

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane Mira de Béjaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie des Organismes et des Populations

Mémoire de Magister

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie
Option : Biologie de la Conservation et Ecodéveloppement

Présenté par :

M^{elle} Benmouhoub Hassina

Thème :

Analyse d'hybrides F₁ et F₂ intra- et/ou interspécifiques chez *Medicago polymorpha* L., *M. intertexta* (L.) Miller, *M. ciliaris* (L.) Krockner, *M. arabica* (L.) Hudson, *M. orbicularis* (L.) Bartal. et *M. minima* (L.) Bartal.: interprétation taxogénétique.

Devant le Jury :

Présidente	: Pr. Djamila SADOUN	(Prof. Univ. Béjaïa)
Rapporteur	: Pr. Aïssa MOALI	(Prof. Univ. Béjaïa)
Co- Rapporteur	: Dr. Mohamed SAHNOUNE	(M. C. Univ. Béjaïa)
Examineur	: Dr Djebbar ATMANI	(M. C. Univ. Béjaïa)
Examineur	: Dr Mokrane IGUER-OUADA	(M. C. Univ. Béjaïa)

Septembre 2007

A mes parents et mes grands parents.

Remerciements

Au terme de ce modeste travail, je tiens à remercier vivement :

- Monsieur MOALI Aïssa., Professeur à l'université A. Mira d'avoir accepté mon encadrement.
- Monsieur SAHNOUNE Mohamed, Maître de conférences à l'université A. Mira pour avoir accepté de m'encadrer ainsi que pour son aide, sa disponibilité, son suivi, ses conseils et orientations.
- Madame SADOUD Djamila., Professeur à l'université A. Mira de Béjaïa qui a sans hésiter nous a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de soutenance de ce modeste travail.
- Monsieur IGUER-OUADA Mokrane, Maître de conférences à l'université A. Mira de Béjaïa qui a aimablement accepté de juger ce modeste travail.
- Monsieur ATMANI Djebbar, Maître de conférences à l'université A. Mira de Béjaïa qui a avec intérêt accepté de porter son jugement sur nos modestes résultats.
- Nous tenons aussi à exprimer notre gratitude à Mme ZEBBOUDJ Aïcha et M. BOUADAM Saïd, respectivement Maître de conférences et Chargé de cours à l'Université A. Mira de Béjaïa de nous avoir permis d'utiliser la salle de manipulation n° 17 pour nos cultures au laboratoire.
- Nous tenons aussi à remercier M. ADJAOUUD Abdennour, Maître-assistant à l'Université A. Mira de Béjaïa, d'avoir pris soin de nos plantes au Labo.17 et pour la prise de certaines de nos microphotographies. Nous remercions également M^{me} DJAFRI-BOUALLAG. et M. BENZAÏD Karim, Maître-assistants à l'Université A. Mira de Béjaïa, de nous avoir généreusement permis d'utiliser leurs appareils à photos.

Enfin je tiens à remercier tous ceux et toutes celles qui, de près ou de loin, m'ont soutenue et aidée pendant la réalisation de ce travail.

Sommaire

Introduction	1
1/ Partie théorique	3
1/ Cycles de développement et évolution de l'appareil reproducteur chez les plantes terrestres....	3
1.1/ Les différents cycles de reproduction.....	3
1.1.1/ Chez l'algue verte Chlamydomonas.....	3
1.1.2/ Chez l'algue verte Ulva (laitue de mer).....	4
1.1.3/ Chez la bryophyte Polytric : <i>Potrichum juniperium</i>	4
1.1.4/ Chez la ptéridophyte filicophyte : <i>Polypodium vulgare</i> L.....	5
1.1.5/ Chez le gymnosperme préspermaphyte : <i>Cycas</i>	6
1.1.6/ Chez les gymnospermes spermaphytes : les conifères.....	7
1.1.7/ Chez les Angiospermes.....	8
1.2/ Evolution de l'appareil reproducteur des Algues jusqu'aux Angiospermes.....	9
1.3/ Rappel sur les organes reproducteurs : la fleur.....	17
1.3.1/ Organisation schématique d'une fleur.....	17
1.3.2/ Gamétogenèse chez les Angiospermes.....	17
1.3.2.1/ Méiose et microgamétogénèse.....	18
1.3.2.2/ Méiose et macrogamétogénèse.....	19
1.3.2.3/ Anomalies de la méiose.....	20
1.3.2.3.1/ La ségrégation chromosomique irrégulière.....	20
1.3.2.3.2/ La viscosité des chromosomes.....	20
1.3.2.3.3/ La cytomixie.....	20
1.3.2.3.4/ La formation de syncyte.....	20
1.4/ Les modes de reproduction chez les plantes.....	21
1.4.1/ La reproduction asexuée.....	21
1.4.1.1/ L'apomexie gamétophytique.....	21
1.4.1.1.1/ La diplosporie.....	21
1.4.1.1.2/ L'aposporie.....	21
1.4.1.2/ L'apomixie sporophytique (ou l'embryon adventif).....	21
1.4.2/ La reproduction sexuée.....	22
1.4.2.1/ Les stratégies liées au mécanisme de pollinisation.....	22
1.4.2.1.1/ L'autogamie.....	22
1.4.2.1.2/ L'allogamie.....	22
1.4.2.1.2.1/ Les facteurs favorisant l'allopollinisation.....	23
1.4.2.1.2.1.1/ Les facteurs morpho-anatomiques.....	23
1.4.2.1.2.1.2/ Les facteurs physiologiques.....	23
1.4.2.1.2.1.3/ Les facteurs génétiques.....	23
1.4.2.2/ Les stratégies liées au mécanisme de fécondation.....	25
1.5/ Le déterminisme du sexe chez les Angiospermes.....	26
1.5.1/ Les facteurs complémentaires du déterminisme du sexe.....	27
1.5.1.1/ Le déterminisme génétique.....	27
1.5.1.2/ Les facteurs environnementaux.....	27
1.5.1.3/ Les facteurs internes.....	27
1.6/ Les techniques d'hybridation chez les plantes à fleurs.....	28
1.6.1/ L'hybridation par voie sexuée <i>in vivo</i>	28
1.6.1.1/ La castration.....	28
1.6.1.1.1/ La castration manuelle.....	28
1.6.1.1.2/ La castration par aspiration.....	29

1.6.1.1.3/ La castration par traitement à l'eau.....	29
1.6.1.1.4/ La castration par traitement à l'alcool.....	29
1.6.1.1.5/ La castration par des agents gamétocides.....	29
1.6.1.1.6/ La castration génétique.....	29
1.6.1.2/ L'ensachage.....	29
1.6.1.3/ La pollinisation.....	30
1.6.1.3.1/ La pollinisation manuelle.....	30
1.6.1.3.2/ La pollinisation par le vent.....	30
1.6.1.3.3/ La pollinisation entomogame.....	30
1.6.1.4/ L'étiquetage.....	30
1.6.2/ Les techniques d'hybridation sexuée <i>in vitro</i>	30
1.6.2.1/ Les méthodes de pollinisation.....	30
1.6.2.2/ Les méthodes de cultures.....	31
1.6.2.2.1/ Les milieux de cultures.....	31
1.6.2.2.2/ La méthode de culture d'embryon.....	32
1.6.3/ Hybridation somatique.....	32
1.6.3.1/ La préparation des protoplastes.....	32
1.6.3.2/ Les méthodes de fusion.....	33
1.6.3.2.1/ La méthode chimique.....	33
1.6.3.2.2/ La méthode physique.....	33
1.6.3.3/ Les produits de fusion.....	33
1.6.3.4/ Sélection et identification des produits de fusion.....	34
1.7/ Les hybridations dans le genre <i>Medicago</i>	35
1.7.1/ La biologie florale.....	35
1.7.2/ Les barrières d'isolement reproducteur et flux de gènes chez <i>Medicago</i>	36
1.7.3/ Les croisements réalisés dans le genre <i>Medicago</i>	38
1.7.3.1/ Les croisements réalisés <i>in vivo</i>	38
1.7.3.1.1/ Dans la section des <i>Intertextae</i>	38
1.7.3.1.2/ Dans la section des <i>Pachyspirae</i>	40
1.7.3.1.3/ Dans la section des <i>Leptospirae</i>	41
1.7.3.2/ Les hybrides obtenus par culture d'embryon <i>in vitro</i>	43
1.7.3.3/ Les hybrides obtenus par hybridation somatique.....	44
2/ Matériel et méthodes.....	47
2.1/ Réalisation des croisements.....	47
2.1.1/ Origine du matériel végétal.....	47
2.1.2/ Mise en culture de la génération parentale.....	47
2.1.3/ Les marqueurs génétiques.....	48
2.1.4/ La pureté des individus utilisés comme parents dans les croisements.....	48
2.1.5/ La technique de déstamination et de pollinisation.....	48
2.1.5.1/ La déstamination.....	48
2.1.5.1.1/ La déstamination manuelle.....	48
2.1.5.1.2/ La déstamination par traitement à l'alcool.....	48
2.1.5.2/ La pollinisation.....	48
2.2/ La culture de la génération F ₁ et F ₂ des hybrides.....	49
2.2.1/ Le Matériel végétal.....	49
2.2.1.1/ Les hybrides F ₁ des croisements réalisés au laboratoire.....	49
2.2.1.2/ Les hybrides F ₂	49
2.2.2/ La mise en culture.....	49
2.2.2.1/ La mise en culture de la première génération F ₁	49
2.2.2.2/ La mise en culture de la deuxième génération F ₂	49

2.3/ La fertilité pollinique.....	50
2.3.1/ L'origine du matériel végétal.....	50
2.3.2/ La technique d'étude de la fertilité pollinique.....	51
2.3.3/ La technique de coloration des grains de pollen.....	51
2.3.4/ L'évaluation du taux de fertilité pollinique.....	52
2.4/ Analyse statistique.....	52
2.5/ L'analyse de la méiose.....	52
2.5.1/ La préparation des solutions.....	52
2.5.1.1/ Le fixateur.....	52
2.5.1.2/ Le colorant.....	53
2.5.2/ Le matériel végétal à observer.....	53
2.5.3/ Les principales étapes de l'analyse de la méiose.....	53
2.5.3.1/ Le prélèvement et la fixation.....	53
2.5.3.2/ L'hydrolyse à HCl.....	53
2.5.3.3/ Le choix des boutons floraux.....	53
2.5.3.4/ La coloration.....	53
2.5.3.5/ L'observation.....	54
2.6/ La photographie.....	54
3/ Résultats et discussions.....	55
3.1/ Analyse des croisements.....	55
3.1.1/ Cas de <i>Medicago polymorpha</i>	55
3.1.1.1/ Analyses des croisements intraspécifiques de <i>M. polymorpha</i> à tache noire au centre des folioles et <i>M. polymorpha</i> à tache brune à la base des folioles.....	55
3.1.1.1.1/ Analyse de la F ₁ des croisements intraspécifiques de <i>Medicago polymorpha</i>	55
3.1.1.1.1.1/ Analyse morphologique de la F ₁ des croisements intraspécifiques de <i>M. polymorpha</i>	55
3.1.1.1.1.2/ Analyse de la fertilité pollinique de la F ₁ des croisements intraspécifiques chez <i>M. polymorpha</i>	56
3.1.1.1.2/ Analyse de la F ₂ des croisements intraspécifiques de <i>M. polymorpha</i>	57
3.1.1.1.2.1/ Analyse du déterminisme génétique des états de caractères des taches sur les folioles.....	57
3.1.1.1.2.1.1/ Analyse du déterminisme des états de caractère "tache noire" et "sans tache noire".....	57
3.1.1.1.2.1.2/ Analyse du déterminisme génétique des états de caractère "tache brune" et "sans tache brune".....	59
3.1.1.1.2.1.3/ Analyse combinée du déterminisme génétique des états de caractères "tache noire" et "tache brune".....	60
3.1.1.1.2.2/ Phénomène de nanisme chez les descendants F ₂ du croisement intraspécifique chez <i>M. polymorpha</i>	62
3.1.1.1.2.3/ Analyse de la fertilité pollinique de F ₂ des croisements intraspécifiques chez <i>M. polymorpha</i>	63
3.1.2/ Cas de <i>Medicago intertexta</i>	63
3.1.2.1/ Analyse du croisement intraspécifique de <i>Medicago intertexta</i> sans tache sur les folioles et aux stipules normales ♀ x <i>M. intertexta</i> à tache brune au centre des folioles et aux stipules foliacées ♂.....	63
3.1.2.1.1/ Analyse de la F ₁ du croisement intraspécifique de <i>Medicago intertexta</i>	63
3.1.2.1.1.1/ Analyse morphologique de la F ₁ du croisement intraspécifique de <i>Medicago intertexta</i>	63
3.1.2.1.1.2/ Analyse de la fertilité pollinique de la F ₁ du croisement intraspécifique de <i>Medicago intertexta</i>	65

3.1.2.1.2/ Analyse de la F ₂ du croisement intraspécifique chez <i>M. intertexta</i>	65
3.1.2.1.2.1/ Analyse du déterminisme génétique des états de caractère "tache brune" et sans "tache brune" au centre des folioles.....	65
3.1.2.1.2.2/ Analyse du déterminisme génétique des états de caractère "stipules normales" et "stipules foliacées".....	67
3.1.2.1.2.3/ Analyse combinée des caractères de tache sur les folioles et de type de stipules.....	70
3.1.2.1.3/ Analyse de la fertilité pollinique de la F ₂ du croisement intraspécifique <i>M. intertexta</i> sans tache, stipules normales ♀ x <i>M. intertexta</i> avec tache, stipules foliacées ♂.....	71
3.1.2.2/ Analyses des croisements interspécifiques entre <i>Medicago intertextata</i> et <i>M. ciliaris</i>	71
3.1.2.2.1/ Analyse des hybrides entre <i>Medicago intertextata</i> et <i>M. ciliaris</i>	71
3.1.2.2.1.1/ Analyse morphologique de la F ₁ du croisement <i>M. intertextata</i> ♀ x <i>M. ciliaris</i> ♂.....	74
3.1.2.2.1.2/ Analyse de la fertilité pollinique des hybrides F ₁ entre <i>Medicago intertextata</i> et <i>M. ciliaris</i>	76
3.1.2.2.1.3/ Analyse de la méiose des hybrides F ₁ entre <i>M. intertextata</i> et <i>M. ciliaris</i>	77
3.1.2.2.1.4/ Adaptabilité des hybrides F ₁ entre <i>M. intertextata</i> et <i>M. ciliaris</i>	79
3.1.2.2.1.5/ Flux de gènes entre <i>M. intertextata</i> et <i>M. ciliaris</i>	79
3.1.2.3/ Essai d'hybridation de <i>Medicago intertextata</i> et <i>M. ciliaris</i> avec <i>M. arabica</i> et <i>M. orbicularis</i>	80
3.1.3/ Analyse des croisements entre les morphotypes de <i>Medicago minima</i>	81
Conclusion	83
Références bibliographiques	86

Annexes

Liste des tableaux.	Page
Tab. 1 : Tableau récapitulatif des caractères reproducteurs et des homologies chez les plantes (Spichiger <i>et al.</i> , 2002). Modifiés.	16
Tab. 2 : Principaux cas de répartition des sexes existant chez les Angiospermes (Robert <i>et al.</i> , 1998).	26
Tab. 3 : Pourcentage des genres et des espèces appartenant aux principaux types de sexualité sporophytique (Yampolsky et Yampolsky, 1922 <i>in</i> Robert <i>et al.</i> , 1998).	26
Tab. 4 : Composition du milieu de culture de MMS (Milieu Muraschine et Skoog) (Robert <i>et al.</i> 1998).	31
Tab. 5 : Les différents échantillons d'espèces utilisées, leurs origines géographiques..	47
Tab. 6 : Les différents hybrides F ₁ et F ₂ cultivés au laboratoire et au champ.	50
Tab. 7 : Liste des échantillons analysés pour l'étude de la fertilité pollinique.	51
Tab. 8 : Les différents croisements réalisés et le nombre de gousses, de graines et les individus F ₁ obtenus dans les croisements intraspécifiques de <i>Medicago polymorpha</i> .	55
Tab. 9 : La fertilité pollinique des hybrides F ₁ entre le morphotype à tache noire et le morphotype à tache brune sur les folioles de <i>M. polymorpha</i> .	56
Tab. 10 : Effectifs des classes phénotypiques de la F ₂ du croisement <i>M. polymorpha</i> sans tache noire ♀ x <i>M. polymorpha</i> avec tache noire ♂ et son croisement réciproque.	58
Tab. 11 : Effectifs des classes phénotypiques de la F ₂ du croisement <i>M. polymorpha</i> à tache brune ♀ x <i>M. polymorpha</i> sans tache brune ♂.	59
Tab. 12 : Effectifs des classes phénotypiques du croisement <i>M. polymorpha</i> à tache brune ♀ x <i>M. polymorpha</i> ♂ à tache noire et son croisement réciproque.	60
Tab. 13 : La fertilité pollinique de la F ₂ entre le morphotype à tache noire et le morphotype à tache brune sur les folioles de <i>M. polymorpha</i> .	63
Tab. 14 : Nombres de gousses et de graines et les individus F ₁ obtenus après croisement intraspécifique chez <i>Medicago intertexta</i> .	64
Tab. 15 : Effectifs des classes phénotypiques de la F ₂ du croisement <i>M. intertexta</i> sans tache ♀ x <i>M. intertexta</i> à tache brune ♂.	66
Tab. 16 : Effectifs des classes phénotypiques de la F ₂ du croisement <i>M. intertexta</i> aux stipules normales ♀ x <i>M. intertexta</i> aux stipules foliacées ♂.	67
Tab. 17 : Effectifs des classes phénotypiques de la F ₂ du croisement <i>M. intertexta</i> sans tache sur les folioles et aux stipules normales ♀ x <i>M. intertexta</i> avec tache sur les folioles et aux stipules foliacées ♂.	70
Tab. 18 : Principaux caractères distinguant les hybrides interspécifiques F ₁ de leurs parents <i>M. intertexta</i> et <i>M. ciliaris</i> .	74
Tab. 19 : La fertilité pollinique des hybrides F ₁ entre <i>M. intertexta</i> et <i>M. ciliaris</i> .	76
Tab. 20 : Interprétation des métaphases I chez les hybrides F ₁ entre <i>M. intertexta</i> x <i>M. ciliaris</i> .	77
Tab. 21 : Essai de croisement de <i>Medicago intertexta</i> et <i>M. ciliaris</i> avec <i>M. arabica</i> et <i>M. orbicularis</i> .	80
Tab. 22 : Croisements entre morphotypes de <i>Medicago minima</i> et le nombre de gousses, de graines d'individus F ₁ obtenus.	81
Tab. 23 : La fertilité pollinique de la F ₁ et la F ₂ du croisement entre morphotypes de <i>Medicago minima</i> .	82

