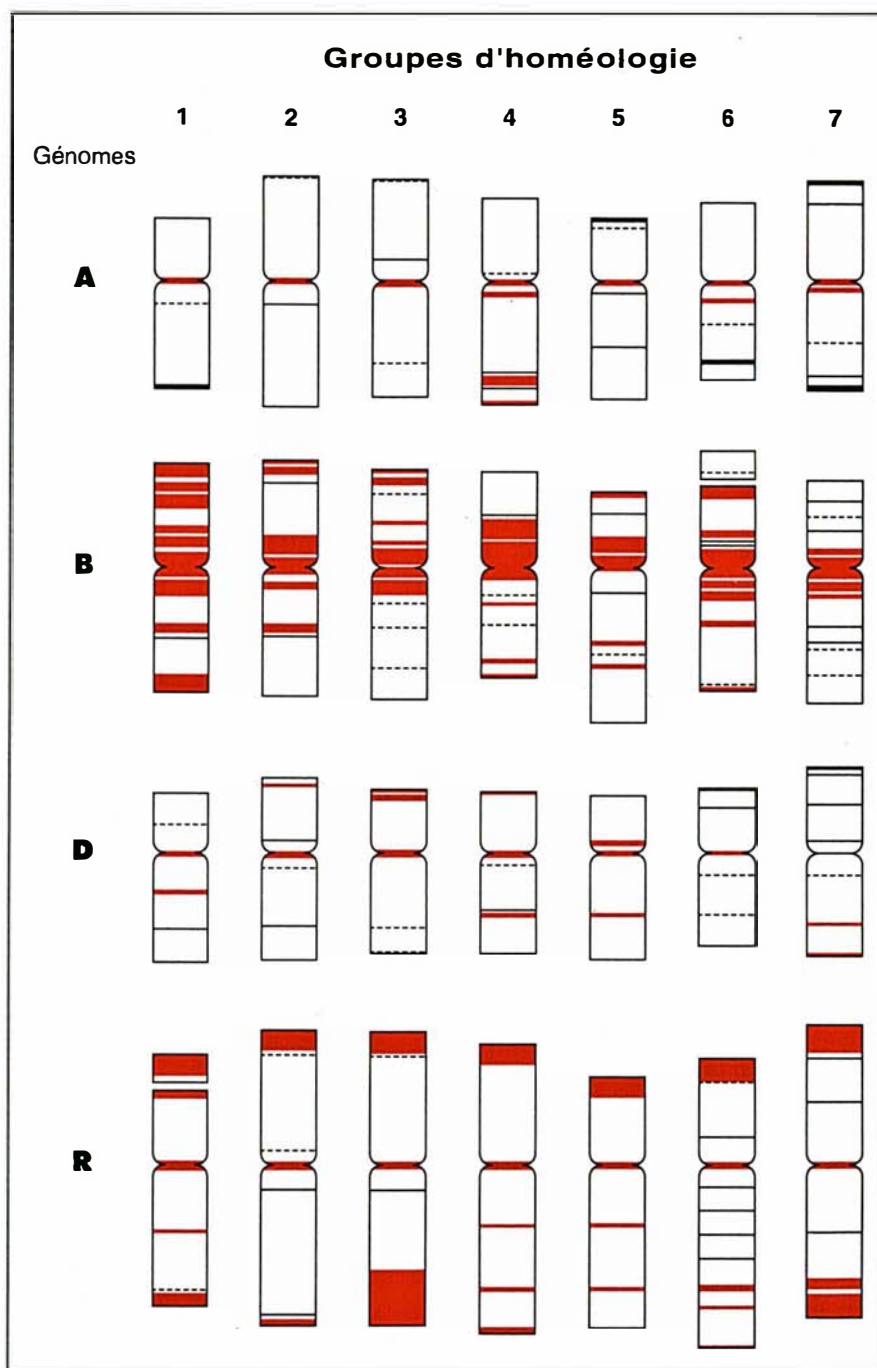


Figure 1. **Idéogramme en C-banding des chromosomes des génomes élémentaires A, B, D et R (d'après [42]).** Le blé dur (*Triticum turgidum*) comporte A et B ; le blé tendre (*Triticum aestivum*) : A, B, D ; le triticales : ABR ($2n = 6x = 42$) ou ABDR ($2n = 8x = 56$).

* **GLOSSAIRE** *

Allogame : espèce chez laquelle l'allofécondation (fécondation de l'oosphère d'une plante par le pollen d'une autre plante) est prépondérante.

Androgenèse in vitro : obtention in vitro de plantes haploïdes, issues du développement des microspores contenues dans les anthères.

Autogame : espèce chez laquelle l'autofécondation (fécondation de l'oosphère par l'autopollen) est prépondérante.

Bandes :

G : digestion par enzymes protéolytiques. Coloration au Giemsa ;

C : dénaturation par une base (généralement baryte). Coloration au Giemsa (ou Leishman) ;

N : dénaturation par température élevée en tampon phosphate. Coloration au Giemsa ;

Q : coloration à la moutarde de quinacrine. Immersion dans un tampon Mc Ilvaine (pH4 à 7). Observation en fluorescence ;

R : dénaturation thermique. Coloration au Giemsa ou à l'acridine orange (observation en fluorescence).

Bras chromosomiques (désignation des) : S = short = court, L = large = long.

Chromosomes homéologues : chromosomes appartenant à deux génomes élémentaires distincts, ayant des fonctions et une organisation génétiques proches. Dérivent d'un ancêtre commun.

Détélosomique : plante nullisomique pour un bras chromosomique.

Mixogénome : génome « artificiel » composé de chromosomes provenant de génomes homéologues élémentaires différents (ex. : 1A, 2B, 3A, 4A, 5B, 6B, 7A : les sept chromosomes proviennent des génomes élémentaires « A » et « B » du blé).

Nullitétrasomique : plante nullisomique pour un chromosome et tétrasomique pour un chromosome homéologue du chromosome absent (structure permettant une viabilité correcte de la plante : possible chez une plante polyploïde).

Phénomènes d'introgression : phénomènes conduisant à l'introduction de gènes d'une espèce dans une autre (généralement, l'espèce donneuse est une espèce sauvage, l'espèce acceptrice est l'espèce cultivée).

Recombinaison homéologue : recombinaison entre chromosomes homéologues.

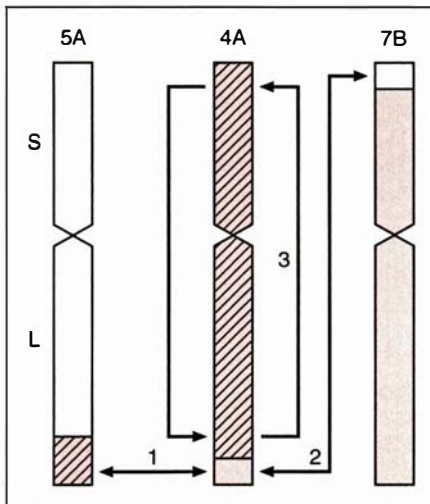


Figure 2. **Structure des chromosomes 4A, 5A et 7B : schéma des réarrangements chromosomiques intervenus entre ces 3 chromosomes.** (D'après [28].)

un génome, on trouve, dans les autres, un chromosome ayant grossièrement les mêmes fonctions génétiques. Cet ensemble de chromosomes constitue un groupe d'homéologie : ces chromosomes ont, en méiose, tendance à s'apparier. Ce type d'appariement est normalement inhibé, chez le blé, par un système génétique assez complexe, dont la pièce maîtresse est un gène, *Ph1*, porté par le chromosome 5B ; il s'ensuit que le blé tendre, espèce polyploïde, a une méiose de diploïde.

Une observation, même superficielle, des chromosomes de blé tels qu'ils apparaissent en *C-banding*, montre que ceux du génome B présentent des bandes très chargées, principalement autour du centromère, alors que ceux des génomes A et D présentent des bandes beaucoup moins importantes (figure 1). Or, jusqu'à une époque récente, et sur la base d'analyses génétiques et d'observations cytologiques antérieures, le chromosome 4A actuel était identifié comme étant le 4B, et *vice versa*. C'est sur la base des observations en *banding* que Dvorak [24] a proposé de revoir cette classification ; cette révision a ensuite été corroborée par des observations faisant appel à d'autres techniques, notamment moléculaires [25].

Le *C-banding* a permis aussi d'affiner nos connaissances sur la structure chromosomique du blé et du seigle [26, 27].

C'est ainsi que Naranjo [28] a pu montrer qu'il existait dans le blé dur ($2n = 4x = 28$, génome AB) des remaniements structuraux importants (translocations en chaîne et inversion péricentrique), concernant simultanément les chromosomes 4A, 5A et 7B (figure 2). Ces remaniements semblent généraux dans l'ensemble des espèces blé tendre et blé dur. Il est donc vraisemblable que la structure ainsi créée est « née » en même temps que ces espèces ; on peut se demander si elle correspond à un événement aléatoire ou si elle a une signification particulière dans le processus d'élaboration et de domestication du blé. Cette structure a été confirmée par les analyses moléculaires (RFLP) [29].

De façon plus ponctuelle, on sait que les génotypes de blé peuvent différer les uns des autres — et de la structure dite « primitive » que l'on trouve chez la variété de référence *Chinese Spring* — par un certain nombre de remaniements, notamment translocations (par exemple $5B^S/7B^S$, très courante dans de nombreux génotypes européens). Certaines de ces translocations sont aisément décelables en *C-banding*. Là aussi, on ne sait pas si les différences d'organisation sont des réponses aux pressions de sélection ou s'il s'agit d'événements aléatoires.

Une autre application concerne l'élaboration et le maintien de tout un ensemble de matériels aneuploïdes (monosomiques, nulli-tétrasoniques, ditelosomiques, etc.) qui sont utilisés pour la localisation de nombreux gènes. En effet, le risque est grand de perdre ces familles particulières, qu'il faut contrôler périodiquement. La reconnaissance « immédiate » de nombreux chromosomes permet d'alléger considérablement les procédures de conservation.

Plus généralement, l'identification des chromosomes par *C-banding* peut apporter une aide précieuse à un projet de cartographie physique. En effet, on peut engendrer, par diverses méthodes (androgenèse *in vitro*, embryogenèse somatique), des lignées présentant des délétions plus ou moins importantes sur les divers chromosomes, dont certaines peuvent être identifiées ; ce matériel peut alors être utilisé pour localiser « physiquement », sur une portion de chromosome déterminée, certains loci identifiés par RFLP. Le groupe ITMI (*international Triticeae mapping initiative*),

associant universités américaines, australiennes, japonaises et britanniques sur un projet de cartographie moléculaire du blé, dispose par exemple de plus de 150 lignées de délétion de la variété *Chinese Spring*. De même, cette méthode a permis à Endo et Mukai [30] de localiser un locus dit spelloïde — impliqué dans la morphologie de l'épi de blé — sur le chromosome 5A. Cette approche permet de vérifier, une fois encore, combien sont différentes la carte physique et la carte génétique (figure 3). Elle permet aussi de constater que les marqueurs RFLP issus d'ADNc, et les gènes que l'on peut identifier, sont souvent localisés chez le blé dans les portions télomériques des chromosomes, et rarement dans les secteurs péricentriques. Il semble que le seigle présente une situation identique.

Chez des espèces diploïdes de céréales, notamment le seigle (*Secale cereale*, génome R) et l'engrain (*Triticum monococcum*), l'identification des différents chromosomes par *C-banding* a permis d'isoler avec une relative facilité les différentes familles trisomiques, ce qui offre la possibilité de procéder à des analyses génétiques [32, 33].

Dans la mesure où il existe un polymorphisme intraspécifique, on peut chercher à l'utiliser dans des processus d'identification d'individus, lignées ou clones. Chez le blé tendre, Friebe *et al.* [34] ont clairement montré l'existence d'un tel polymorphisme. Sur blé dur et seigle, N. Jouve *et al.* [35] ont répertorié 23 bandes polymorphes sur 28 décelables sur le génome A, 36 sur 59 sur le génome B, 30 sur 39 pour le génome R. Ce polymorphisme peut faciliter l'élaboration de certains matériels. Par exemple, nous avons créé au laboratoire, dans un fonds génétique connu (celui de la variété demi-naine Courtot), des variants chromosomiques obtenus en remplaçant un chromosome particulier de Courtot par un homologue provenant d'autres génotypes : ce travail a été réalisé pour les chromosomes 1A, 1B, 1D, 6A, 6B, 6D. Dans certains cas, il a été possible d'utiliser le polymorphisme des bandes pour vérifier que la substitution a bien été réalisée [35]. De surcroît, il a été observé dans Courtot lui-même, pour deux chromosomes (1D et 6B), une hétérogénéité pour des phénomènes de pré-