Liste des figures	Page
Fig. 1: Cycle de reproduction d'un Chlamydomonas isogame (Robert <i>et al.</i> , 1998).	3
Fig. 2: Cycle de reproduction de l'ulve (<i>Ulva lactuca</i>) (Robert <i>et al.</i> , 1998).	4
Fig. 3: Cycle de reproduction de <i>Potrichum juniperium</i> (Laberche, 1999).	5
Fig. 4: Cycle de reproduction des Filicophytes <i>Polypodium vulgare</i> L. (Laberche, 1999).	6
Fig. 5 : Cycle de reproduction d'un cycas (Laberche, 1999).	7
Fig. 6: Cycle de reproduction des Pinophytes (Spichiger <i>et al.</i> , 2002).	8
Fig. 7: Cycle de reproduction des Angiospermes (Spichiger <i>et al.</i> , 2002).	9
Fig. 8: Organes reproducteurs des Bryophytes (Guinard, 1989, 1998, Anonyme, 2006).	10
Fig. 9 : Gamétange des Ptéridophytes (Laberche, 1999 & anonyme, 2006).	11
Fig. 10 : Les sporophylles et sporanges des Ptéridophytes (Guinard, 1998 & Laberche, 1999)	12
Fig. 11 : Organes reproducteurs des Préspermaphytes : Cycas (a, b) et Ginkgo (c, d, e et f) (Guinard, 1998, Laberche, 1999 & anonyme, 2006).	12
Fig. 12 : ovule et organes gamétophytiques des préspermaphytes (Favre- Duchartre, 1970; Robert <i>et al.</i> , 1998; Guinard, 1998).	13
Fig. 13 : Grains de pollen des Préspermaphytes (Laberche, 1999 & anonyme, 2006).	14
Fig. 14 : Organes reproducteurs des Gymnospermes évolués Robert <i>et al.</i> , 1998; Guinard, 1998 & Laberche, 1999	14
Fig. 15 : Sporangies et gamétophytes des Angiospermes (Robert <i>et al.</i> , 1998 & Laberche, 1999).	15
Fig. 16 : Représentation schématique conventionnelle d'une fleur régulière ou actinomorphe par une coupe longitudinale, et un diagramme florale : cas de la Stellaire (<i>Stellaria Holostea oryophyllaceae</i>) (Pesson et Louveaux, 1984).	17
Fig. 17 : Schéma représentant les différentes étapes de la microgamétogénèse (Elrord et Stansfield, 2003).	18
Fig. 18 : Schéma représentant les différentes étapes de la macrogamétogénèse (Elrord et Stansfield, 2003).	19
Fig. 19 : Schéma montrant les différentes parties du pistil Chez Lis d'après Lord et Russell, 2002.	24
Fig. 20 : Coupe sagittale d'une fleur de luzerne (d'après Mc Gregor, 1976 in Pesson et Louveaux, 1984).	35
Fig. 21 : Le morphotype <i>M. polymorpha</i> à tache brune à la base des folioles et le morphotype <i>M. polymorpha</i> à tache noire au centre des folioles.	55
Fig. 22 : Histogramme de la fertilité pollinique de F ₁ du croisement <i>M. polymorpha</i> à tache noire ♀ x <i>M. polymorpha</i> à tache brune ♂.	56
Fig. 23 : Méiose des parents de <i>M. polymorpha</i> à tache brune et <i>M. polymorpha</i> à tache noire	57
Fig. 24 : Variabilité de la taille des taches noire et brune sur les folioles de la F ₁ du croisement <i>M. polymorpha</i> à tache noire ♀ x <i>M. polymorpha</i> à tache brune ♂.	61
Fig. 25 : Nanisme chez les hybrides F ₂ du croisement <i>M. polymorpha</i> à tache brune ♀ x <i>M. polymorpha</i> à tache noire ♂.	62
Fig. 26 : Le morphotype <i>M. intertexta</i> avec tache brune au centre des folioles.	63
Fig. 27 : Le morphotype <i>M. intertexta</i> à tache brune au centre des folioles et aux stipules foliacées et le morphotype <i>M. intertexta</i> sans tache et aux stipules normales.	64
Fig. 28 : Méiose normale chez <i>Medicago intertexta</i>	65
Fig. 29 : Variabilité de la taille de la tache brune au centre des folioles dans la F ₂ du croisement <i>M. intertexta</i> avec tache ♀ x <i>M. intertexta</i> sans tache ♂.	67
Fig. 30 : <i>M. intertexta</i> en culture au champ.	72
Fig. 31 : <i>M. ciliaris</i> en herbier.	73
Fig. 32 : Insectes butinant sur les fleurs de <i>Medicago intertexta</i> .	74
Fig. 33 : La pilosité des gousses chez les parents et les hybrides F ₁ du croisement <i>M. intertexta</i> ♀ x <i>M. ciliaris</i> ♂.	75
Fig. 34 : Photographie des grains de pollen des hybrides F ₁ entre <i>M. intertexta</i> ♀ et <i>M. ciliaris</i> .	76
Fig. 35 : Anomalies associées aux méioses des hybrides entre <i>Medicago intertexta</i> et <i>M. ciliaris</i> .	78
Fig. 36 : Le morphotype <i>M. minima</i> avec grosses gousses et nervures principales pourpres et le morphotype <i>M. minima</i> avec petites gousses et nervures principales vertes.	81

Liste des abréviations

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ETS	: External Transcribed spacer
ITS	: Internal Transcribed spacer
GISH	: Genomic in situ hybridization
PEG	Polyéthylène glycol
RADP	: ADN polymorphe amplifié de façon aléatoire
RFLP	: Polymorphisme de Longueur des Fragments de restriction

Introduction générale

Introduction générale

L'hybridation désigne le croisement entre deux individus de sexes opposés. C'est en utilisant ce phénomène d'hybridation que Mendel a découvert ses différentes lois de transmission des caractères des parents aux descendants, jetant ainsi les bases de la génétique.

Dans la nature, l'hybridation constitue un des mécanismes de l'évolution. Elle s'oppose le plus souvent aux mécanismes d'isolement reproducteur. Les hybrides obtenus des croisements entre des types génétiquement très éloignés sont généralement stériles, et leur intérêt dans le mécanisme de l'évolution est très limité, mais peuvent être à l'origine de nouveaux allopolyploïdes fertiles. Ces derniers jouent un grand rôle dans la diversité des espèces. L'hybridation entre des types qui ne sont pas génétiquement très éloignés est à l'origine de la variabilité d'un grand nombre d'espèces. Ce cas est fréquent dans des zones d'hybridation entre deux sous-espèces allopatriques ou sympatriques.

En amélioration des plantes, l'hybridation constitue un moyen pour réunir deux génotypes différents pour créer de nouvelles variétés plus résistantes aux stress abiotiques (Wiegrefe et Berg, 2003) et/ou biotiques (e.g. champignons, insectes) (Dudits *et al.*, 1987 ; Sigareva et Earle, 1997 & Bauchan, 1987). Les nouvelles variétés sont créées aussi pour répondre aux besoins économiques, de point de vue rendement.

En taxonomie, l'hybridation est utilisée comme un outil expérimental d'identification entre les espèces étroitement apparentées, entre lesquelles les mécanismes d'isolement reproducteur reposent sur une stérilité ou une disparition partielle des hybrides. La production de la descendance sera une preuve de la relation entre les parents, et la stérilité sera une preuve de leur séparation et éloignement. Autrement dit, c'est la mise en application du concept biologique de l'espèce (Mayr, 1974) définissant celle-ci (l'espèce) comme un groupe d'individus effectivement ou potentiellement fertiles entre eux, mais reproductivement isolés d'autres groupes semblables. Si deux individus sont interfertiles, ils appartiennent à la même espèce; s'ils sont interstériles, ils appartiennent à deux espèces différentes ; s'ils sont partiellement interstériles, ils appartiennent à deux espèces en voie de séparation (sous-espèces).

L'isolement reproducteur constitue un critère de spéciation chez les organismes sexués parce qu'il s'oppose souvent aux flux de gènes entre les espèces végétales étroitement apparentées.

L'hybridation a fait l'objet de plusieurs études dans le genre *Medicago*, soit dans le but de l'amélioration de l'espèce la plus cultivée *M. sativa* (allogame) en la croisant avec d'autres espèces pérennes ou annuelles en utilisant l'hybridation sexuée, l'hybridation *in vitro* (Mc Coy et Smith, 1986) ou l'hybridation somatique (Tian et Rose, 1999 ; Pupilli *et al.*, 2001 ; Mizukami et

al., 2006) pour surmonter les barrières reproductives (incompatibilités) existant entre les espèces parentales, soit aussi dans le but de la taxonomie dans la détermination des rangs taxonomiques des taxa intraspécifiques ou interspécifiques morphologiquement très proches (Ledingham, 1940 ; Simon, 1965; Simon et Milligton, 1967; Lesins et Erac, 1968; Lesins *et al.*, 1971; Singh et Lesins, 1972; Lesins et Lesins, 1979; Lesins *et al.*, 1980 ; Sangduen *et al.*, 1983 & De Haan et Barnes, 1998).

Meziani (2002) et Messaoudi (2002) ont pu décrire quelques morphotypes nouveaux pour *Medicago polymorpha*, *M. minima*, *M. intertexta* et *M. ciliaris* dans la région de Béjaïa. Toutefois, dans ces précédentes études, les statuts taxonomiques de ces nouveaux morphotypes n'ont pas été déterminés. C'est pour combler cette lacune et compléter ces travaux précédents réalisés dans notre laboratoire que la présente étude a été entreprise. Il s'agit, en utilisant le critère d'interfertilité (application du concept biologique de l'espèce en réalisant des croisements) de tenter de mieux préciser les statuts taxonomiques de ces morphotypes tout en nous intéressant aux modes de transmissions des caractères « taches sur les folioles » et « type de stipules des folioles » et tout en analysant les méioses afin de relever les anomalies qui sont en relation avec l'état hybride et celles qui sont dues aux facteurs stressants du milieu.

N. B. Les différentes étapes de la reproduction chez *M. intertexta*, *M. ciliaris* et/ou *M. polymorpha* ont été observées et photographiées du stade cellules mères des gamètes jusqu'au stade formation de l'embryon. Ces observations n'ont pas été incluses dans la partie « Résultats et discussions » mais insérées directement dans l'annexe 2 (Fig.37) à la fin de ce mémoire.

1/Partie théorique

1/ Cycles de développement et évolution de l'appareil reproducteur chez les plantes terrestres

1.1/ Les différents cycles de reproduction

Les végétaux possèdent un cycle de développement complexe où alternent le plus souvent deux phases, la phase gamétophytique et la phase sporophytique. Au cours de l'évolution, le cycle nous permet d'illustrer la diversité des modes de vie adoptés par les végétaux. Ainsi les organismes deviennent de plus en plus compliqués avec une instauration progressive de la diplophase au détriment de l'haplophase. Dans ce qui va suivre, nous allons explorer sur des exemples les différents cycles du développement en allant des algues vertes jusqu'au Angiospermes en passant par les Bryophytes, Ptéridophytes et Gymnospermes.

1.1.1/ Chez l'algue verte *Chlamydomonas*

Chlamydomonas est une Chlorophycophyte, de forme unicellulaire biflagellée. La plupart du temps, l'adulte reste haploïde et se multiplie surtout par voie asexuée. Lors de la reproduction sexuée, une cellule (Fig. 1, A) subit une série de divisions à l'intérieur de la paroi de la cellule mère qui devient alors un gamétocyte (Fig. 1, B et C). Selon les espèces 8, 16 ou 32 gamètes sont formés; ils sont morphologiquement identiques à la cellule mère mais de taille beaucoup plus réduite (Fig. 1, B1 et C1). Généralement, les gamètes ne s'unissent que s'ils appartiennent à des souches différentes de signe (+) et (-). Les gamètes s'unissent d'abord par leurs flagelles, avant de fusionner par dissolution locale de la paroi du pôle antérieur (Fig. 1, D). Il y a ainsi formation d'un zygote mobile par 4 flagelles (Fig. 1, E). Après la chute de ces derniers, le zygote s'entoure d'une paroi épaisse et ornementée (Fig. 1, F) qui permet à la cellule de résister à des conditions défavorables. Lorsque les conditions du milieu externe le permettent, la cellule se divise par méiose et donne 4 cellules haploïdes (Fig. 1, G et H). Le cycle est uniquement monogénétique (haplophasique) (Robert *et al.*, 1998).

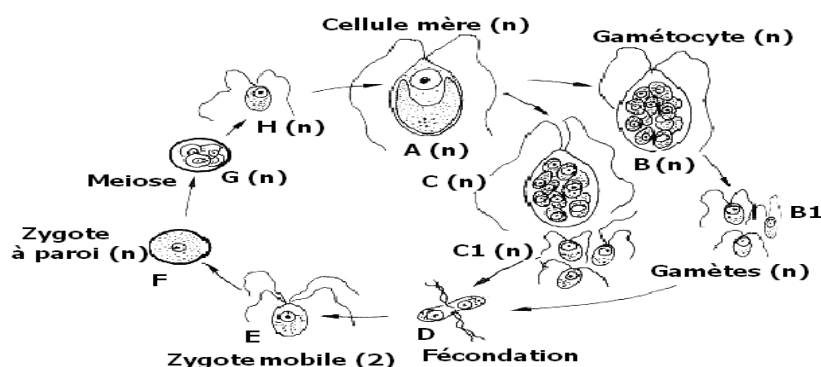


Fig. 1 : Cycle de reproduction d'un *Chlamydomonas* isogame (Robert *et al.*, 1998).
2 n et n correspondent aux phases diploïde et haploïde respectivement.

1.1.2/ Chez l'algue verte *Ulva* (laitue de mer)

C'est une Chlorophycophyte sous forme de thalle à bord ondulé (Fig. 2, A, B), il s'agit d'une lame verte formée par deux couches cellulaires. La forme haploïde présente un gamétophyte mâle et un gamétophyte femelle qui se distinguent lors de la reproduction sexuée. Le bord vert sombre des gamétophytes femelles subit trois à quatre divisions successives. Ce qui conduit à la formation de 8 à 16 gamètes biflagellés, mobiles, libérés par le gamétocyste femelle (Fig. 2, A1). Le gamétophyte mâle dont la marge est vert jaunâtre, subit quatre à cinq divisions successives, ce qui aboutit alors à la formation de 16 à 32 gamètes mobiles et biflagellés (Fig. 2, B1). Les gamètes femelles sont de taille beaucoup plus grande que les gamètes mâles. Le rapprochement des gamètes et leur union donne un zygote à quatre flagelles (Fig. 2, C). Ce zygote, en perdant ses flagelles, se fixe au substrat et donne un nouveau thalle de forme diploïde (sporophyte) (Fig. 2, D). A maturité, les cellules marginales du sporophyte se transforment en sporocystes (Fig. 2, F) qui donnent naissance, par méiose, à des cellules haploïdes mobiles par quatre flagelles (zoospores) et sont plus volumineuses que les gamètes (Fig. 2, G). Après une courte période de vie libre, les zoospores se fixent au substrat et donnent naissance, soit à des thalles mâles, soit à des thalles femelles. Le cycle de l'ulve est digénétique et isomorphe haplo-diplophasique (Robert *et al.*, 1998).

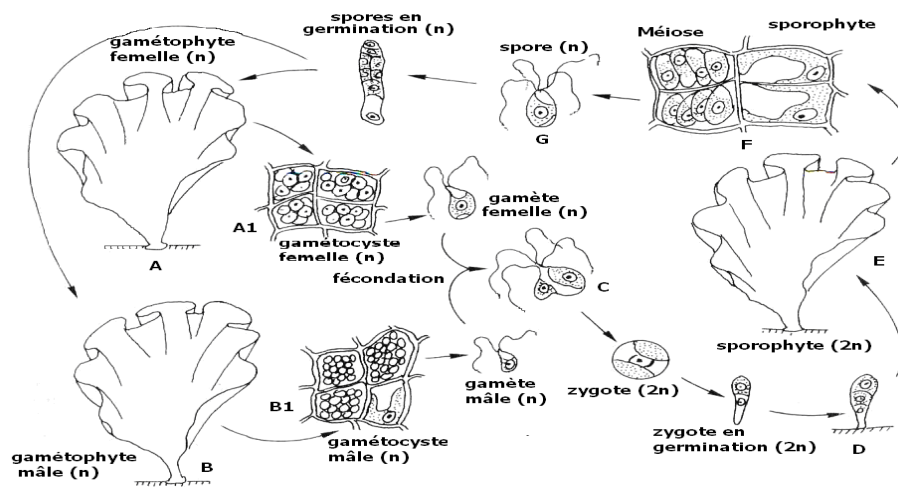


Fig. 2 : Cycle de reproduction de l'ulve (*Ulva lactuca*) (Robert *et al.*, 1998).
2 n et n correspondent aux phases diploïde et haploïde respectivement.

1.1.3/ Chez la bryophyte Polytric : *Potrichum juniperium*

Potrichum juniperium est une grande mousse formée de nombreux axes feuillés chlorophylliens dressés (environ 10 cm de haut), reliés entre eux par des protonémas filamenteux, fixés au sol par des rhizoïdes. La plante représente le gamétophyte mâle ou femelle (dioïque) (Fig. 3, A).

Lors de la reproduction apparaissent des bourgeons gamétangiaux, portant des gamétanges, sur les rameaux végétatifs ayant terminé leur croissance. Les pieds femelles portent des

gamétanges femelles (archégonies) portant les oosphères immobiles (Fig. 3, B). Les pieds mâles portent les gamétanges mâles (anthéridies) à l'intérieur desquels se forment les anthérozoïdes filiformes et flagellés (Fig. 3, C). Ces anthérozoïdes libérés des anthéridies nagent dans l'eau et s'approchent des archégonies, attirés par le mucilage des cellules du col qui ont dégénéré (Fig. 3, D). Les anthérozoïdes pénètrent jusqu'au ventre de l'archégonie pour féconder l'oosphère (Fig. 3, E). Le zygote (diploïde) formé se développe immédiatement dans l'archégonie (Fig. 3, E, F). La partie basale s'enfonce dans la tige feuillée (Fig. 3, G), tandis que la partie supérieure, donne le sporogone (sporophyte) (Fig. 3, H). Ce dernier est seulement constitué d'une soie et d'une capsule (sporangie) (Fig. 3, I) à l'intérieur duquel des cellules vont subir la méiose et donneront des tétraspores haploïdes qui progressivement s'entourent d'une paroi épaisse et résistante (Fig. 3, J). Ces spores seront dispersées par l'ouverture de l'opercule de la capsule. Lorsque les conditions d'humidité et de température sont favorables, les spores germent et donnent à nouveau le protonéma haploïde (gamétophyte) (Fig. 3, K et L). Le cycle est haplo-diplophasique digénétique à gamétophyte dominant (Fig. 3) (Laberche, 1999).

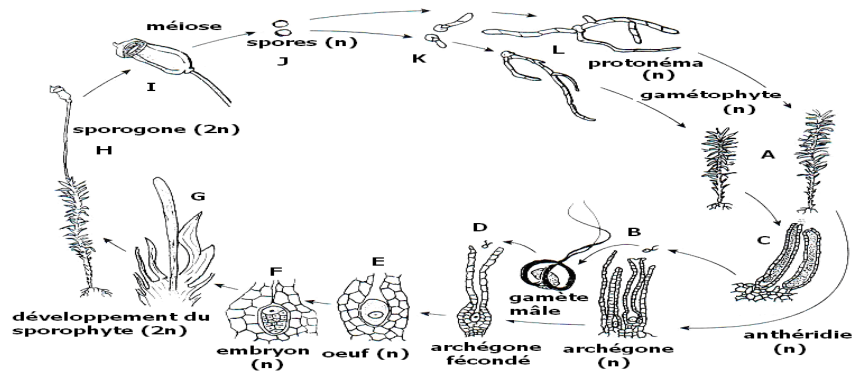


Fig. 3: Cycle de reproduction de *Potrichum juniperium* (Laberche, 1999).
 2n et n correspondent aux phases diploïde et haploïde respectivement.

1.1.4/ Chez la ptéridophyte filicophyte : *Polypodium vulgare* L.

La fougère est une plante formée de feuilles aériennes découpées (frondes) et d'une tige souterraine qui porte plusieurs racines ; elle représente le sporophyte diploïde (Fig. 4, A). A maturité sur la face inférieure des frondes se différencient les sporanges (forme ovoïde et couleur brunâtre) portés par des pédicelles et limités par une couche de cellules (indusie) (Fig. 4, B). Ces sporanges sont groupés en sores.

Chaque sporangie (Fig. 4, C) contient 64 spores haploïdes produites par méiose, suivie de 4 mitoses. Ces spores sont très déshydratées ayant une paroi épaisse et ornementée. Elles sont libérées dans le milieu par l'ouverture du sporangie grâce au fonctionnement d'un anneau mécanique constitué d'une file de cellules aux parois épaisses sur trois cotés qui se rétractent par déshydratation. Lorsque les conditions d'humidité et de température sont favorables ces spores se réhydratent puis germent pour donner un prothalle, sous forme de lame cordiforme possédant quelques rhizoïdes pour adhérer au sol (Fig. 4, D et E). Les rhizoïdes emprisonnent une lame d'eau. Sur la face inférieure du prothalle apparaissent les gamétanges : anthéridies et archégonies

(Fig. 4, F et G). Les anthéridies sont de petites sphères disposées à la périphérie du prothalle. Elles possèdent une paroi pluricellulaire qui, à maturité, se déchire et libère des anthérozoïdes hélicoïdaux flagellés (Fig. 4, H). L'organisation des archégonies ressemble à celle des mousses, mais le ventre contenant l'oosphère est intégré au tissu prothallien. Lors de la fécondation, les anthérozoïdes flagellés nagent dans l'eau du sol jusqu'à l'archégonie pour féconder l'oosphère (Fig. 4, I). Le zygote se développe immédiatement en une jeune plante sporophytique (Fig. 4, K et A). Le cycle de la fougère se caractérise par deux générations bien distinctes ; il est alors haplo- diplophasique, digénétique avec dominance de la génération sporophytique (Fig. 4) (Laberche, 1999).

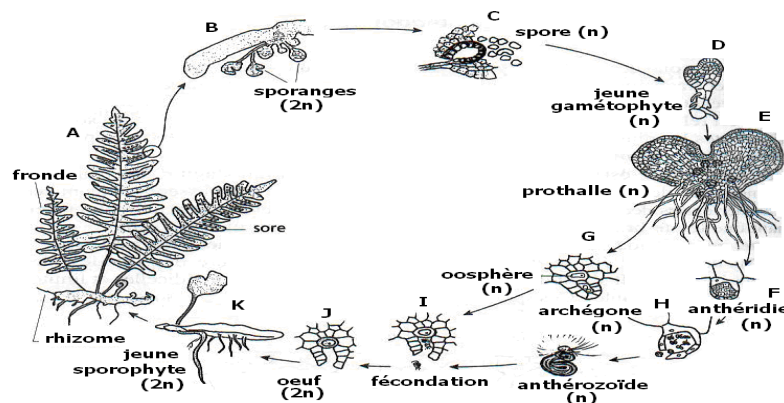


Fig. 4 : Cycle de reproduction des Filicophytes *Polypodium vulgare* L. (Laberche, 1999).
2 n et n correspondent aux phases diploïde et haploïde respectivement.

1.1.5/ Chez le gymnosperme préspermaphyte : Cycas

Les Cycas sont des plantes qui ressemblent aux palmiers. Leur morphologie générale consiste en un tronc épais, non ramifié recouvert par la base des anciennes feuilles, alors que les plus jeunes sont disposées en cercles au sommet (Fig. 5, A). Quand l'arbre est adulte, un ou plusieurs cônes pendent de cette couronne. Des racines ancrent l'arbre au sol. Les appareils reproducteurs sont des cônes pendants portés par des individus différents (dioécie). Le cône mâle est constitué par un ensemble de petites feuilles modifiées et emboîtées (sporophylles). Elles portent sur leur face inférieure de très nombreux sporanges groupés en sores (Fig. 5, B), contenant des spores provenant de la transformation d'une cellule ayant subi la méiose et se divisent ensuite plusieurs fois. Ces cellules s'entourent d'une paroi épaisse ornementée (Fig. 5, C) pour constituer le grain de pollen.

L'appareil reproducteur femelle est constitué par des feuilles morphologiquement semblables aux feuilles végétatives mais légèrement plus petites et de couleur brunâtre. Elles portent à leur base deux rangées d'ovules de grosseur variable (d'un pois à un gros abricot) (Fig. 5, D). Chaque ovule comprend de l'extérieur vers l'intérieur : un tégument composé de trois couches, dont la centrale est plus dure (Fig. 5, E). Au sommet, ce tégument ménage un puits, le micropyle. Un tissu périphérique, le nucelle, n'atteignant pas le sommet et ménageant sous le micropyle une petite cavité, la chambre pollinique. Enfin, un tissu central, l'endosperme non

cloisonné (cénocytique) comportant à son sommet un ou deux archégonés. C'est un tissu haploïde qui provient de la différenciation d'une cellule nucellaire (diploïde) en subissant la méiose. Seule une des quatre cellules haploïdes continue son développement et donne un gamétophyte qui est enfermé dans le nucelle, les trois autres cellules dégénèrent.

Cet endosperme (gamétophyte) porte un ou deux archégonés dont le ventre est enfoncé dans l'endosperme, alors que les cols, sont très réduits (4 cellules), dépassent et aboutissent dans la chambre pollinique (Fig. 5, F). Les grains de pollen sont libérés dans l'air et la pollinisation se fait, soit par les insectes, soit par le vent selon les espèces. Chaque grain de pollen tombé au niveau du micropyle germe et émet un tube pollinique qui atteint la chambre pollinique (Fig. 5, G). Pendant ce temps, une des trois cellules composant le grain de pollen se divise en donnant une cellule socle et une cellule spermatogène. Cette dernière se divise encore pour donner deux volumineux spermatozoïdes flagellés en hélice (Fig. 5, G). Ils sont libérés dans la partie supérieure du nucelle et permet aux anthérozoïdes de nager vers les cols des archégonés pour féconder l'oosphère. Seulement un zygote se forme par ovule. L'ovule se détache des feuilles, se développe aux dépens des réserves accumulées par l'endosperme avant la fécondation, devenant une prégraine (Fig. 5, H et I). Le cycle est constitué de deux générations successives différentes. Il est alors haplo-diplophasique, digénétique à dominance sporophytique (Laberche, 1999).

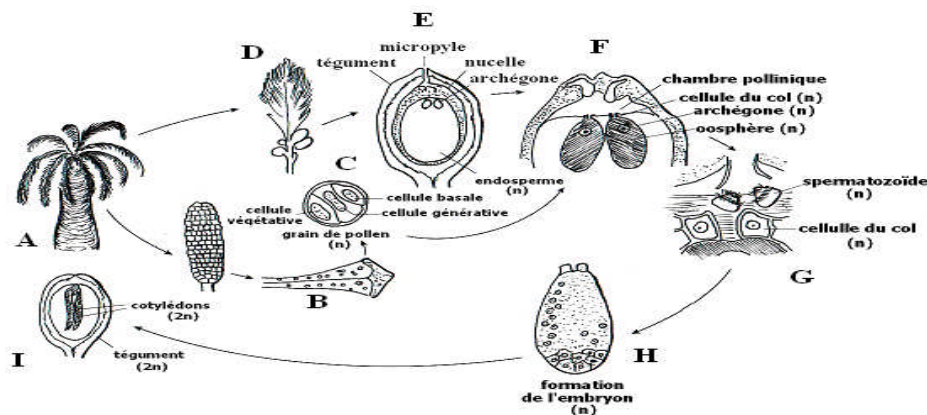


Fig. 5 : Cycle de reproduction d'un cycas (Laberche, 1999).
2 n et n correspondent aux phases diploïde et haploïde respectivement.

1.1.6/ Chez les gymnospermes spermaphytes : les conifères

Chez les Conifères (gymnospermes plus évoluées), l'arbre est le sporophyte (Fig. 6, A) qui développe des microsporophylles (écaille du cône mâle) et des macrosporophylles (écaille du cône femelle). Dans le cône mâle, chaque sporophylle (écaille) porte deux microsporangés (sacs polliniques) (Fig. 6, b1) qui produisent par méiose des tétrades de microspores (cellules mères du pollen). Le noyau haploïde d'une microspore se divise encore, pour produire une cellule végétative et deux noyaux reproducteurs formant ainsi le gamétophyte mâle ou le grain de pollen (Fig. 6, b2). Dans le cône femelle (Fig. 6, b), chaque macrosporophylle porte deux macrosporangés (Fig. 6, a1 et a2). Un macrosporange est formé d'une enveloppe entourant une macrospore (cellule mère de l'endosperme). La macrospore haploïde va se diviser plusieurs fois

pour produire un macroprothalle pluricellulaire; gamétophyte femelle ou endosperme où se formeront deux archéones, contenant des oosphères (Fig. 6, a4). Les grains de pollen transportés par le vent se déposent sur l'enveloppe protectrice de l'ovule (tégument) et pénètrent par le micropyle (Fig. 6, C). Arrivés au nucelle sur lequel ils germent en formant un tube pollinique qui apporte les deux gamètes non mobiles jusqu'à l'oosphère que l'un d'eux féconde (Fig. 6, C) le noyau restant dégénère. Le zygote issu de la fécondation forme un embryon qui se développe dans l'ovule sur le sporophyte pour donner une graine ailée (Fig. 6, E). Cette graine germe pour donner un nouveau sporophyte (Fig. 6, F et A). Le cycle est haplo-diplophasique, digénétique à dominance sporophytique (Robert *et al.*, 1998 & Spichiger *et al.*, 2002).

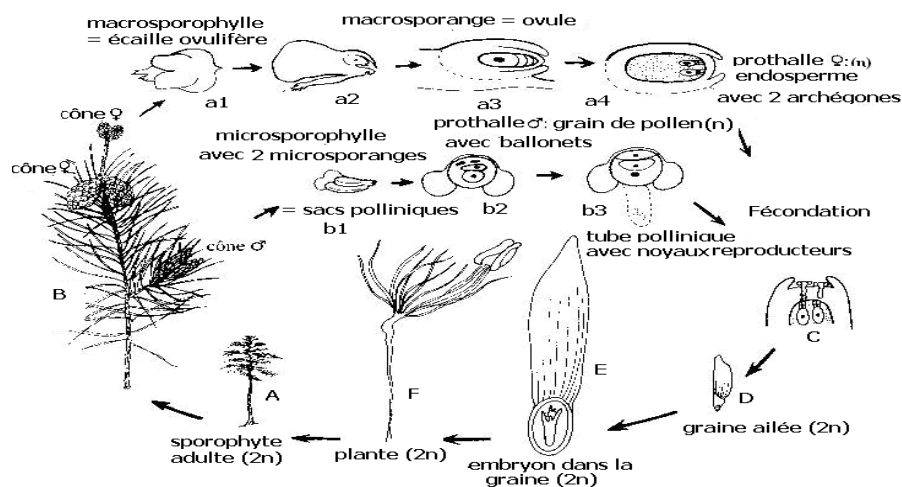


Fig. 6 : Cycle de reproduction des Pinophytes (Spichiger *et al.*, 2002).
 2 n et n correspondent aux phases diploïde et haploïde respectivement.

1.1.7/ Chez les Angiospermes

L'appareil reproducteur des Angiospermes représenté par la fleur, dont les microsporophylles mâles représentent les étamines (Fig. 7, A et B) et les macrosporophylles femelles représentent les carpelles (Fig. 7, A et E). Dans les étamines quatre microsporanges produisent, par méiose, des tétrades de microspores haploïdes (Fig. 7, C). Chaque microspore se divise à son tour pour donner le microgamétophyte mâle, formé d'un noyau végétatif et d'un noyau spermatogène (Fig. 7, D). Ce dernier se divise encore pour donner deux noyaux reproducteurs. Dans l'ovule (macrosporange) (Fig. 7, F), une cellule mère de la macrospore subit une méiose pour donner quatre macrospores haploïdes, dont trois dégénèrent. La macrospore survivante subit trois mitoses successives pour donner une cellule avec huit noyaux, constituant le sac embryonnaire (macrogamétophyte) (Fig. 7, G).

Les ovules (Fig. 7, E) sont enfermés dans l'ovaire, partie inférieure du pistil surmonté du style portant le stigmate, surface réceptrice des grains de pollen qui sont transportés par le vent, l'eau ou les animaux. A la surface du stigmate (Fig. 7, D et G) le pollen peut germer pour développer le tube pollinique qui traverse les tissus du pistil et pénètre dans le micropyle d'un ovule, il traverse ainsi le nucelle et finalement décharge dans le sac embryonnaire deux gamètes

mâles non mobiles. L'un d'eux féconde l'oosphère d'où résulte un zygote diploïde. Le second gamète mâle s'unit aux noyaux polaires pour former un zygote triploïde d'où la réalisation de la double fécondation (Fig. 7, H) pour former un embryon diploïde constituant le nouveau sporophyte et un albumen triploïde constituant la source de réserves que l'embryon va utiliser lors de la germination de la graine (Fig. 7, J et K). Le cycle est haplo-diplophasique, digénétique à dominance sporophytique (Robert *et al.*, 1998 & Spichiger *et al.*, 2002).

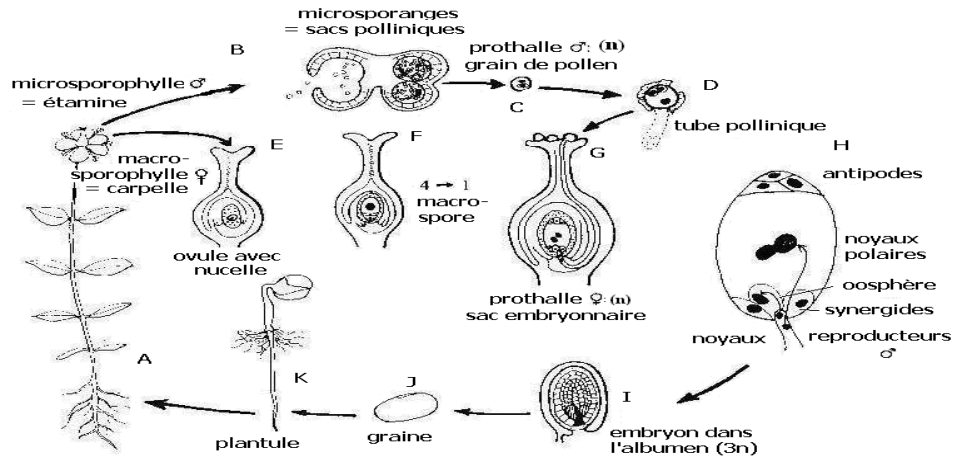


Fig. 7 : Cycle de reproduction des Angiospermes (Spichiger *et al.*, 2002).