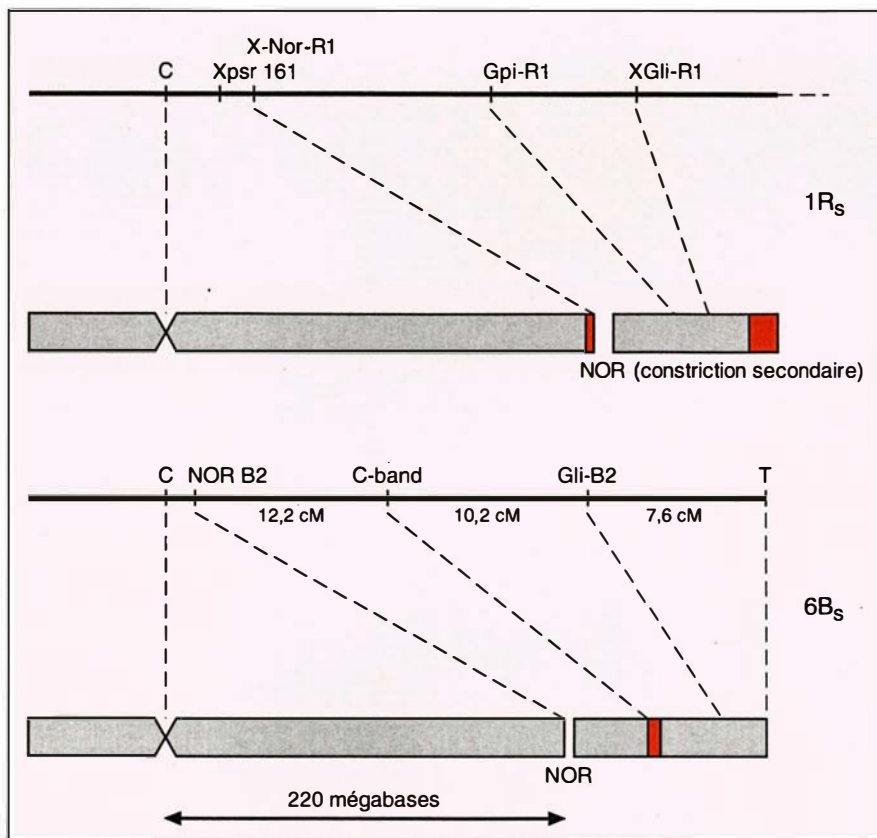


Figure 3. **Cartes physiques et cartes génétiques des bras courts (« short ») des chromosomes 1R et 6B.** (D'après M. Gale et R. Koebner, communication personnelle, et [31].)

sence/absence de bandes « mineures ». Pourtant cette variété, inscrite au Catalogue officiel en 1974, est maintenue depuis lors suivant des schémas de sélection conservatrice. Elle présente cependant une certaine instabilité, et notamment l'apparition récurrente de plantes plus hautes et à épi plus lâche. Il sera intéressant de vérifier si les deux phénomènes — instabilité phénotypique et hétérogénéité du caryotype — sont liés, et de préciser comment se maintient et se transmet cette hétérogénéité.

Il est évident que ce genre de travail ne peut être fait que s'il y a polymorphisme intraspécifique, il ne faut pas que celui-ci soit trop important. Chez le maïs, par exemple, les bandes sont si peu nombreuses et si variables, qu'il paraît extrêmement difficile, dans les hybrides, de déterminer les couples de chromosomes homologues (figure 4).

Comparaison d'espèces et étude d'hybrides interspécifiques

La possibilité de décrire les chromosomes de façon plus détaillée que par le passé a permis à la cytogénétique d'apporter d'intéressantes contributions à l'identification des espèces, à l'établissement de relations phylétiques, à l'évaluation de phénomènes d'introgession. La simple observation des caryotypes révèle que la répartition des bandes est très différente suivant les espèces. Par exemple, le seigle, l'orge et le blé — qui sont phylétiquement et génétiquement des espèces proches — ont des caryotypes extrêmement dissemblables. Le seigle a des bandes essentiellement en position terminale (télomérique) ; le blé et l'orge, essentiellement en position péri-centrique. Certains auteurs [10, 51] considèrent que l'organisation du chromosome ainsi révélée est liée à la biologie florale : le seigle est en effet une

espèce allogame, le blé et l'orge sont à prédominance autogame. Des constatations analogues ont été faites dans d'autres groupes [18]. Cette organisation pourrait aussi être liée à l'établissement des connections physiques entre chromosomes, préliminaires aux phénomènes de recombinaison. Nous aurons l'occasion d'évoquer quelques travaux sur ce sujet.

Le deuxième aspect concerne les possibilités d'analyse phylétique. Dans la mesure où le polymorphisme s'accroît quand on considère l'espèce, le genre ou la tribu, on peut tenter de l'utiliser pour contribuer à établir des relations phylétiques entre sous-ensembles d'un même ensemble. C'est ainsi que Lind-Laursen *et al.* [16], ont étudié les caryotypes d'espèces du genre *Hordeum* d'Amérique latine, diploïdes et polyploïdes. Ces auteurs ont pu établir nettement la participation de certaines espèces diploïdes à l'élaboration d'espèces polyploïdes, et donc préciser les relations de proximité dans ce groupe d'espèces. Des travaux analogues ont été réalisés sur *Phleum* [37], ainsi que sur un ensemble de sous-espèces de maïs [38], où il a été possible de proposer une structuration malgré un nombre total de bandes relativement faible (6 à 18, suivant les génotypes).

Une application très immédiate du *C-banding* est celle de la vérification de l'existence d'hybrides, notamment à partir de parents qui ont le même nombre de chromosomes, mais qui sont discernables par leurs phénotypes chromosomiques : par exemple *Triticum tauschii* × seigle ($2n = 14$), maïs × sorgho ($2n = 20$). Dans le premier cas, l'obtention d'hybrides a pu être confirmée [39], dans le second cas, elle a été réfutée [40].