1.2/ Evolution de l'appareil reproducteur des Algues jusqu'aux Angiospermes

Les Algues vertes unicellulaires, passent quasiment toute leur vie sous forme de gamétophytes flottant à la surface de l'eau. Lors de la reproduction sexuée, une série de divisions mitotiques se déroulent à l'intérieur de la paroi du gamétophyte, nommé alors gamétocystes, où des gamètes flagellés sont formés, identiques à la cellule mère, mais de taille beaucoup plus réduite. Ces gamètes sont libérés dans l'eau, puis se fusionnent pour former un zygote diploïde ornementé, à l'état libre. Lorsque les conditions du milieu sont favorables, ce zygote subit immédiatement la méiose pour donner la forme haploïde gamétophytique.

Chez les Algues chlorophylliennes thallophytes, le gamétophyte et le sporophyte sont sous forme de thalle vivant toujours dans l'eau, fixé à un substrat. Dans la génération gamétophytique, des cellules marginales de certains thalles se transforment en gamétocystes. A l'intérieur du gamétocyste femelle, porté sur le pied femelle, la cellule mère subit 3 à 4 divisions mitotiques pour donner des gamètes flagellés libérés par l'ouverture des gamétocystes. A l'intérieur du gamétocyste mâle, porté par le pied mâle, la cellule mère subit 4 à 5 divisions mitotiques pour donner des gamètes qui seront libérés dans l'eau. Une fois dans l'eau les gamètes se déplacent grâce à leurs flagelles et se rencontrent pour donner un zygote libre ornementé après perte de ses flagelles. Ce zygote se fixe au substrat et se développe en une nouvelle génération sporophytique diploïde. A maturité, quelques cellules marginales se transforment en sporocystes dans lesquels, par méiose, se forment des spores volumineuses flagellées (zoospores) qui seront libérées dans

l'eau, par l'ouverture du sporocyste. Après une courte durée de vie libre, ces spores se fixent au substrat et donnent des thalles mâle ou femelle.

Chez ces Algues, on assiste alors à : la séparation des fonctions: végétative et reproductrice du gamétophyte, et présence de deux générations successives; la génération gamétophytique productrice de gamètes et la génération sporophytique productrice de spores (Robert *et al.*, 1998).

Chez les Bryophytes, la génération gamétophytique est plus dominante que la génération sporophytique, en ayant une morphologie et une durée de vie différente. Lors de la reproduction, il y a apparition de bourgeons gamétangiaux mâles et femelles portés sur deux pieds gamétophytiques différents (dioécie) ou sur le même pied (monoécie). Ces bourgeons portant des gamétanges, formant des appareils reproducteurs gamétophytiques (Fig. 8, a). A l'intérieur du gamétange mâle (anthéridie) se forment des anthérozoïdes petits et flagellés (Fig. 8, b). A l'intérieur de gamétange femelle (archégone) il y a formation d'une seule oosphère immobile, enfermée dans l'archégone (Fig. 8, b). Les anthérozoïdes libérés par l'anthéridie nagent dans le film d'eau et pénètrent dans l'archégone à l'intérieur duquel le zygote va se former. Ce zygote se développe immédiatement en un sporogone (sporophyte) en parasitant le gamétophyte. Sur ce sporophyte, il y a formation d'un seul sporange (Fig. 8, c et d), à l'intérieur duquel se forment les spores, par méiose.

Le gamétange et le sporange constituent une nouvelle organisation du gamétocyste et du sporocyste respectivement, par acquisition d'une paroi pluricellulaire (Fig. 8, b et d) (Robert *et al.*, 1998, Laberche, 1999 & Guignard, 1989, 1998).

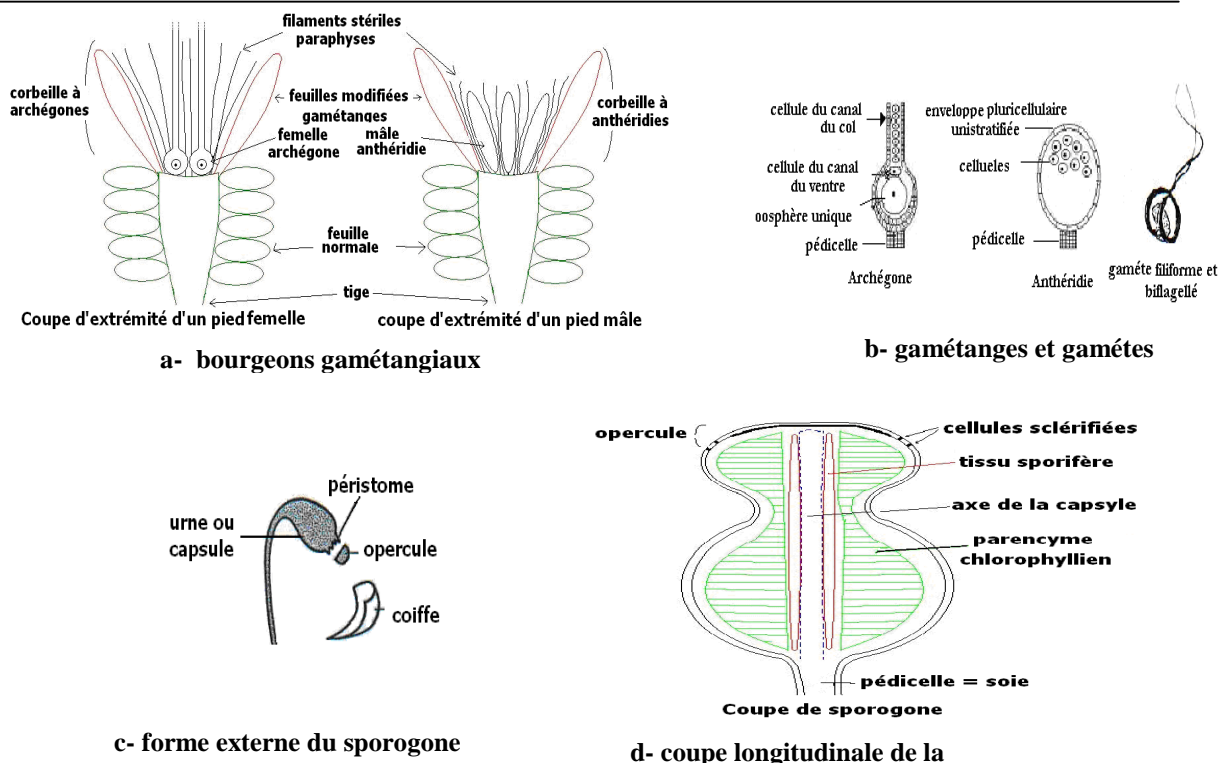


Fig. 8 : Organes reproducteurs des Bryophytes (Guinard, 1989, 1998, Anonyme, 2006).

Chez les Ptéridophytes, les deux générations apparaissent toutes les deux, mais c'est la génération sporophytique qui prédomine et possède une durée de vie plus longue que la génération gamétophytique.

On assiste alors chez les Ptéridophytes à une régression de la dimension végétative du gamétophyte ainsi que de son appareil reproducteur. Les gamétanges ne sont pas portés sur un bourgeon gamétangique, mais sont formés à la face inférieure du prothalle (Fig. 9), et le gamétange femelle est enfoncé dans les tissus prothalliens. Les anthérozoïdes libérés dans le film d'eau nagent jusqu'à l'archégone pour féconder l'oosphère. Le zygote qui, au début de son développement, parasite le gamétophyte et devient autonome par la suite.

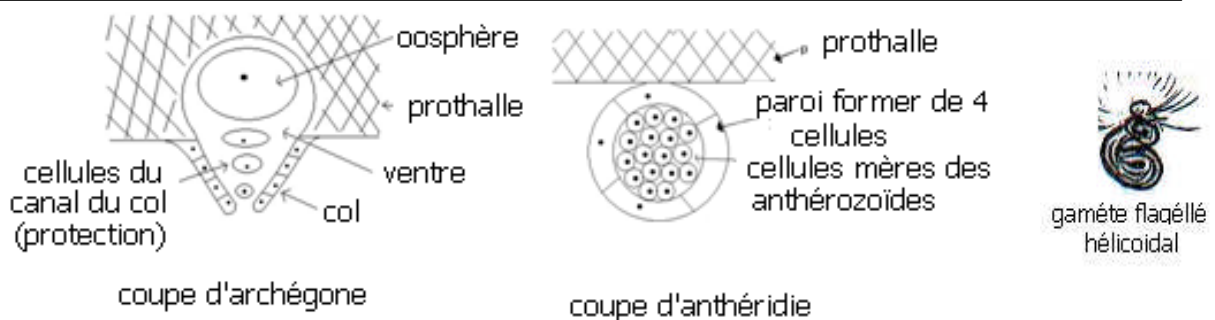


Fig. 9 : Gamétange des Ptéridophytes (Laberche, 1999 & anonyme, 2006).

On assiste aussi à une évolution progressive de la génération sporophytique, ainsi que de son appareil reproducteur par acquisition de plusieurs caractères reproducteurs, particulièrement:

- 1- Différenciation sexuelle des éléments mâles et femelles formés au niveau du prothalle (gamétophyte): Chez les fougères, les prêles, il y a isosporie, c'est-à-dire que les spores issues des sporanges sont morphologiquement semblables, mais en germant, certaines spores donnent des prothalles mâles porteurs uniquement des anthéridies et certaines spores donnent des prothalles femelles portant uniquement des archégonies. Chez la lignée la plus évoluée, Sélaginelles, il y a par contre l'hétérosporie ; les caractères mâles et femelles apparaissent dès la formation des spores. Ces spores sont aussi issues des gamétanges morphologiquement différents (hétérosporangie). Les sporanges mâles (microsporangies) produisent, par méiose, des spores petites et sont très nombreuses (microspores), les sporanges femelles (macrosporangies) donnent, par méiose, un petit nombre de spores volumineuses (macrospores). Chez cette lignée, il y a aussi acquisition de l'endoprothallie ; les spores femelles germent dans les macrosporangies, en parasitant le sporophyte, pour donner un gamétophyte femelle. Lors de la reproduction le zygote se forme à l'intérieur du sporange, mais son développement ne se poursuit qu'en se détachant de la plante mère en utilisant les réserves du prothalle femelle (qui est toujours chlorophyllien).
- 2- La spécialisation des feuilles qui portent les sporanges. Chez les Filicophytes, les feuilles normales photosynthétisantes (nourrissantes) qui portent sur leurs faces inférieures les sporanges (Fig. 10, a et c), sont dites tropho-sporophylles (Fig. 10, a); il n'y a pas séparation de fonctions nourricière et reproductrice. Chez les lignées les plus évoluées, il y a séparation

des fonctions ; les gamétanges sont portés sur des feuilles modifiées (sporangifères = sporophylles). Ces feuilles se regroupent et forment des épis spécialisés (Fig. 10, b); les microsporangifères portent les microsporangies et les macrosporangifères portent les macrosporangies (Robert *et al.*, 1998; Guignard, 1998 ; Laberche, 1999 & Spichiger *et al.*, 2002).

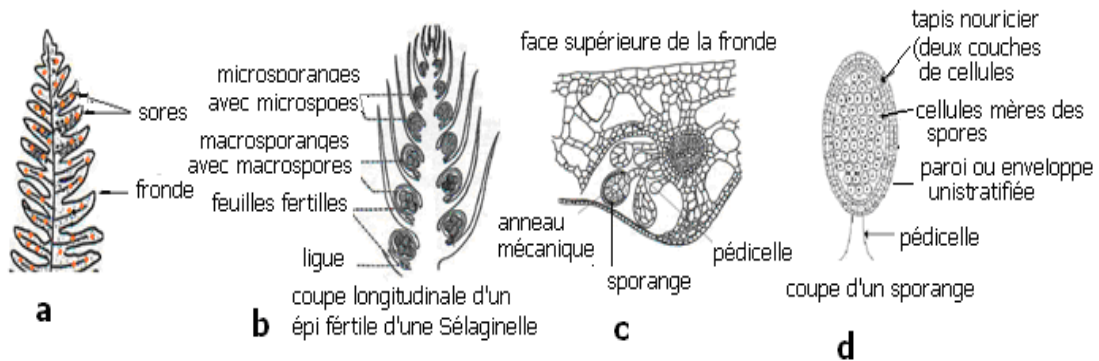


Fig. 10 : Les sporophylles et sporanges des Ptéridophytes (Guignard, 1998 & Laberche, 1999).

Les préspermaphytes représentés actuellement par quelques plantes reliques, le Ginkgo, les Cycas et leurs alliés, forment un embranchement intermédiaire entre les Ptéridophytes et les Spermaphytes. Chez cet embranchement, il y a une très forte prédominance du sporophyte, avec apparition d'un appareil reproducteur plus évolué que celui des ptéridophytes par acquisition définitive de l'hétérosporie (micro- macrospore), de l'hétérosporangie (micro- macrosporangie) et de l'endoprothallie (les gamétophytes se forment à l'intérieur des sporanges et parasitent le sporophyte). Ces acquisitions sont suivies aussi de la spécialisation des feuilles sporangifères en sporophylles, les microspores appelées désormais étamines et macrosporangifères dénommées écailles ovulifères. Ces transformations de feuilles sont plus marquées chez les Ginkgoales que chez les Cycadales (Fig. 11). Les microspores et les macrospores forment une nouvelle structure, cône mâle et cône femelle respectivement, devenant les sièges des gamétophytes (Favre-Duchartre, 1970 & Guignard, 1989, 1998).

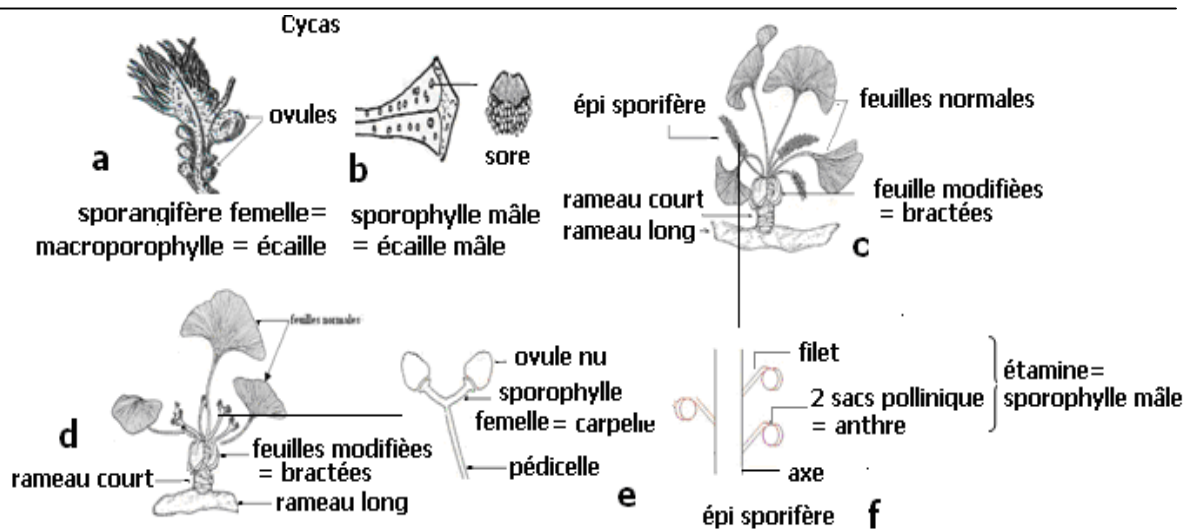


Fig. 11 : Organes reproducteurs des Préspermaphytes : Cycas (a et b) et Ginkgo (c, d, e et f) (Guignard, 1998, Laberche, 1999 & anonyme, 2006).

Dans le cône femelle, il y a une nouvelle organisation de l'organe femelle, l'ovule, où s'individualise le gamétophyte femelle. L'ovule (Fig. 12, a) est formé de l'extérieur vers l'intérieur : de tégument, feuilles ou écailles soudées pour former une enveloppe protectrice qui délimite au sommet de l'ovule un orifice étroit, le micropyle ; un macrosporange représente le nucelle et d'un gamétophyte femelle (= endosperme), il est issu de la méiose d'une seule cellule (macrospore) et à partir d'une cellule mère du nucelle (gamétange). Le macrogamétophyte chlorophyllien est formé d'un ou de deux archégones dont le col est très réduit (Fig. 12, b). A maturité, les ovules fécondés ou non tombent à terre et se développent. Ils sont chargés de réserves, qui vont servir à nourrir le jeune embryon au début de son développement, ainsi l'ovule constitue un nouvel organe de dissémination (Favre- Duchartre, 1970 ; Robert *et al.*, 1998; Guignard, 1998 ; Laberche, 1999 & Spichiger *et al.*, 2002).

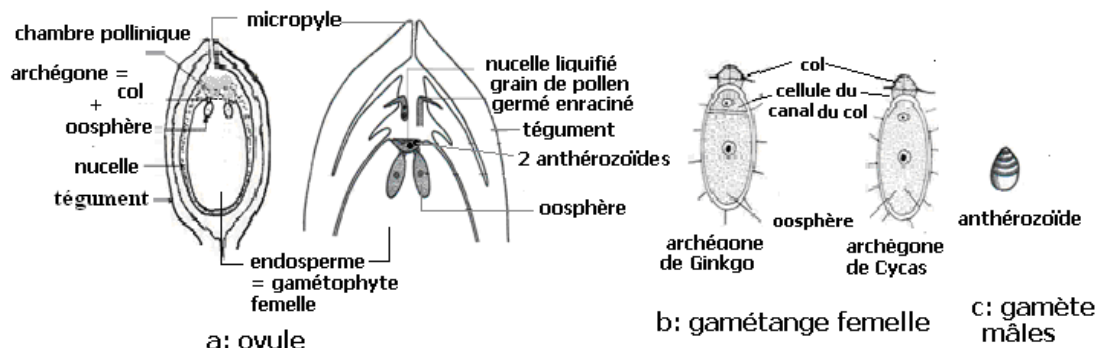


Fig. 12 : ovule et organes gamétophytiques des préspermaphytes (Favre- Duchartre, 1970; Robert *et al.*, 1998; Guignard, 1998).

Dans le cône mâle, les microsporangies sont portés par les sporophylles (étamines) sous forme de sores chez les Cycadales, et sous forme de deux sacs allongés chez les Ginkgoales. Les microspores, issues de méioses, germent *in situ* pour former un gamétophyte à l'état de prothalle miniature inclus à l'intérieur de la paroi de la microspore, constituant ainsi une nouvelle structure sous forme de grain de pollen portant 3 cellules chez les Cycadales (Fig. 13, a), et de 4 cellules chez les Ginkgoales (Fig. 13, b). Cette nouvelle structure constitue un élément important de dissémination, appelée pollinisation.

Les grains de pollen dispersés par le vent, arrivent à la surface des ovules et sont retenus par une sécrétion suintant du micropyle, qui leur permet de s'introduire sous le tégument de l'ovule puis germe au contact du nucelle pour donner un tube pollinique et déversent ensuite deux anthérozoïdes flagellés qui nagent dans le liquide de la chambre pollinique, puis pénètrent par le col de l'archégone pour féconder l'oosphère. La fécondation est toujours archaïque puisqu'elle nécessite toujours la présence de l'eau (nucelle liquéfié) (Fig. 12, a).

Lorsque l'ovule tombe à terre, le zygote issu de la fécondation se développe en embryon, puis donne un nouveau sporophyte en utilisant les réserves accumulées par le gamétophyte, dès que les conditions du milieu sont favorables (Favre- Duchartre, 1970; Robert *et al.*, 1998; Guignard, 1998; Laberche, 1999 & Spichiger *et al.*, 2002).

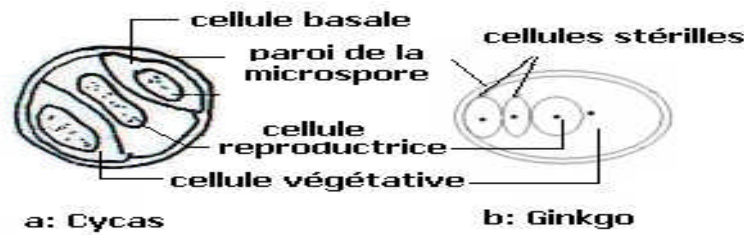


Fig. 13 : Grains de pollen des Préspermaphytes (Laberche, 1999 & anonyme, 2006).

Les Spermaphytes sont les végétaux les plus perfectionnés du règne végétal, ce sont des plantes à graines. Les spermaphytes se distinguent essentiellement des Préspermaphytes par :

La production de la graine, la fécondation se réalise par l'intermédiaire d'un tube pollinique formé par le grain de pollen, indépendamment de l'élément liquide, et par la transformation de l'ovule en graine sur la plante mère.

Chez les Gymnospermes les plus évolués, les cônes sont beaucoup plus petits que ceux des Préspermaphytes, et peuvent être portés sur un même sporophyte (monoécie) ou sur deux individus différents (dioécie). Le cône mâle est formé de plusieurs écailles (microsporophylles) (Fig. 14, a), et chaque écaille porte deux sacs polliniques (Fig. 14, b), à l'intérieur desquels se forment les grains de pollens constitués de deux cellules prothalliennes, une cellule végétative et une cellule reproductrice qui va produire uniquement deux anthérozoïdes non flagellés (spermatozoïdes).

Dans le cône femelle (Fig. 14, e), chaque écaille porte à sa base deux ovules. L'ovule des Gymnospermes les plus évolués ne présentent pas de liquide pollinique dans la chambre pollinique, le gamétophyte est plus réduit par rapport à celui des préspermaphytes (Fig. 14, g).

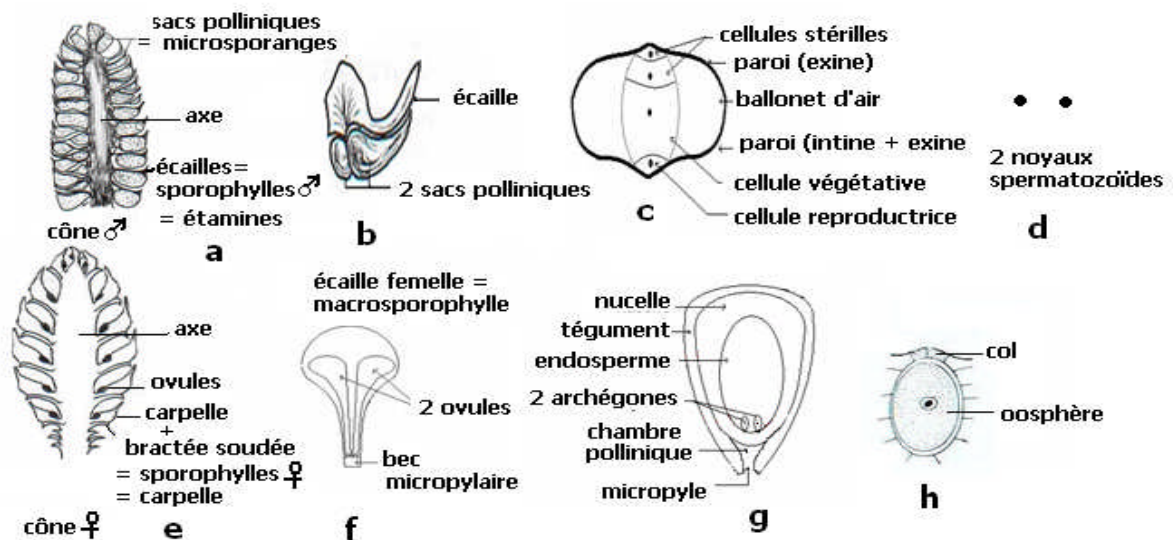


Fig. 14 : Organes reproducteurs des Gymnospermes évolués (Robert *et al.*, 1998; Guinard, 1998 & Laberche, 1999).

Le cycle de développement des Gymnospermes, avec une très forte prédominance du sporophyte, se caractérise par deux principales acquisitions :

L'ovule ne tombe pas à terre, mais reste sur la plante feuillée (l'endoprothallie). L'ovule fécondé demeure en place jusqu'à la formation de l'embryon. Les réserves nécessaires à la croissance de l'embryon sont fournies par la plante sur laquelle il vit en parasite. L'ovule portant l'embryon se détache de la plante et va assurer la dissémination de la plante par la formation d'un nouvel organe, la graine, faisant parti du cycle vital. La graine se détache avant d'être disséminée, l'embryon se trouve dans un état de vie ralentie qui ne germe qu'après une certaine période de repos, même si les conditions du milieu sont favorables. La graine constitue le premier apport des Gymnospermes à l'évolution, le second est d'avoir rendu la fécondation indépendante de la présence de l'eau (Pesson et Louveaux, 1984; Robert *et al.*, 1998; Guignard, 1998 ; Laberche, 1999 & Spichiger *et al.*, 2002).

Les Clamydospermes, groupe intermédiaire entre les Gymnospermes et les Angiospermes, se caractérisent par une enveloppe bractéenne homologue des fleurs protégeant les organes reproducteurs.

Enfin, chez les Angiospermes, les organes reproducteurs ovules et sacs polliniques sont plus isolés du milieu extérieur par une acquisition de couches pluricellulaires (Fig. 15, a, c).

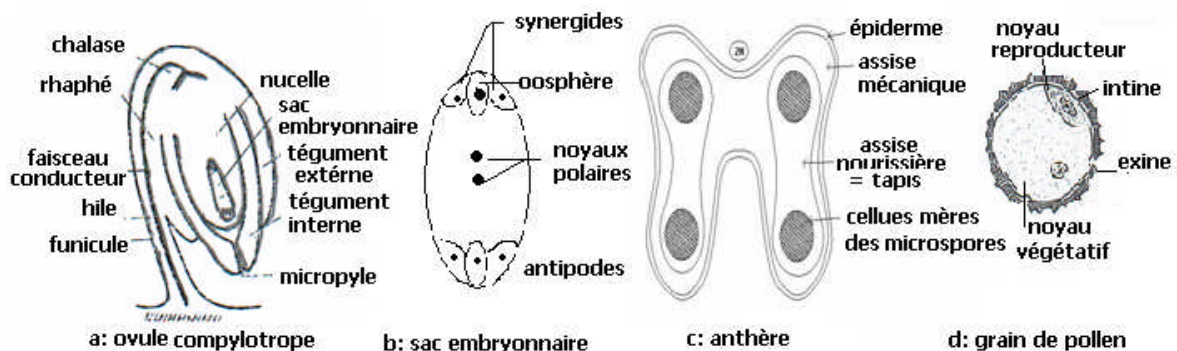


Fig. 15 : Sporanges et gamétophytes des Angiospermes (Robert *et al.*, 1998 & Laberche, 1999).

Dans l'ovule, le gamétophyte est encore plus réduit, formant un sac embryonnaire (Fig. 15, b) formé de 8 noyaux. Dans le sac pollinique, où les grains de pollen formés sont réduits à deux cellules (Fig. 15, d). Les sporophylles porteuses des organes reproducteurs se groupent en fleurs bisexuées (étamines et carpelles) qui sont entourées encore par des sporophylles stériles à rôle protecteur (pétales et sépales). Lors de la reproduction, un des deux spermatozoïdes va féconder l'oosphère pour former l'embryon, et le second se fusionne avec les deux noyaux polaires du sac embryonnaire pour former le fruit par la transformation des carpelles en fruits après la fécondation (Pesson et Louveaux, 1984; Robert *et al.*, 1998; Guignard, 1998; Laberche, 1999 & Spichiger *et al.*, 2002). Le Tableau1 donne les différents caractères reproducteurs et des homologies chez les plantes.

Tab. 1: Tableau récapitulatif des caractères reproducteurs et des homologues chez les plantes (Spichiger *et al.*, 2002). Modifiés.

	Sporophyte (2n)	Sporophylle (2n)	Sporange (2n)	Spore (n)	Gamétophyte (n)	Gamétange (n)
Chlamydomonas	/	/	/	/	cellule	gamétocyte
Ulve	thalle	/	sporocyte	Isospore	thalle	gamétocyte
Mousses	Soie et capsule	virtuelle	Capsule	Isospore	Protonéma et plante feuillée	Anthéridies (m) et archégonies (f)
Fougères	Plante feuillée	Fronde	Sporange	Isospore	Prothalle hermaphrodite	Anthéridies (m) et archégonies (f)
Prêles	Plante feuillée	Sur les épis sporangifères	Sporange	Isospore	Prothalle (m) et (f)	Anthéridies (m) et archégonies (f)
Sélaginelles	Plante feuillée	Microsporophylle (m) et macrosporophylle (f)	Microsporange (m) et macrosporange (f)	Microspore (m) et macrospore (f)	Prothalles (m) et (f)	1 anthéridie (m) et archégonies (f)
Cycas	Arbres (m) et (f) (dioïque)	Ecaille (m) Ecaille ovulifère (f)	Microsporange (m) Ovule (f)	Grain de pollen uninucléé (m) et cellule mère de l'endosperme (f)	Grain de pollen trinuéé (m) et endosperme (f)	1 anthéridie (m) Et 2 ou + archégonies (f)
Ginkgos	Arbres (m) et (f) (dioïque)	Filet de l'étamine (m) et porte-ovule (f)	Sacs polliniques (m) et ovule (f)	Grain de pollen uninucléé (m) et cellule mère de l'endosperme (f)	Grain de pollen tétranuéé (m) et endosperme (f)	1 anthéridie (m) et 2 archégonies (f)
Conifères	Arbres dioïques	Ecaille staminale (m) et écaille ovulifère (f)	Sacs polliniques (m) et ovule (f)	Grain de pollen uninucléé (m) et cellule mère de l'endosperme (f)	Grain de pollen à trinuéé (m) et endosperme (f)	1 anthéridie (m) et 2 archégonies (f)
Angiospermes	Plantes hermaphrodites, monoïques ou dioïques	Etamine (m) et carpelle (m)	Sacs polliniques (m) et ovule (f)	Grain de pollen uninucléé (m) et cellule mère du sac embryonnaire (f)	Grain de pollen binuéé (m) et sac embryonnaire à huit noyaux (f)	virtuel

(n = haploïde ; 2n = diploïde ; m = mâle ; f = femelle)

1.3/ Rappel sur les organes reproducteurs : la fleur

La fleur est l'appareil reproducteur des Angiospermes. Sa structure est étroitement liée à la pollinisation. Son évolution va en direction de la fixation et de la réduction du nombre de pièces florales vers la soudure et la miniaturisation. Ce dernier cas est associé au regroupement en inflorescences.

1.3.1/ Organisation schématique d'une fleur

- La fleur (Fig. 16) est constituée de quatre types de pièces florales, insérés sur le réceptacle :
- Le calice ou ensemble des sépales qui par son origine est souvent proche du point de vue morphologique des pièces foliaires;
 - La corolle ou ensemble des pétales qui constitue l'appareil d'affichage, essentielle dans le repérage des fleurs par les vecteurs biotiques de la pollinisation;
 - L'androcée ou appareil mâle qui est constitué d'une ou plusieurs étamines. Chaque étamine comprend deux parties, le filet et l'anthère qui à maturité contient les grains de pollen;
 - Le gynécée ou appareil femelle, constitué d'un ou plusieurs carpelles et formé de trois parties, l'ovaire, le style et le stigmate. Chaque carpelle renferme un ou plusieurs ovules.

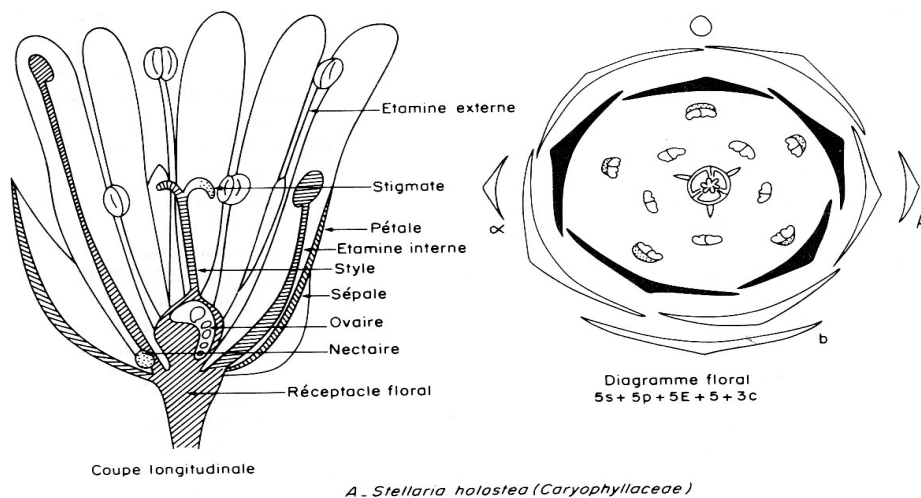


Fig. 16 : Représentation schématique conventionnelle d'une fleur régulière ou actinomorphe par une coupe longitudinale, et un diagramme florale : cas de la Stellaire (*Stellaria Holostea oryophyllaceae*) (Pesson et Louveaux, 1984).

1.3.2/ Gaméto-genèse chez les Angiospermes

La méiose et la fécondation constituent des éléments fondamentaux dans le cycle du développement au cours desquels un brassage de gènes s'effectue par l'intermédiaire de la génération sporophytique diploïde qui produit des spores haploïdes (microspores et macrospores), et la génération gamétophytique haploïde pour la formation des gamètes qui seront prêts à la fécondation.

1.3.2.1/ Méiose et microgamétogénèse

Lors de la formation de l'étamine dans le bouton floral, quatre sillons délimitent précocement quatre territoires pour former les sacs polliniques. A l'intérieur de chaque sac pollinique se différencient des cellules archésporiales ($2n$) qui, en se divisant, donnent deux types de cellules : des cellules pariétales qui seront à l'origine de l'assise mécanique sous épidermique, d'une ou plusieurs assises transitoires et de cellules sécrétrices à rôle nutritif (le tapis staminal). Des cellules sporogènes qui, par mitose, vont permettre la formation d'un massif de cellules plus volumineuses constituant les microsporocytes (cellules mères du pollen) (Fig. 17, A).

Chaque microsporocyte entre en méiose qui donne à la première division deux cellules haploïdes (Fig. 17, B) et à la deuxième division quatre microspores haploïdes, en subissant une cytokinèse (Fig. 17, C). Après la méiose, chaque microspore entre en division mitotique des chromosomes sans division du cytoplasme (caryocinèse I). Le premier produit de la caryocinèse est une cellule contenant deux noyaux haploïdes identiques (Fig. 17, D). C'est à ce stade que les grains de pollen (microgamétophytes) sont habituellement libérés. Après germination du tube pollinique, un de ces noyaux devient un noyau germinatif et subit encore une mitose sans cytokinèse (caryocinèse II) pour donner deux noyaux spermatisques. Celui qui n'a pas subi de division devient un noyau végétatif (Fig. 17, E) (Robert *et al.*, 1998 & Elrord et Stansfield, 2003).