Une démarche fréquemment suivie en amélioration des plantes consiste à réduire le plus possible le matériel génétique introduit d'une espèce dans une autre. On crée pour cela, à partir des hybrides initiaux, des lignées dérivées, se rapprochant du type cultivé par addition ou substitution de chromosomes, ou par « recombinaison » homéologue. Le génome de l'espèce acceptrice est donc aussi peu modifié que possible. Ce genre de manipulation a fréquemment été réalisé à partir d'hybrides entre blé

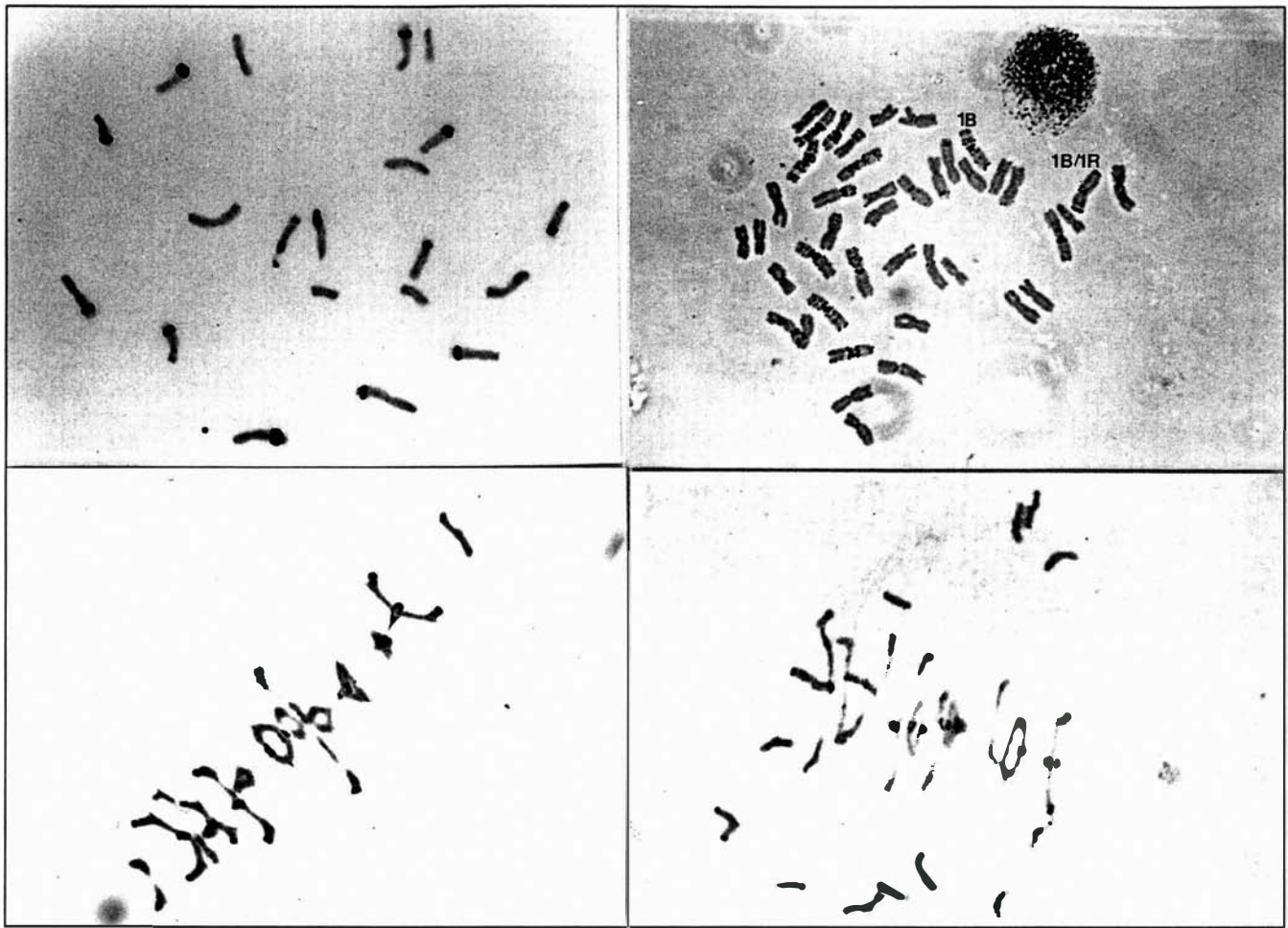


Figure 4. Photographies de cellules colorées par la technique de C-banding : cellules somatiques de maïs (a), d'un blé porteur d'une translocation 1B/1R (b) ; cellules mères de pollen d'un amphiploïde *Triticum tauschii* x *Secale cereale* (c) et d'un hybride triticales x *Secale cereale* (d). En c, d, les chromosomes de seigle sont reconnaissables à leurs blocs télomériques fortement chargés en hétérochromatine. (Photos a et b : S. Bernard ; photos c et d : M. Bernard.)

et d'autres Triticées (seigle, orge, *Aegilops* ou chiendent), ainsi que chez les Crucifères, les cotonniers, etc., principalement pour introduire chez l'espèce cultivée des gènes de résistance aux maladies. Par les méthodes cytogénétiques conventionnelles, l'obtention de ces matériels implique un travail considérable, et le résultat n'est pas toujours celui espéré. Le C-banding permet dans bien des cas de repérer et d'isoler les plantes porteuses du chromosome étranger souhaité, et de vérifier la constance du fonds génétique de l'espèce acceptrice [41].

Il arrive aussi que, à partir d'hybrides entre espèces, on obtienne des individus « recombinants », souvent à la suite de réassortiments chromosomiques, que

l'on peut caractériser. Par exemple, les descendances de croisements entre triticales et blé ségrègent plus ou moins rapidement en familles de type triticales et familles de type blé, de compositions génomiques respectives ABR et ABD. Cependant, il arrive que l'on décèle des individus ne comportant pas les génomes R ou D « entiers » (7 chromosomes), mais seulement 6 éléments d'un génome et un de l'autre. C'est par exemple le cas d'une lignée de triticales développée par le CIMMYT (centre international pour l'amélioration du maïs et du blé) vers 1970, nommée Armadillo, qui comporte le chromosome 2D substitué au chromosome 2R. Cette substitution était intéressante car elle apportait une précocité plus grande

et l'insensibilité à la photopériode, caractères particulièrement utiles en situation intertropicale. Des études systématiques, réalisées sur des populations dérivées de ce genre de croisement et non soumises à des pressions de sélection, tendent à montrer [42] que les différentes substitutions R/D ne semblent pas équiprobables : pour des questions de viabilité (zygotique ou gamétique), de compétition pollinique, de fertilité des plantes porteuses, certaines substitutions sont plus fréquentes que d'autres. Cependant, globalement, l'obtention de plantes « multisubstituées » semble difficile.

Réciproquement, dans le blé, on connaît des génotypes porteurs de fragments de chromosomes de seigle,

d'*Agropyron* ou d'*Aegilops*, qui ont été introduits par recombinaison homéologue ou par translocation. Le plus connu de ces fragments est le bras court du chromosome 1R, qui remplace la partie homéologue du 1B, ce qui a abouti à la construction d'un chromosome composite 1B/1R. Ce chromosome est très facilement identifiable en *banding*, car il se différencie notablement du chromosome 1B « normal ». Les génotypes qui en sont porteurs, dérivant d'un croisement blé × seigle réalisé probablement au début de ce siècle, ont été retenus par la sélection pour leur résistance à diverses maladies, et aussi pour leur productivité et la stabilité de leurs performances agronomiques. Ce chromosome 1B/1R se trouve par exemple dans Kaukaz, Aurora, Clément, Veery, etc., toutes variétés qui ont marqué leur époque. Cette translocation s'accompagne de deux autres particularités : d'une part, elle affecte beaucoup la qualité technologique car le segment « seigle » porte un *locus* codant pour certaines protéines de réserve qui sont très défavorables à ce caractère ; d'autre part, elle semble favoriser fortement les processus de régénération des embryoides obtenus par culture *in vitro* des anthères : 60 à 80 % des plantes régénérées (haploïdes, puisque provenant de microspores) sont porteuses du chromosome transloqué 1B/1R [43]. En revanche, ce chromosome semble se transmettre moins facilement par voie sexuée ; en F₂ d'un croisement étudié au laboratoire, les individus hétérozygotes 1B-1B/1R et homozygotes 1B sont sur-représentés, les individus homozygotes 1B/1R sous-représentés.

Un autre exemple où le *banding* a apporté d'intéressantes informations est celui des triticales tétraploïdes. Il s'agit de triticales à 28 chromosomes, généralement dérivés d'hybrides triticales 6x × seigle ; ces triticales comportent 2 × 7 chromosomes de seigle, et 2 × 7 chromosomes de blé, provenant indifféremment des génomes A et B. Ce dernier ensemble, désigné par le terme de « mixogénome », comporte 2⁷ = 128 modalités possibles (sans compter les cas de recombinaison homéologue intrachromosomique). Or, contrairement à ce qui est observé dans

le cas des mixogénomes R/D, précédemment évoqués, ces 128 combinaisons semblent relativement équiprobables, pour autant que l'on s'en réfère aux données actuelles [45] ; il est donc difficile, pour une simple question de probabilités, d'obtenir une composition chromosomique homogène, de type AA RR ou BB RR [46]. Cela démontre que les chromosomes A et B sont largement interchangeable et confirme la proximité de leurs contenus génétiques. Des cas analogues démontrent que les chromosomes du génome D du blé tendre sont également facilement substituables aux éléments homéologues de A et B.

Observations en méiose

Les techniques de *banding* chromosomique sont parfaitement applicables sur des cellules en méiose (notamment cellules mères de pollen, facilement accessibles). De telles observations permettent d'estimer, pour une paire de chromosomes donnée, identifiable, les fréquences d'appariement, par observation des « chiasmas », définis au niveau cytologique, visibles en métaphase I. Cela est susceptible d'apporter des informations intéressantes, aussi bien en situation d'homologie que d'homéologie.

Il est par exemple connu que les triticales, et notamment les triticales primaires, directement issus du croisement entre blé et seigle, ont des comportements méiotiques beaucoup plus irréguliers que ceux de leurs parents, avec présence de nombreux chromosomes non appariés (univalents). Des analyses en *C-banding* permettent de voir que ces univalents correspondent majoritairement aux chromosomes de seigle [47]. Il est donc clair que la coexistence dans une même structure des deux génomes blé et seigle entraîne des dysfonctionnements au niveau des possibilités d'appariement des chromosomes, même homologues. En revanche, il est possible de sélectionner des plantes présentant des niveaux d'appariement chromosomique beaucoup plus élevés.

Dans des hybrides entre espèces peu-

vent s'établir des échanges entre chromosomes homéologues, cytologiquement décelables. Ces renseignements sont précieux, dans la mesure où l'on ne peut déduire *a priori* de données purement génétiques, biochimiques ou même moléculaires, les possibilités d'échanges génétiques entre espèces. Par exemple, chez les Triticinées, les génomes « élémentaires » A, B, D, R (et autres), sont très proches quant à leur contenu génétique et leur organisation générale. Or, l'observation des figures d'appariements chromosomiques conduit à des résultats assez contrastés. Par exemple, dans les confrontations D-R, observables dans les hybrides *T. tauschii* × seigle ou triticales × blé tendre, il n'apparaît presque jamais de figure d'appariement [39].

Un cas intéressant est celui d'hybrides blé × seigle comportant ou non le gène *Ph1*, régulateur des appariements chromosomiques chez le blé [48]. Le nombre de chromosomes appariés est plus important chez les hybrides qui n'ont pas le gène *Ph1* (5 à 6 bivalents en moyenne, au lieu de 1 ; présence de trivalents). On pourrait donc penser que l'élimination de ce gène a favorisé les appariements entre chromosomes de seigle et de blé. En fait, un examen en *banding* permet de constater que l'augmentation des appariements est essentiellement le fait d'associations entre chromosomes de blé (A, B et D), plutôt qu'entre ceux du seigle et du blé. De même, dans les hybrides triticales 6x × seigle comportant le gène *Ph1*, on constate l'existence d'appariements A-B assez fréquents [49] ; ce phénomène démontre que le génome R porte lui-même des systèmes de contrôle des échanges entre chromosomes qui, dans certaines situations génétiques, peuvent inhiber l'action du gène *Ph1* et favoriser l'appariement entre homéologues. De tels systèmes, plus ou moins puissants, ont été mis en évidence chez nombre d'espèces diploïdes voisines du blé, notamment certains *Aegilops*, *Agropyron*, etc. Cela suggère que l'existence du *locus Ph* est antérieure à la formation du blé, et que l'allèle *Ph1* a été sélectionné parce qu'il conférerait un avantage sélectif important

aux plantes qui en étaient porteuses. L'observation de méioses d'hybrides permet aussi d'apprécier le degré de divergence entre génomes désignés par une même lettre, donc supposés communs, et présents dans différentes espèces (par exemple, « A » de *Triticum monococcum* et « A » du blé tendre). L'analyse en *C-banding* des d'hybrides blé tendre × *T. monococcum* (Tableau I) montre que l'affinité est loin d'être la même pour les différents couples de chromosomes : pour certains, les fréquences d'appariement sont très élevées (60-70 %) ; pour d'autres, quasiment nulles [50]. Cela suggère soit que les génomes « A » ont fortement divergé depuis la formation de l'espèce blé tendre, et que cette divergence n'a pas eu la même vitesse pour tous les chromosomes, soit que le génome A du blé tendre comporte en fait des chromosomes qui ne proviennent pas du génome A ancestral, mais d'un autre.