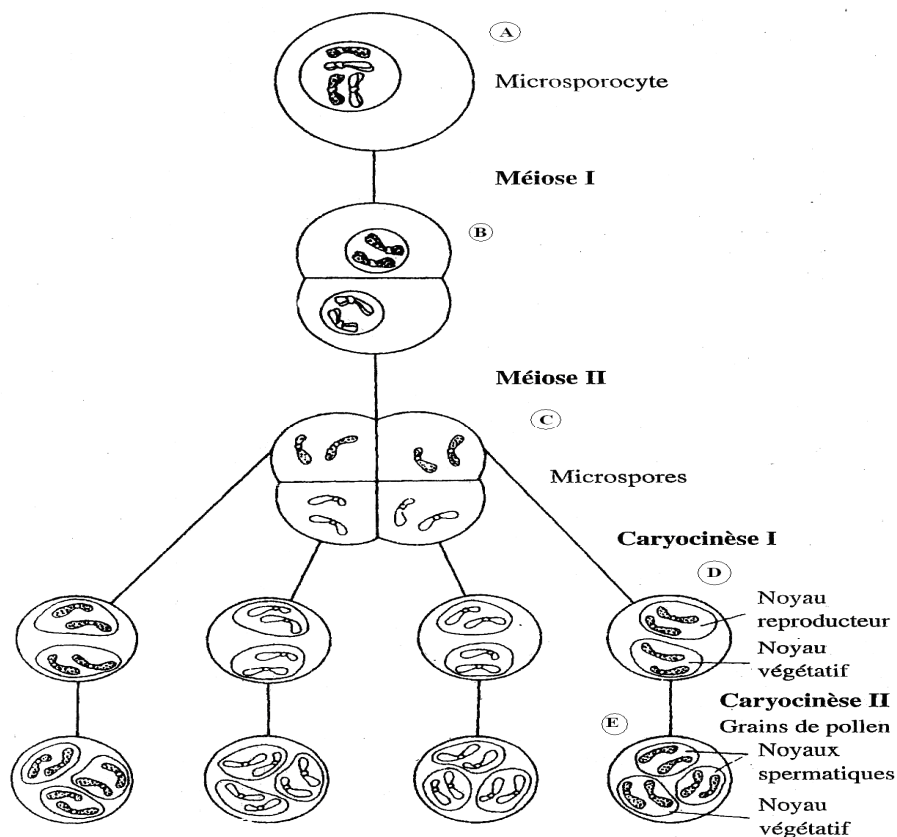


Fig. 17 : Schéma représentant les différentes étapes de la microgamétogénèse (Elrord et Stansfield, 2003).

1.3.2.2/ Méiose et macrogamétogénèse

Un bourgeonnement de la surface interne de l'ovaire est à l'origine de l'ovule où une cellule du nucelle (archésporiale) plus volumineuse que les autres, constitue le macrosporocyte cellule mère des mégaspores (Fig. 18, A).

Lors de la méiose, le mégasporocyte (Fig. 18, A) donne à la première division deux cellules haploïdes (Fig. 18, B), et à la deuxième division quatre mégaspores haploïdes linéaires (Fig. 18, C). Après la méiose, trois mégaspores dégèrent (Fig. 18, D), par contre la quatrième subit trois divisions mitotiques successives des chromosomes sans cytokinèse (caryocinèse) (Fig. 18, E, F et G), et donne un syncytium à huit noyaux haploïdes qui est le sac embryonnaire. Trois noyaux du sac embryonnaire se regroupent du côté du micropyle, dont deux se dégèrent (synergides) et le troisième se développe en oosphère. Un autre groupe de noyaux migre vers l'extrémité opposée du sac où ils dégèrent (antipodes). Les deux noyaux restants (noyaux polaires) s'unissent au centre pour donner un noyau de fusion diploïde, où il est prêt à la fécondation (Fig. 18, H) (Robert *et al.*, 1998 & Elrord et Stansfield, 2003).

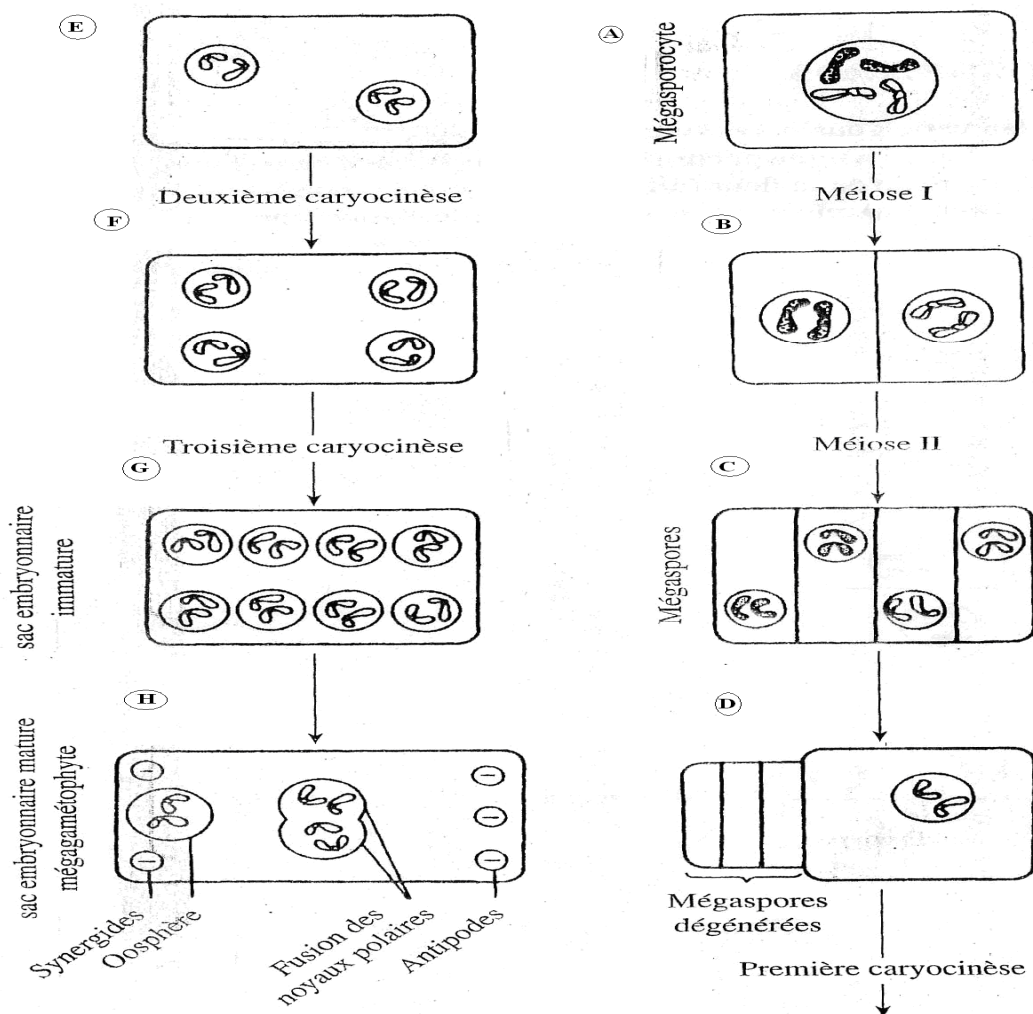


Fig. 18 : Schéma représentant les différentes étapes de la macrogamétogénèse (Elrord et Stansfield, 2003).

1.3.2.3/ Anomalies de la méiose

1.3.2.3.1/ La ségrégation chromosomique irrégulière

Elle est caractérisée par la migration précoce des chromosomes vers les pôles pendant la métaphase et des chromosomes retardataires pendant l'anaphase. Ces anomalies peuvent mener à la formation de micronoyaux, qui sont dus à la présence de chromosomes univalents pendant la diakinèse ou en métaphase, à partir des chiasmés incomplets (terminaison précoce de chiasme), ou par la présence de gènes désynaptiques et asynaptiques durant la prophase I. Cette ségrégation irrégulière se manifeste chez les hybrides. (Pagliarini, 2000 & Mendes-Bonato *et al.*, 2001).

1.3.2.3.2/ La viscosité des chromosomes

Cette anomalie peut être présente dans toutes les phases du cycle cellulaire, et même le nombre de chromosomes impliqués dans la viscosité est variable. Elle est induite par des facteurs génétiques et environnementaux. Lorsque cette anomalie se produit elle conduit toujours à dégénérescence du noyau (pynose) par une restriction extrême irréversible des chromosomes, puis la mort de la cellule (Bione *et al.*, 2000 ; Mendes-Bonato *et al.*, 2001 & Sheidai et Fadaei, 2005).

1.3.2.3.3/ La cytotoxicité

C'est un transfert de chromosomes d'une cellule à une autre, à travers des connections cytoplasmiques, dont l'origine n'est pas encore claire. Des conditions environnementales et des facteurs génétiques, non élucidés, peuvent induire cette anomalie (Love, 1938; Bass *et al.*, 2003). La cytotoxicité joue un rôle secondaire dans l'évolution qui est à l'origine des aneuploïdies et des polyploïdies (Pagliarini, 2000). Elle a été trouvée chez plusieurs plantes, *Brassica napus* et *B. campestris* (Souza et Pagliarini, 1997), dans le genre *Glycine* (Bione *et al.*, 2000), *Medicago sativa* (Bellucci *et al.*, 2003) et dans le genre *Bromus* (Sheidai & Fadaei, 2005).

1.3.2.3.4/ La formation de syncyte

Il s'agit d'une fusion de deux ou plusieurs cellules qui se trouvent généralement dans la même phase de la méiose (Mendes-Bonato *et al.*, 2001). Le syncyte peut se former soit par suppression dans la formation de la paroi lors de la mitose préméiotique, soit par fusion de cellules mères polliniques (CMP), provoquée par la dissolution de la paroi cellulaire pendant la prophase de la méiose (Mendes-Bonato *et al.*, 2001 & Mendes-Bonato *et al.*, 2006).

1.4/ Les modes de reproduction chez les plantes

Les modes de reproduction chez les plantes sont de deux types, à savoir la reproduction asexuée et la reproduction sexuée.

1.4.1/ La reproduction asexuée

C'est une multiplication sans fusion des gamètes mâles et femelles. La reproduction asexuée peut se produire, soit par les parties végétatives de la plante (Rhizomes, bulbes, tubercules), soit par l'embryon végétatif (l'apomixie). L'apomixie a été observée en 1841 par J. Smith qui a constaté que des graines pouvaient se former sans fécondation sur une plante d'*Alchornea ilicifolia* Mull., une *Euphorbiacée* dioïque. L'apomixie peut donc aboutir à la formation d'une graine où la méiose peut être interrompue ou absente et ainsi la formation d'un embryon autonome (Bhat *et al.*, 2005). Il existe deux types d'apomixie :

1.4.1.1/ L'apomixie gamétophytique

Dans ce type d'apomixie, les sacs embryonnaires sont produits à partir des cellules mères non réduites. La cellule œuf se développe en embryon parthénocarpique (Kumlehn *et al.*, 2001 & Grimanelli *et al.*, 2003 ; Bhat *et al.*, 2005). Les apomixies gamétophytiques peuvent être obligatoires ou facultatives et on en distingue deux catégories :

1.4.1.1.1/ La diplosporie

L'embryon peut provenir du développement d'une cellule mère de macropore n'ayant pas subi la réduction chromosomique tandis que, l'endosperme se développe de façon autonome (sans fécondation) à partir des noyaux polaires non réduits avec le gamète mâle réduit.

1.4.1.1.2/ L'aposporie

Dans ce cas, l'embryon se développe à partir des cellules nucellaires dans l'ovule, où plusieurs cellules de nucelle subissent le développement aposporique, mais seulement l'une d'elles conduira au sac embryonnaire mûr. Cette aposporie n'est lancée qu'après la différenciation des cellules mères de la mégaspore (CMM). La mégaspore se dégénère et le sac aposporique d'embryon se trouve à côté de l'extrémité micropylaire de l'ovule. L'embryon se développe par parthénogenèse, à partir de l'œuf non réduit, mais la pollinisation et la fécondation sont exigées pour le développement de l'endosperme (phénomène de pseudogamie) (Bhat *et al.*, 2005).

1.4.1.2/ L'apomixie sporophytique (ou l'embryon adventif)

Il résulte de différentes cellules de deux tissus du nucelle ou intertéguments (Bhat *et al.*, 2005). Il se produit avec la reproduction sexuée et en résulte ainsi des polyembryonies, comme il a été montré par De Sousa (2001) chez *Manihot esculenta*.

L'apomixie joue un rôle important dans l'évolution par transfert de gènes apomictiques et mène à l'entretien des hybrides interspécifiques stériles, comme dans le cas de *Manihot esculenta* croisé avec deux espèces sauvages du *Manihot* (Nassar, 2002) où l'apomixie a joué un rôle important dans la spéciation lors de son évolution, et en permet par la pérennité des hybrides stériles. Elle est très utilisée en agriculture pour ces caractères indépendants, car elle représente un outil énorme dans l'amélioration des méthodes de multiplication soit conventionnelles, comme dans le cas de; *Manihot esculenta* (Nassar, 2002) et *Pennisetum squamulatum* (Akiyama *et al.*, 2004) soit non conventionnelles comme le cas des aubergines (Acciarri *et al.*, 2002).

1.4.2/ La reproduction sexuée

C'est une multiplication qui nécessite la fusion des deux gamètes mâle et femelle, pour maintenir la variabilité à l'intérieur de l'espèce par des recombinaisons génétiques qui se produisent lors de la méiose et de la fécondation. (Pesson et Louveaux, 1984 & Zryd, 1988). Afin d'assurer cette variabilité ainsi que l'adaptation aux conditions de l'environnement, les plantes ont adopté plusieurs stratégies :

1.4.2.1/ Les stratégies liées au mécanisme de pollinisation

Le transfert du pollen et son dépôt sur le stigmate s'appellent pollinisation. Chez les angiospermes, elle se déroule le plus souvent quand l'ovule est pourvu, à maturité, de pollen, ce qui n'est pas le cas chez toutes les plantes à ovules (Gorenflot, 1997) et on distingue deux types de pollinisation :

1.4.2.1.1/ L'autogamie

Elle s'effectue à l'intérieur d'une même fleur ou bien entre fleurs de la même plante. Il existe des fleurs cléistogames, où la pollinisation s'accomplit dans chaque bouton florale, sans que la fleur s'ouvre, et des fleurs chasmogames (le cas le plus répandu) ce sont les fleurs qui s'épanouissent, soit pour les hermaphrodites, ou les espèces monoïques, entre fleurs de sexes différents de la même plante. La cléistogamie peut avoir des bases génétiques. Cependant, la température, la photopériode et les facteurs trophiques et hormonaux semblent jouer un rôle important. Chez *Laminum amplexicaule*, les fleurs cléistogames produites par la plante en automne présentent trois fois moins de pollen que les fleurs chasmogames formées au printemps, alors que le nombre d'ovules produits est constant dans les deux cas (Gorenflot, 1997).

1.4.2.1.2/ L'allogamie

Dans ce monde, le transfert du pollen s'effectue entre les individus appartenant à la même espèce. Ce transfert est assuré par des agents pollinisateurs liés à des adaptations de la fleur et on distingue :

- La pollinisation anémophile est assurée par le vent. Elle est très fréquente chez les Gymnospermes et les Angiospermes, et est considérée comme une acquisition secondaire liée

à l'absence d'animaux pollinisateurs dans certaines zones climatiques. L'efficacité de la pollinisation par le vent est liée à plusieurs paramètres, dont la légèreté des pollens et leur collecte par l'adaptation des surfaces stigmatiques réceptrices (e.g. stigmate plumeux et munis de nombreux trichomes chez les Graminées).

- La pollinisation zoophile est assurée involontairement par les animaux, en particulier les insectes (entomogamie) qui recherchent un abri, de la nourriture (nectar, pollen) ou un partenaire. Cette stratégie de pollinisation est en relation avec un périanthe coloré, une production de molécules odorantes et de pollen riche en réserves.
- La pollinisation par l'eau est relativement rare, elle est limitée à certaines Angiospermes aquatiques immergées (e.g. les zostères marines et les myriophylles d'eau douce), dont les pollens dépourvus d'exine ont une paroi plus hydrophile (Judd *et al.*, 2002).

1.4.2.1.2.1/ Les facteurs favorisant l'allopollinisation (Robert *et al.*, 1998)

1.4.2.1.2.1.1/ Les facteurs morpho-anatomiques (la séparation des sexes dans l'espace)

Environ 75% des Angiospermes sont hermaphrodites (les fleurs sont bisexuées), 10% sont monoïques (les fleurs sont unisexuées), mais l'individu porte les deux types de fleurs (e.g. de Fagacées). 4% des genres seulement sont dioïques, les sexes sont séparés dans l'espace et sont portés par des individus différents (e.g. asperge, ortie, peuplier). La dioïcie impose une fécondation croisée et représente un premier obstacle efficace à l'autogamie.

1.4.2.1.2.1.2/ Les facteurs physiologiques : séparation des sexes dans le temps (dichogamie)

Les organes sexués n'arrivent pas simultanément à maturité, soit par protandrie, où le pollen est libéré, alors que le stigmate du pistil est immature, soit par protogynie, où le stigmate de la fleur est réceptif, alors que les étamines ne sont pas en maturité (e.g. de Poacées, Brassicacées).