On ne peut certes pas inférer de telles données des conclusions sur les parentés et contenus génétiques entre génomes de différentes espèces, ce qui demande des analyses beaucoup plus fines. Cependant, de telles observations tendent à montrer que les divergences entre génomes sont vraisemblablement le fait d'éléments chromosomiques autres que les gènes de structure qui paraissent remarquablement conservés d'un génome à l'autre.

Hétérochromatine : quelles fonctions ?

Enfin, la possibilité de mettre cytologiquement en évidence l'hétérochromatine a ouvert le champ à certaines investigations sur le rôle qu'elle pourrait jouer dans l'expression de certains caractères.

Concernant le triticales, par exemple, la littérature — notamment américaine — abonde sur le rôle possible de l'hétérochromatine dans l'échaudage du grain ; ce phénomène se manifeste par la production de grains plus ou moins ridés, parfois presque réduits aux seules enveloppes ; il est dû à la destruction des réserves, essen-

Chromosome	2 univalents	1 bivalent	
		droit	anneau
1A	38	66	16
2A	39	51	18
3A	29	75	6
4A	120	0	0
5A	16	98	3
6A	57	63	0
7A	24	28	68

tiellement amylacées, au fur et à mesure de leur formation, par action des amylases qui restent actives pendant la période de maturation. Des auteurs [51] ont montré qu'il y avait chez ces plantes, au début de la formation de l'albumen dont la structure est d'abord syncytiale, de nombreuses anomalies dans les divisions nucléaires (ponts chromatiques, noyaux aneuploïdes en forte proportion, etc.). Ces auteurs ont cru pouvoir établir des relations entre ces anomalies, la présence de blocs hétérochromatiques importants provenant du seigle, et l'intensité de l'échaudage. Actuellement, il est pratiquement démontré, par suite des progrès de la sélection contre ce caractère, et d'études génétiques, que ces phénomènes sont indépendants les uns des autres : il n'apparaît pas de relation de cause à effet entre importance des zones hétérochromatiques et échaudage [52]. Un autre thème a été celui de possibles relations entre le régime de reproduction des espèces et la position des zones hétérochromatiques. Sur ce point, il a été signalé précédemment les différences existant entre blé, orge et seigle : blé et orge sont à prédominance autogame — surtout les types cultivés —, le seigle est strictement allogame (auto-incompatible). Le triticales, issu de l'hybridation entre blé et seigle, est lui-même à prédominance autogame. Certains auteurs [51] ont constaté une varia-

bilité de l'importance des zones hétérochromatiques du seigle dans un contexte triticales ; ils ont tenté de démontrer que cette importance décroissait au fur et à mesure de progrès de la sélection chez le triticales, qui se traduisent par une productivité plus élevée, un comportement méiotique plus régulier, une fertilité d'épi plus grande, une tendance à l'« autogamisation », etc. [45]. D'autres auteurs ont cherché à étudier ce phénomène sous l'angle génétique, notamment par l'analyse d'hybrides obtenus dans des systèmes de croisements orthogonaux ; ils n'ont pas relevé l'existence d'une tendance particulière vers une diminution ou une augmentation de telle ou telle zone hétérochromatique. En revanche, il a été mis en évidence [35] que certaines bandes — généralement mineures — présentes chez les parents blé et seigle pouvaient être absentes chez les hybrides. Cela suggère l'existence, comme pour d'autres systèmes génétiques (par exemple, *locus NOR*), de phénomènes d'interactions pouvant inhiber l'expression de certaines de ces bandes. Celles-ci ne seraient donc pas des entités structurales figées et immuables, mais seraient sous la dépendance — individuellement — d'un contrôle génétique plus ou moins complexe déterminant une conformation particulière du chromosome dans une région particulière.

Un autre point — qui n'est pas tota-

lement étranger au précédent —, et sur lequel la littérature en cytogénétique végétale abonde, concerne les relations entre appariements chromosomiques (formation et terminalisation des chiasmata), échanges génétiques et localisation des zones hétérochromatiques. Globalement, il apparaîtrait que les zones hétérochromatiques joueraient un rôle dans les phénomènes d'appariement des chromosomes au cours des phases précoces de la méiose, mais seraient aussi des zones « interdites à la recombinaison ». Sur triticales, Merker [53] a montré que, pour une paire de chromosomes donnée, il y a échec d'appariement plus fréquemment chez les individus hétérozygotes (+ -) pour la présence d'une bande C télomérique, que chez les homozygotes (- -) ou (+ +). Par ailleurs, Gillies et al. [54] ont montré sur seigle que l'élaboration du complexe synaptonémal chez un individu hétérozygote pour une zone télomérique hétérochromatique se faisait de façon dissymétrique (élaboration inégale des éléments latéraux). Dans ces différents cas, il est difficile de conclure si le déficit d'appariement constaté traduit un rôle fonctionnel de l'hétérochromatine dans les mécanismes d'appariement entre chromosomes, ou si celui-ci résulte simplement d'une hétérozygotie structurale locale (toute délétion étant susceptible d'entraîner le même effet). Pourtant, il apparaît clair, à partir des études de recombinaison rendues possibles par l'existence de marqueurs de plus en plus nombreux (RFLP notamment), que le centimorgan chez le blé ou le seigle peut correspondre à une quantité de paires de bases extrêmement variable (de quelques mégabases à plusieurs centaines de mégabases) ; et que les zones où les phénomènes de recombinaison sont peu intenses semblent correspondre aux zones chromosomiques fortement chargées en hétérochromatine. Il semble se dégager de tout cela un ensemble cohérent qui mérite des vérifications expérimentales rendues possibles par la disponibilité en marqueurs moléculaires saturant les cartes génétiques.

Il est donc clair que les techniques de

banding chromosomique ne constituent qu'un élément d'approche de la structure du génome végétal et qu'elles n'ont, notamment, pas de valeur explicative quant à son fonctionnement. Cependant, les quelques exemples précédemment évoqués montrent qu'elles sont susceptibles d'apporter beaucoup dans certains domaines : meilleure connaissance de la structure et de la variabilité du génome au niveau intraspécifique, participation à l'élaboration d'une cartographie physique, contribution à des études de taxonomie, caractérisation d'hybrides interspécifiques et d'introgessions d'une espèce dans une autre, etc. Elles doivent naturellement ouvrir le chemin et être associées à d'autres techniques relevant de la biochimie, de la biophysique, de la biologie moléculaire, pour parvenir à mieux comprendre l'organisation du chromosome des végétaux supérieurs, son fonctionnement, et le rôle que peuvent avoir certaines zones particulières dans certaines fonctions cellulaires et tissulaires spécifiques.

Enfin, les techniques d'observation des chromosomes continuent d'évoluer, suivant des axes qui ont été évoqués dans l'article de Popescu [9]. Par exemple, dans le domaine végétal, de même que dans le règne animal, la possibilité d'utiliser l'hybridation *in situ* permet d'acquérir de nouvelles informations, différentes selon que l'on s'adresse à des sondes « séquences uniques » ou « séquences répétées », certaines d'entre elles pouvant être spécifiques d'un génome élémentaire ou d'un chromosome. On a pu ainsi déjà caractériser la présence d'éléments chromosomiques de seigle dans le blé, ou d'éléments du génome D dans le blé dur.

La conjonction de l'ensemble de ces techniques permet d'affiner nos capacités d'observation et nos systèmes d'analyse, pour une meilleure compréhension des mécanismes évolutifs et du fonctionnement du génome végétal ■

M. Bernard : directeur de recherche à l'INRA.
S. Bernard : chargée de recherche à l'INRA. Laboratoire d'amélioration des plantes, INRA, 63039 Clermont-Ferrand Cedex, France.

Références

1. Caspersson T, Zech L, Modest E, Foley GE, Wagh U, Simonsson E. DNA binding fluorochromes for the study of the organization of the metaphase nucleus. *Exp Cell Res* 1969 ; 58 : 141-52.
2. Pardue ML, Gall JG. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 1970 ; 168 : 1356-8.
3. Arrighi FE, Hsu TC. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 1971 ; 10 : 81-6.
4. Dutrillaux B, Lejeune J. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *CR Acad Sc Paris* 1971 ; 272 : 2638-40.
5. Distèche C, Hausman-Hagemeyer AM, Frederic J. Enregistrements détaillés des courbes de distribution de la fluorescence des chromosomes humains, par une application nouvelle de microdensitométrie. *CR Acad Sc Paris* 1971 ; 273 : 92-4.
6. Vosa CG. The quinacrine-fluorescence patterns of the chromosomes of *Allium carinatum*. *Chromosoma* 1971 ; 33 : 382-5.
7. Vosa CG, Marchi P. Quinacrine fluorescence and Giemsa staining in plants. *Nature-New Biology* 1972 ; 191-2.
8. Gerlach WL. N-banded karyotypes of wheat species. *Chromosoma* 1977 ; 49 : 357-70.
9. Popescu CP. La cytogénétique des animaux d'élevage. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : IX.
10. Natarajan AT, Natarajan S. The heterochromatin of *Rhoeo discolor*. *Hereditas* 1972 ; 72 : 323-30.
11. Filion GF. Differential Giemsa staining in plants. I - Banding patterns in three cultivars of *Tulipa*. *Chromosoma* 1974 ; 49 : 51-60.
12. Schweizer D. Differential staining of plant chromosomes with Giemsa. *Chromosoma* 1973 ; 40 : 307-20.
13. Fiskesjö G. Two types of constitutive heterochromatin made visible in *Allium* by a rapid C-banding method. *Hereditas* 1974 ; 78 : 153-6.
14. Schweizer D. An improved Giemsa C-banding procedure for plant chromosomes. *Experientia* 1974 ; 30 : 570-1.
15. Merritt JF, Burns JA. Chromosome banding in *Nicotiana glauca* without denaturation and renaturation. *The Journal of Heredity* 1974 ; 65 : 101-3.
16. Linde-Laursen I, Von Bothmer R, Jacobsen N. Giemsa C-banded karyotypes of South and Central American Hordeum (*Poaceae*). *Hereditas* 1990 ; 112 : 93-107.