1.4.2.1.2.1.3/ Les facteurs génétiques

- **L'incompatibilité**

Le stigmate peut capter des grains de pollen de provenances diverses. Cependant, d'une manière générale seuls les grains de pollen émis par les fleurs de la même espèce qui seront germés, ils sont dits alors compatibles. Les autres grains étrangers ne germent pas, à cause de l'incompatibilité interspécifique.

L'auto-incompatibilité est l'incapacité d'une plante à produire un zygote après autopollinisation. Elle met en jeu des processus de reconnaissance entre pollen et pistil, qui peut être une inhibition stigmatique, stylaire et ovarienne. Les bases génétiques de l'auto-incompatibilité reposent sur deux types d'interactions entre le pollen et le sporophyte femelle (ovaire) : l'incompatibilité gamétophytique est déterminée par le génotype du pollen haploïde, sous le contrôle d'un locus "s" (self incompatibilité) multiallélique. L'incompatibilité

sporophytique est déterminée par le génotype du parent diploïde du pollen, sous le contrôle de deux gènes "s" multialléliques (Lord et Russell, 2002) (Fig.19).

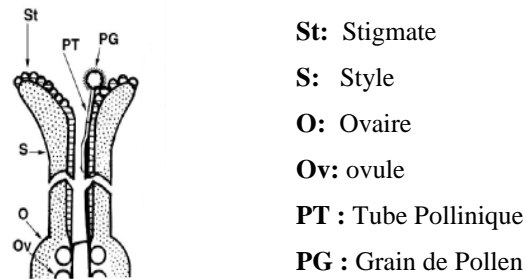


Fig. 19: Schéma montrant les différentes parties du pistil Chez Lis d'après Lord et Russell, 2002.

- **La stérilité mâle**

La stérilité mâle se caractérise par les grains de pollens non fonctionnels avec des gamètes femelles fonctionnels. Deux types de stérilité peuvent exister, ils consistent en:

- **La stérilité mâle génique**

C'est une stérilité de type mendélienne, régulée par les gènes nucléaires mutés. Elle peut être d'origine sporophytique où la plupart des formes mutantes sont homozygotes récessives "**ms/ms**", ou d'origine gamétophytique où le gène "**ms**" ne s'exprime pas complètement en F_1 . Ces gènes peuvent s'exprimer par l'absence de formation des anthères, l'avortement du pollen (anthères vides) et non déhiscence de l'étamine, comme ils peuvent réduire la fertilité femelle et affecter d'autres fonctions comme le métabolisme des hormones et la biosynthèse des molécules complexes des lipides (Robert *et al.*, 1998 & Budar et Pelletier, 2001).

- **La stérilité mâle cytoplasmique**

Ce mode de stérilité est transmis selon une hérédité de type cytoplasmique, elle est alors totalement transmise à la descendance par le cytoplasme de la plante mère et elle est contrôlée par des gènes mitochondriaux. Ces gènes peuvent s'exprimer l'avortement des spores au cours de leur formation ou pendant le déroulement de la gamétogénèse, sans affecter les organes femelles (Budar et Pelletier, 2001 ; Linke et Börner, 2005 & Duroc *et al.*, 2005).

Contrairement à la stérilité mâle génique, la stérilité mâle cytoplasmique peut être restaurée par l'existence de l'interaction mitochondrie-noyau par des gènes restaurateurs localisés dans le noyau, nommé système "**MS/ RF**". Les gènes restaurateurs de fertilité "**RF**" ont la capacité de supprimer le phénotype mâles- stériles et par conséquent de restituer la production du pollen aux plantes portant les génomes mitochondriaux délétère (Pesson et Louveaux, 1984; Budar et Pelletier, 2001 & Linke et Börner, 2005). Ces systèmes de restauration de la fertilité pollinique se

trouvent généralement dans les populations gynodioïques et peuvent être fixés dans ces populations qui redeviennent, par conséquent hermaphrodites (Budar et Pelletier, 2001).

- L'intérêt de la stérilité mâle

Dans la création de variétés hybrides le système MS/RF est très utile puisqu'il permet de produire des pieds mâles stériles évitant ainsi les castrations manuelles dans les croisements à pollinisations contrôlées (Pesson et Louveaux, 1984 & Budar et Pelletier, 2001). La stérilité mâle a déjà trouvé une très large application dans l'obtention de semences hybrides du maïs, et il en est de même pour le sorgho, la betterave sucrière, le blé pour respectivement 90%, 60% et 85% des surfaces cultivées, aux Etats-Unis (1984). Elle est étendue à la plupart des productions agricoles pour la production de variétés hybrides chez le maïs, le riz, le tournesol, le colza et plusieurs légumes (Pesson et Louveaux, 1984).

1.4.2.2/ Les stratégies liées au mécanisme de fécondation

La fécondation chez les plantes à fleurs peut être comprise comme la succession de deux phases, dans l'espace et dans le temps :

- **La phase progamique**

C'est la phase d'interaction du gamétophyte mâle et le sporophyte femelle. Elle comprend quatre étapes à savoir l'hydratation, la germination du pollen, la pénétration du tube dans le style et sa croissance. Lorsque le grain de pollen se dépose sur le stigmate, il s'hydrate au contact des papilles stigmatiques par la différence du potentiel hydrique qui induit un mouvement d'eau des tissus stigmatiques à travers les pores du pollen. Le grain alors, émet un tube par l'un des pores. Pour que le tube pollinique pénètre dans le style, il suit soit le canal du style qui est tapissé de cellules papilleuses couvertes de mucilage dans les styles ouverts, soit il passe entre les cellules du tissu de conduction, dans la lamelle moyenne, dont les composés pectiques sont solubilisés par des enzymes (pectinases). Ces dernières sont secrétées par l'extrémité du tube pollinique. La croissance du gamétophyte mâle dépend des tissus du pistil, et il est toujours orienté vers le sac embryonnaire (Lord et Russell, 2002).

- **La phase syngamique**

Elle recouvre tous les phénomènes qui se déroulent au niveau du sac embryonnaire au moment de l'arrivée du tube pollinique. Arrivé à l'ovule, généralement, il pénètre par le micropyle (acrogamie) ou exceptionnellement par la chalaze (Chalazogamie) et il s'allonge jusqu'au sac embryonnaire, où la double fécondation se réalise (Pesson et Louveaux, 1984 & Zryd, 1988).

1.5/ Le déterminisme du sexe chez les Angiospermes

Chez les Angiospermes environ 70% des genres sont des hermaphrodites, où les deux sexes mâle et femelle sont portés par le même individu. Environ 4% des genres répartis chez les trois quarts des familles étudiées sont totalement dioïques : les deux sexes mâle et femelle sont portés par des individus différents. Mais, même si les deux sexes coexistent sur un même individu, celui-ci peut fonctionner physiologiquement comme mâle ou femelle au cours du temps, qui se traduit par la protandrie ou la protogynie. Les différents types de répartition des sexes et leur distribution chez les plantes à fleurs sont présentés respectivement dans les Tab.2 et Tab.3.

Tab. 2: Principaux cas de répartition des sexes existant chez les Angiospermes (Robert *et al.*, 1998).

Espèces monomorphiques	Espèces polymorphiques
<p>Hermaphroditisme ♂ : étamine et carpelle sur la même fleur</p> <p>Monoécie : étamine et carpelle sur un même pied mais dans des fleurs séparées.</p> <p>Andromonoécie : fleurs ♂ et fleurs ♀ sur un même pied mais dans des fleurs séparées</p> <p>Gynomonoécie : fleurs ♂ et fleurs ♀ sur un même pied mais dans des fleurs séparées.</p> <p>Polygamie : fleurs ♂, fleurs ♀ et fleurs ♂ sur un même pied mais sur des fleurs séparées.</p>	<p>Dioécie : fleurs ♂ et ♀ sur des pieds différents</p> <p>Androdioécie : fleurs ♂ et fleurs ♂ sur des pieds différents</p> <p>Gynodioécie : fleurs ♂ et fleurs ♀ sur des pieds différents</p> <p>Trioécie : fleurs ♂, fleurs ♂ et fleurs ♀ sur des pieds différents.</p>

Tab. 3: Pourcentages des genres et des espèces appartenant aux principaux types de sexualité sporophytique (réalisés sur près de 10 000 genres, 2 000 de mono- et 8 000 de dicotylédones soit environ 125 000 espèces) d'après les travaux de Yampolsky et Yampolsky, 1922 in Robert *et al.*, 1998).

Type sexuel	Monocotylédones		Dicotylédones	
	Genres	Espèces	Genres	espèces
Monomorphique				
• Hermaphrodite	74	73	73	71
• Monoécie	14	10	7	4
• Autres cas (andromonoécies, gynomonoécies, polygamie)	6	7	8	7
Polymorphique				
• Dioécie	4	3	6	4
• Autres cas (androdioécie, gynodioécie, trioécie)	2	7	1	14

1.5.1/ Les facteurs complémentaires du déterminisme du sexe (Pesson et Louveaux, 1984; Robert *et al.*, 1998 & Meyer *et al.*, 2004).

1.5.1.1/ Le déterminisme génétique

- **Chez les espèces monoïques** comme le concombre, tous les bourgeons floraux passent par un stade de développement bisexué et deviennent ensuite mâles ou femelles. A la base de l'inflorescence, les fleurs sont mâles alors qu'elles deviennent femelles en haut. Il existe sur un chromosome plusieurs gènes impliqués dans la formation des organes sexuels (étamines ou carpelles), dont l'expression serait progressive au cours du temps (mâle puis femelle).
- **Chez les espèces dioïques**, deux cas de figure existent. Le premier est rare et correspond à l'existence de chromosomes sexuels (ou hétérochromosomes), X et Y comme dans le cas des animaux. Dans le deuxième cas, le déterminisme du sexe est en relation avec le rapport entre le nombre d'autosomes et le nombre d'hétérochromosomes. Ce rapport correspond au cas de la drosophile.

1.5.1.2/ Les facteurs environnementaux

Les températures élevées (40°C) sont en générale masculinisantes, alors que les faibles températures (8-10°C) sont au contraire féminisantes. Chez certaines plantes, la lumière intervient également, mais avec des effets très différents selon les cas. Les jours courts peuvent par exemple être féminisant (*Xanthium*) ou masculinisant (*épinard*).

1.5.1.3/ Les facteurs internes

Les phytohormones (éthylène, gibbérellines, cytokinines, auxine) participent aussi dans le déterminisme sexuel. Comme dans le cas des facteurs environnementaux, où il n'y a pas de règle générale, les phytohormones impliquées sont différentes. En outre, une même phytohormone peut avoir des effets variés selon les végétaux, par exemple l'éthylène qui est féminisante chez les Cucurbitacées, le blé ou la vigne, est masculinisante chez le maïs.

1.6/ Les techniques d'hybridation chez les plantes à fleurs

La voie la plus efficace pour introduire des gènes dans les génomes des plantes à améliorer, ou pour vérifier les flux de gènes existant entre les espèces, est la reproduction sexuée, qui est la voie la plus naturelle. Si le zygote hybride n'est pas viable; la culture *in vitro* aide à surmonter cet obstacle, et si le croisement est impossible; la technique de fusion des protoplastes l'hybridation somatique est utilisée.

1.6.1/ L'hybridation par voie sexuée *in vivo*

Cette technique repose sur les modes de reproduction, et de pollinisation en particulier. La structure florale (taille, forme) détermine la technique d'hybridation à utiliser. Les principales étapes de l'hybridation sexuée sont:

1.6.1.1/ La castration

La castration ou la déstamination est une étape d'élimination mécanique ou chimique de l'organe mâle, sans affecter l'organe femelle. La castration chez les espèces monoïques se fait par élimination des fleurs mâles, comme le cas du maïs. Chez les espèces dioïques, on procède tout simplement à l'élimination des plantes mâles indésirables (Williams *et al.*, 1999 & Frank et Santamour, 2002). Chez les plantes à fleurs hermaphrodites, la castration est souvent difficile à réaliser. Les techniques de castration utilisées dans ce cas sont :

1.6.1.1.1/ La castration manuelle

Il s'agit d'éliminer les anthères des fleurs du parent femelle par des outils simples (pinces, ciseaux, cure-dents,...), chez les plantes à grandes fleurs (Lammerts, 1929; Connor, 1967; Williams et Verry, 1981; Motley et Carra, 1998; Wang et Cruzan, 1998; Lichtenzveig *et al.*, 2000; Navabi *et al.*, 2003; Showemimo, 2003; Gibbs *et al.*, 2004 & Fishman et Willis, 2005).

Chez les plantes à petites fleurs, la castration peut se faire par des outils plus fins sous une loupe binoculaire si nécessaire (eg. aiguilles) (Ledingham, 1940; Simon et Millington, 1967; Lesins *et al.*, 1971; Singh et Lesins, 1972; Lesins et Erac, 1968 & De Haan et Barnes, 1998).

Généralement la castration se fait une seule fois avant l'anthèse. Selon le cas, la castration se fait à l'âge du bouton floral (*e.g. Fragacia*) (Sargent *et al.*, 2004), ou à l'ouverture de la fleur (Oddie et Mc Comb, 1998). Dans le cas des Ombellifères, la castration doit se répéter plusieurs fois au cours du temps, au fur et à mesure que les fleurs de l'ombelle se développent. Le principe fondamental de la castration est d'éliminer les étamines avant leur déhiscence pour éviter l'autopollinisation (Badoc *et al.*, 1995).

1.6.1.1.2/ La castration par aspiration

Dans ce cas les anthères sont aspirées à l'aide d'une pompe à vide (Ledingham, 1940 & Smith, 1954). Cette technique est employée le plus souvent pour les plantes à petites fleurs dès l'ouverture de la fleur, suivie d'un rinçage à l'eau pour éviter l'autopollinisation. Cette méthode de castration n'est pas efficace chez les plantes autogames (Lafon *et al.*, 1990).

1.6.1.1.3/ La castration par traitement à l'eau

Elle consiste à traiter les inflorescences florales (petites fleurs) avant l'anthèse par de l'eau chaude par arrosage (les grains de pollen sont plus sensibles que les organes reproducteurs femelles aux facteurs génétiques et environnementaux). Chez les plantes à grandes fleurs les étamines sont traitées par de l'eau froide par imbibition (Burke, 2002).

1.6.1.1.4/ La castration par traitement à l'alcool

Les fleurs sont traitées par une concentration à l'alcool inhibant seulement les étamines (57% chez la luzerne), pendant une brève période suivie d'un rinçage à l'eau (Lesins, 1955).

1.6.1.1.5/ La castration par des agents gamétocides (CHA, Chemical Hybridising Agents)

Les gamitocides sont des agents chimiques utilisés pour inhiber sélectivement le gamète mâle sans affecter le gamète femelle, ils sont appliqués à des concentrations et à des périodes appropriées dépendant de l'âge de la plante, du mode d'application et de l'espèce. Ils sont généralement employés pour éviter la castration manuelle, lors de la production des semences commerciales en grande quantité telles que le blé (Graham, 1986; Wong *et al.*, 1995; Streiff *et al.*, 1997; Nesvadba *et al.*, 2001 & Loussaert, 2004). Ces agents gamitocides peuvent, selon le cas, être appliqués au sol, directement sur les fleurs ou sur les parties végétatives avant la floraison. Comme exemple de produits gamitocides citons le cupferon, le neocuproïne, le benzotriazole et le cuprizone (Graham, 1986), le trifluorométhylsulfonamide Loussaert, 2004), et le SC2053 (sogital compound) (Wong *et al.*, 1995 & Streiff *et al.*, 1997).

1.6.1.1.6/ La castration génétique

Elle s'effectue par un choix de plantes de lignée mâle stérile, mais femelle fertile croisées avec des plantes mâles fertiles. Elle est très utilisée en agronomie pour la production de graines hybrides commerciales (Faure *et al.*, 2002 & Lafon *et al.*, 1990).

1.6.1.2/ L'ensachage

Cela consiste à couvrir les fleurs castrées par des sachets de appropriés et de taille convenables selon les fleurs, pour éviter toute contamination par des pollens étrangers (Ledingham, 1940; Lesins *et al.*, 1971; Gibbs et Sasaki, 1998; Wang et Cruzan, 1998 & Frank et Santamour, 2002).

1.6.1.3/ La pollinisation

C'est la deuxième importante étape après la castration. Sa réussite dépend du temps où le stigmate est réceptif et de la période de pollinisation. L'apport du pollen sélectionné peut être assuré par :

1.6.1.3.1/ La pollinisation manuelle

L'apport du pollen est effectué par un outil (pinceau, cure dent, brosse) en le frottant dans un récipient qui contient du pollen sélectionné à l'état frais ou stocké (Lammerts, 1929; Connor, 1967; Motley et Carra, 1998; Wang et Cruzan, 1998; Bissuel-Belaygue *et al.*, 2002; Wiegrefe et Berg, 2003 & Fishman et Willis, 2005). On peut aussi appliquer directement la fleur mâle non castrée à la fleur femelle immédiatement après sa castration (Lesins *et al.*, 1971; De Haan et Barnes, 1998 & Chen, 1999).

1.6.1.3.2/ La pollinisation par le vent

La pollinisation s'effectue dans les champs avec des stratégies dépendantes de la direction des vents et de la technique de plantation (Pesson et Louveaux, 1984). Pour le maïs, on alterne deux rangées de la variété mâle avec une rangée de la variété femelle, et toute la surface exploitée est entourée par la variété mâle (Lafon *et al.*, 1990).

1.6.1.3.3/ La pollinisation entomogame

Elle est réalisée, soit au champ, soit sous abris par l'apport d'un insecte pollinisateur supportant les conditions de confinement (Morison *et al.*, 2000 & Ortiz-perez *et al.*, 2006).