Références

17. Ward EJ. Banding patterns in maize mitotic chromosome. *Can J Genet Cytol* 1980 ; 22 : 61-7.
18. Endo TR, Gill BS. The heterochromatin distribution and genome evolution in diploid species of *Elymus* and *Agropyron*. *Can J Genet Cytol* 1984 ; 26 : 669-78.
19. Park CM, Kim NS, Walton PD. The Giemsa C-banded karyotype of Canada Wildrye (*Elymus canadensis*). *Plant Breeding* 1990 ; 104 : 248-51.
20. Sarma NP, Natarajan AT. Identification of heterochromatic regions in the chromosomes of rye. *Hereditas* 1973 ; 74 : 233-8.
21. Gill BS, Kimber G. The Giemsa C-banding karyotype of rye. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974 ; 71 : 1247-9.
22. Gill BS, Kimber G. Giemsa C-banding and the evolution of wheat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974 ; 71 : 4086-90.
23. Merker A. A Giemsa technique for rapid identification of chromosomes in Triticale. *Hereditas* 1973 ; 75 : 280-2.
24. Dvorak J. The origin of wheat chromosomes 4A and 4B and their genome reallocation. *Can J Genet Cytol* 1983 ; 25 : 210-4.
25. Dvorak J, Resta P, Kota RS. Molecular evidence on the origin of wheat chromosomes 4A and 4B. *Genome* 1989 ; 33 : 30-9.
26. Sybenga J. Rye chromosome nomenclature and homology relationships. Workshop report. *Z. Pflanzenzücht* 1983 ; 90 : 297-304.
27. Schlegel R, Melz G, Mettin D. Rye cytology, cytogenetics and genetics. Current status. *Theor Appl Genet* 1986 ; 72 : 721-34.
28. Naranjo T. Chromosome structure of durum wheat. *Theor Appl Genet* 1990 ; 79 : 397-400.
29. Sharp PJ, Chao S, Desai S, Gale MD. The isolation, characterization and application in the triticeae of a set of wheat RFLP probes identifying each homocologous chromosome arm. *Theor Appl Genet* 1989 ; 78 : 342-8.
30. Endo TR, Mukai Y. Chromosome mapping of a speltoid suppression gene of *Triticum aestivum* L. based on partial deletions in the long arm of chromosome 5A. *Jpn J Genet* 1988 ; 63 : 501-5.
31. Wang ML, Atkinson MD, Chinoy CN, et al. RFLP-based genetic map of rye (*Secale cereale* L.) chromosome 1R. *Theor Appl Genet* 1991 ; 82 : 174-8.
32. Zeller FJ, Kimber G, Gill BS. The identification of rye trisomics by translocations and Giemsa staining. *Chromosoma* 1977 ; 62 : 279-89.
33. Friebe B, Kim NS, Kuspira J, Gill BS. Genetic and cytogenetic analyses of the A genome of *Triticum monococcum*. VI Production and identification of primary trisomics using the C-banding technique. *Genome* 1990 ; 33 : 542-55.
34. Friebe B, Heun M. C-banding pattern and powdery mildew resistance of *Triticum ovatum* and four *T. aestivum*-*T. ovatum* chromosome addition lines. *Theor Appl Genet* 1989 ; 78 : 417-24.
35. Jouve N, Galindo C, Maesta M, et al. Changes in triticales chromosome heterochromatin visualized by C-banding. *Genome* 1989 ; 32 : 735-42.
36. Cadalen T. Étude du polymorphisme de lignées de substitution intervariétale chez le blé tendre (*Triticum aestivum*) par les techniques de C-banding et de RFLP. DEA Université de Clermont-Ferrand II, 1991 : 35.
37. Cai Q, Bullen MR. Characterization of genomes of timothy (*Phleum pratense* L.). I Karyotypes and C-banding patterns in cultivated timothy and two wild relatives. *Genome* 1991 ; 34 : 52-8.
38. Zhang Z, Li M. Comparative studies on karyotypes and Giemsa C-banding patterns of 8 subspecies (type) in maize. *Chinese J Genet* 1989 ; 17 : 15-24.
39. Bernard S, Bernard M. Creating new forms of 4x, 6x and 8x primary triticales associating both complete R and D genomes. *Theor Appl Genet* 1987 ; 74 : 55-9.
40. Bernard S, Jewell DC. Crossing maize with sorghum, *Tripsacum* and millet : the products and their level of development following pollination. *Theor Appl Genet* 1985 ; 70 : 474-83.
41. Darvey NL, Gustafson JP. Identification of rye chromosomes in wheat-rye addition lines and triticales by heterochromatin bands. *Crop Sci* 1975 ; 15 : 239-43.
42. Lukaszewski AJ, Gustafson JP. Translocations and modifications of chromosomes in triticales x wheat hybrids. *Theor Appl Genet* 1983 ; 64 : 239-48.
43. Henry Y, de Buyser J. Effect of the 1B/1R translocation on anther culture ability in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports* 1985 ; 4 : 307-10.
44. Bernard M, Bernard S. Meiotic pairing in hybrids between tetraploid Triticales and related species : new elements concerning the chromosome constitution of tetraploid Triticales. *Theor Appl Genet* 1985 ; 70 : 390-9.
45. Lukaszewski AJ, Gustafson JP. Cytogenetics of Triticales. *Plant Breeding Reviews* 1987 ; 5 : 41-93.
46. Baum M, Lelley T. A highly efficient, rapid method to produce 4x triticales. In : Schlenker G, ed. *Proc of the IV EUCARPIA Triticale Meeting*. Schwerin, 1988 : 199-207.
47. Galindo C, Jouve N. C-banding in meiosis : an approach to the study of wheat and rye genome interactions in triticales. *Genome* 1989 ; 32 : 1074-8.
48. Fominaya A, Jouve N. C-banding at meiosis as a means of analyzing cytogenetics structure in wheat. *Can J Genet Cytol* 1985 ; 27 : 689-96.
49. Bernard M, Saigone B. Study of some genetic factors promoting homocologous chromosome pairing in wheat x rye hybrids. In : Bernard M, Bernard S, eds. *Proc of the III EUCARPIA Meeting on Triticales*. Clermont-Ferrand : INRA, 1985 : 83-96.
50. Gonzalez JM, Bernard M, Bernard S. Métaphase I analysis of *Triticum aestivum* x *T. monococcum* hybrid by C-banding technique. 1992 (soumis pour publication.)
51. Gustafson JP, Bennett MD. The effect of telomeric heterochromatin from *Secale cereale* L. on triticales (*X-Triticosecale* Wittmack). *Can J Genet Cytol* 1982 ; 24 : 83-100.
52. Papa CM, Morris R, Schmidt JW. Rye C-banding patterns and meiotic stability of hexaploid triticales (*X-Triticosecale*) selections differing in kernel shriveling. *Genome* 1990 ; 33 : 686-9.
53. Merker A. The cytogenetic effect of heterochromatin in hexaploid triticales. *Hereditas* 1976 ; 83 : 215-22.
54. Gillies CB, Lukaszewski AJ. Synaptonemal complex formation in rye (*Secale cereale*) heterozygous for telomeric C-bands. *Genome* 1989 ; 32 : 901-7.

Summary
Differential staining techniques of plant chromosomes : development and applications to karyotypes and chromosome structures, species identification and genome relationships

Differential staining techniques have been developed on plant chromosomes since the early seventies. Currently the Giemsa C-banding technique, revealing constitutive heterochromatin bands, is the most commonly used ; it can be applied to both mitotic and meiotic chromosomes. In some groups of species, such as the Triticeae, where chromosomes are quite large and easy to observe, banding techniques have significantly increased knowledge in cytogenetic analysis : chromosome organisation of the genome, variations in chromosome number and structure, possible genetic introgression between species, relationships between diploids and polyploids within the same genus, analysis of hybrid progenies. The development and identification of aneuploid stocks facilitates chromosome mapping, especially with the help of molecular markers : comparison of physical and genetic maps reveals large discrepancies, which raise in new terms the question of chromosome heterogeneity, and of the function of chromosome regions apparently locating coding sequences.