1.6.1.4/ L'étiquetage

Juste après l'ensachage les fleurs sont marquées à l'aide d'un fil en l'attachant à l'inflorescence ou à la fleur, et marqués la date de castration, et de pollinisation.

1.6.2/ Les techniques d'hybridation sexuée *in vitro*

Cette technique consiste à réaliser une pollinisation et une fécondation *in vitro*, afin de surmonter les barrières d'incompatibilité ou de l'auto-incompatibilité prézygotique (pistil-pollen) (Zrýd, 1988).

1.6.2.1/ Les méthodes de pollinisation

La plupart du temps le pollen est prélevé un jour avant l'anthèse et cultivé dans des milieux solidifiés par la gélose. La pollinisation se réalise selon le type d'incompatibilité.

- Si l'incompatibilité est stigmatique ; directement sur l'organe femelle débarrassé de son stigmate un liquide stigmatique est ajouté, puis saturé immédiatement avec du pollen. C'est la méthode du stigmate coupé (CSM) (Van Tuyl *et al.*, 1991 & Kranz *et al.*, 1998).

- Si l'incompatibilité est stylaire ; le pollen est d'abord posé sur un stigmate compatible pour la germination. Après sa germination, le style est coupé, ensuite attaché à l'ovaire au style coupé de l'autre plante. C'est la méthode du modèle greffé (GM/M) (Van Tuyl *et al.*, 1991 & Kranz *et al.*, 1998).
- Si l'incompatibilité est ovulaire ; elle nécessite l'isolement des gamètes mâles et femelles et une microculture du zygote (Wang *et al.*, 2006).

1.6.2.2/ Les méthodes de cultures

1.6.2.2.1/ Les milieux de cultures

La culture *in vitro* s'effectue dans des phytotrons (chambre de culture), dans des conditions aseptiques. Les tissus ou les organes végétaux exigent de l'eau, des sels minéraux, une source de carbone et diverses substances stimulant la croissance : comme le lait de coco, les vitamines, les hormones etc... Les milieux de cultures doivent assurer un développement optimal des tissus ou des organes. Le milieu de Muraschine et Skoog (Tab.4) est le plus utilisé.

La croissance et la survie des embryons sont très influencées par la composition des solutions nutritives en sels minéraux. Les embryons doivent aussi avoir une source d'énergie par le saccharose et une source en acides aminés pour le métabolisme azoté, où la glutamine et l'asparagine sont les plus importants.

Tab. 4 : Composition du milieu de culture de MMS (Milieu Muraschine et Skoog) (Robert *et al.* 1998)

Macromolécule (sels)		Oligoéléments		Substances organiques		Ph
NH ₄ NO ₃	1 650 mg. L ⁻¹	KI	0,83 mg. L ⁻¹	Glycine	2 mg. L ⁻¹	5,7
KNO ₃	1 900 mg. L ⁻¹	H ₃ BO ₃	6,2 mg. L ⁻¹	Myo-inositol	100 mg. L ⁻¹	
CaCl ₂ , 2H ₂ O	440 mg. L ⁻¹	MnSO ₄ ,4H ₂	22,3 mg. L ⁻¹	Acide niotinique	0,5 mg. L ⁻¹	
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	370 mg. L ⁻¹	MnSO ₄ ,H ₂ O		Pyridoxine HCl	0,5 mg. L ⁻¹	
K H ₂ PO ₄	170 mg. L ⁻¹	ZnSO ₄ ,7H ₂ O	8,6 mg. L ⁻¹	Thiamine HCl	0,1 mg. L ⁻¹	
		NaMoO ₄ ,2H ₂ O	0,25 mg. L ⁻¹	AIA	1- 30 mg. L ⁻¹	
		CuSO ₄ ,5H ₂ O	0,025 mg. L ⁻¹	Kénétine	0,04- 10 mg. L ⁻¹	
		CoCl ₂ ,6H ₂ O	0,025 mg. L ⁻¹	Saccharose	30 g.L ⁻¹	
		Na ₂ -EDTA	37,3 mg. L ⁻¹			
		FeSO ₄ ,7H ₂ O	27,8 mg. L ⁻¹			

Les hormones sont aussi considérées comme des éléments essentiels et complémentaires aux milieux de culture. Parmi les hormones les plus importantes on trouve : Auxine (l'acide B-indolhylacétique (AIA), l'acide indolhylbutyrique A et B, l'acide naphtylacétique (ANA) et l'acide 2,4 dichlorophenoxyacétique (2,4-D), Cytokinines (la kinitine : 6-furfury- laminopurine) et les gibbérellines (la gibbérelline A₃ : GA₃) (Zryd, 1988 & Scriban, 1999).

1.6.2.2/ La méthode de culture d'embryon

Lorsque le zygote est formé, il doit entreprendre le processus normal de l'embryogenèse dans des conditions adaptées à son développement qui doivent être identiques à celles développées sur la plante mère, sinon l'embryon dégénère. Les principales méthodes sont :

- Culture d'embryon isolé à partir de l'ovule (Bauchan, 1987 ; De Jeu et Jacobsen, 1995; Kumlehn *et al.*, 1997 & Tomasi *et al.*, 2002);
- Culture d'embryon *in ovulo*, sans isoler l'embryon (Emershad et Ramming, 1984 ; Beasley, 1987; Emershad *et al.*, 1989 ; De jeu et Jacobsen, 1995 ; Kumlehn *et al.*, 1997 & Miajima, 2006) ;
- Culture d'ovule-embryon en faisant une culture d'embryon *in ovulo* pour un certain temps, et en isolant ensuite l'embryon de l'ovule avec changement de milieu de culture (McCoy & Smith, 1986; Przywara *et al.*, 1989 ; Van Tuyl *et al.*, 1991; De jeu et Jacobsen, 1995 ; Yao et cohen, 1996 ; Chi, 2002 ; Rhee *et al.*, 2005 & Yao et Cohen, 1996).
- Culture du zygote (Li et Yang, 2000 & Wang *et al.*, 2006).

Ces différentes techniques sont aussi utilisées comme des techniques de sauvetage des hybrides obtenus *in vivo*, lorsque la plante mère n'arrive pas à assurer le développement de l'embryon. Cette inaptitude du zygote hybride est due à des phénomènes d'incompatibilité post-zygotiques qui se traduisent par une mauvaise nutrition de l'embryon par la plante mère. La culture des embryons dans des milieux synthétiques permet d'apporter à leur voisinage les éléments nutritifs qui *in vivo* leur font défaut (Zrýd, 1988 & McKersie et Brown, 1997).

1.6.3/ Hybridation somatique

Les méthodes de l'amélioration des plantes qui utilisent l'introgession du matériel génétique entre espèces éloignées se heurtent aux diverses barrières qui assurent l'intégrité de l'espèce. Pour surmonter ces barrières, l'idée de fusion des cellules somatiques, contournant ainsi les systèmes de reproduction sexuée, est le seul moyen de mélanger des cytoplastes et donc de confronter les génomes chloroplastiques et mitochondriaux.

1.6.3.1/ La préparation des protoplastes

La paroi cellulosique assure la rigidité pour contrecarrer les pressions osmotiques du milieu intérieur et extérieur de la cellule. Pour remplacer cette pression et éviter l'explosion des protoplastes, des agents plasmolisants à base de sels minéraux (ex. CaCl₂) et de sucre (manitol ou le sorbitol) sont utilisés. L'élimination de la paroi cellulosique est assurée par des traitements enzymatiques qui hydrolysent les liaisons glycosidiques des polysaccharides pariétaux. Trois classes d'enzymes sont nécessaires pour la digestion de la paroi cellulaire; les cellulases, les hemicellulases et les pectinases qui, dans la plupart des cas, sont présentes toutes les trois. Les solutions sont préparées à des concentrations variables, selon les espèces et l'explant utilisé (feuilles, racines, cotylédons, cal,...).

Après le traitement enzymatique, les enzymes sont éliminées par un lavage et les protoplastes sont récupérés par une filtration ou par une centrifugation. Immédiatement après leur isolement, les protoplastes sont suspendus dans une solution de fusion qui dépend de l'espèce étudiée, de l'explant utilisé et des conditions d'incubation (durée, température, éclairage) (Demarly et Sibi, 1996; McKersie et Brown, 1997 ; Scriban, 1999 & Haïcour, 2000).

1.6.3.2/ Les méthodes de fusion

1.6.3.2.1/ La méthode chimique

Les éléments chimiques utilisés sont les sels minéraux ou le polyéthylène glycol (PEG). Ce dernier est le plus fréquemment employé pour la fusion des cellules. Sa formule chimique est $[\text{HOCH}_2 - (\text{CH}_2\text{-O- CH}_2)_n - \text{CH}_2\text{OH}]$ (Smith *et al.*, 1976; Rambaud *et al.*, 1993; Mendes *et al.*, 2001; Kulawiec *et al.*, 2003).

1.6.3.2.2/ La méthode physique

Les protoplastes sont mis en suspension dans une solution de faible conductivité et soumis à un champ électrique alternatif fort. Sous une brève impulsion de courant continu, Les protoplastes s'accrochent en forme de chaînes ou de perles après ils se fusionnent (Fehér *et al.*, 1992 ; Pupilli *et al.*, 1995 & Nenz *et al.*, 1996).

1.6.3.3/ Les produits de fusion

La fusion se produit d'une manière aléatoire, elle est due aux relations de voisinage des protoplastes et à la neutralisation des charges. Divers événements peuvent avoir lieu : des homofusions, des hétérofusions et des fusions partielles. Lors de l'accolement de deux protoplastes, l'ensemble du contenu cellulaire est mis en commun et peut aboutir à l'addition totale des trois compartiments héréditaires (nucléaire, mitochondrial, chloroplastique), ce qui accroît le niveau de ploïdie de l'unité résultante. Au niveau nucléaire, les échanges inégaux aboutissent à une addition incomplète ou à un microplaste résiduel. Des éliminations et des compétitions se mettent en place, elles peuvent entraîner l'élimination partielle ou du génome nucléaire d'un des parents. Dans le compartiment mitochondrial, les phénomènes sont encore plus complexes, car ils comportent des compétitions entre les vitesses de la réplication et des auto- et hétéro-recombinaisons en des sites privilégiés, où il peut y avoir des populations contenant les dosages intermédiaires entre l'addition totale et l'absence de l'un des types. Pour les chloroplastes, l'un des types parentaux est totalement éliminé, il ne subsiste qu'une seule population de chloroplastes. La recombinaison des chloroplastes est un événement rare.

En général, si les noyaux subsistent par addition totale ou partielle, le produit est un hybride somatique, et si seulement un seul noyau subsiste, le produit est un cybride (Demarly et Sibi, 1996; McKersie et Brown, 1997; Scriban, 1999; Haïcour, 2000; Fitter *et al.*, 2005 & Sun *et al.*, 2005).

1.6.3.4/ Sélection et identification des produits de fusion

Le traitement d'un mélange de protoplastes par un procédé de fusion conduit toujours à la formation d'homocaryons, d'hétérocaryons, et aussi de protoplastes non fusionnés. Ainsi, la sélection constitue une étape essentielle dans l'hybridation somatique pour isoler le plus possible les structures cellulaires hybrides. Cette sélection dépend des espèces, voire des génotypes en jeu. Plusieurs systèmes de sélection sont utilisés :

- La complémentation de résistance à des molécules chimiques, antibiotiques et herbicides ;
- Le repérage visuel sous microscope, par utilisation des différents types de protoplastes (albinos ou chlorophylliens) ou des marquages vitaux permettant l'identification des partenaires ;
- La régénération d'un grand nombre d'individus suivis de tris basés sur des caractères morphologiques intermédiaires ou biochimiques.

Afin de vérifier et confirmer la nature hybride, il existe plusieurs types d'analyses basées sur la morphologie intermédiaire, la détermination du niveau de ploïdie par cytométrie en flux, l'analyse génétique (ségrégation de certains caractères) (McKersie et Brown, 1997; Scriban, 1999 & Haïcour, 2000).

L'évolution des cellules hybrides est étroitement liée à la nature de fusion. Or la fusion de protoplastes est possible quelque soit la distance entre les espèces parentales, mais à des niveaux variés qui aboutissent à:

- Des fusions entre espèces d'une même famille produisant des remaniements, des échanges et des insertions chromosomiques intéressantes; (Rose *et al.*, 1996 ; Mends *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2004 ; olivares- Fuster *et al.*, 2002 ; Costa *et al.*, 2004 & Yan *et al.*, 2004) ;
- Des fusions jumelées ou asymétriques à irradiation d'un des partenaires, qui augmentent les hybridations incomplètes (Dudits *et al.*, 1987 ; Fehér *et al.*, 1992; Srebniak *et al.*, 2002 & Gounaris, 2005) ;
- Des constructions cytoplasmiques nouvelles et de nouveaux rapports noyau-réseau épigénique, ce qui n'est pas exploitable avec les hybrides conventionnels (Sun *et al.*, 2005, Fitter *et al.*, 2005; Sigareva et Earle, 1997 & Ilcheva *et al.*, 2001) ;
- Des montées de niveau de ploïdie qui ne s'accompagnent pas d'un accroissement de la consanguinité. En effet, l'autodoublement d'un stock chromosomique par les agents mitoclassiques comme la colchicine entraîne une augmentation de l'homozygotie et des dépressions due à la consanguinité résultante (Cluster *et al.*, 1996 & Haïcour, 2000).

1.7/ Les hybridations dans le genre *Medicago*

1.7.1/ La biologie florale

Les fleurs de *Medicago* de couleur jaune chez la majorité des espèces sont groupées en inflorescences. La fleur du genre *Medicago* est constituée de 5 pétales partiellement joints à la base: 1 grand pétale dorsal (l'étendard), 2 petits pétales latéraux (les ailes) et 2 pétales inférieurs soudés entre eux (la carène) (Fig.20). Ces dernières pièces florales insèrent et maintiennent sous une tension considérable la colonne sexuelle, formée par le pistil et les 10 étamines dont 9 sont soudés par leur filet et engainant le pistil (Pesson et Louveaux, 1984).

Le stigmate a une forme fongiliforme avec un anneau basal entouré de papilles et un apex dépourvu d'une excroissance papilleuse (Small et Brookes, 1983). Les ovules sont de forme courbée et leur nombre varie selon les espèces. La forme du pollen n'est pas la même pour tout le genre de *Medicago* ; quelques groupes ont une forme cylindrique ou fusiforme et d'autres ont une forme pyramidale triangulaire. Chez les *Intertextae* les grains de pollen matures prennent une forme cubique en comparaison au groupe possédant la forme pyramidale (Lesins et Lesins, 1979).

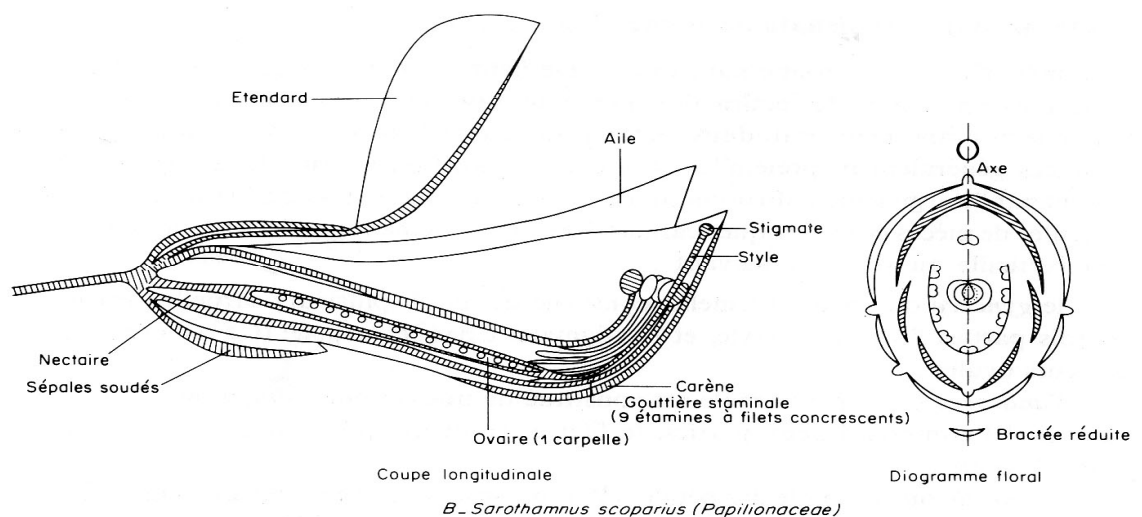


Fig. 20: Coupe sagittale d'une fleur de luzerne (d'après Mc Gregor, 1976 in Pesson et Louveaux, 1984).

La comparaison entre les fleurs de 16 espèces pérennes avec 29 espèces annuelles du genre *Medicago* montre que la taille des fleurs est corrélée avec le système de croisement; la taille des fleurs des espèces pérennes allogame est à la moyenne de $7,6 \pm 0,37$ mm, et celle des fleurs des espèces annuelles est à la moyenne de $5,1 \pm 0,29$ mm. Chez l'espèce annuelle *M. lupulina*, les fleurs sont plus petites (≈ 3 mm). Les espèces annuelles ont une structure typique ; l'étendard est beaucoup plus long que les ailes qui sont relativement plus longues que la carène.

La majorité des espèces du genre *Medicago* s'ouvrent après le déclenchement de la fleur, la libération et mise en évidence des organes reproducteurs peut être spontanée ou provoquée par les insectes butineurs. La colonne sexuelle de la fleur déclenchée reste définitivement appliquée contre l'étendard. Contrairement aux espèces pérennes, les espèces annuelles sont rarement

visitées par les insectes butineurs, à l'exception de *M. intertexta* (Heyn, 1963), et les fleurs peuvent aussi être non déclenchées. Le nombre des fleurs non déclenchées varie selon les espèces, il est de 6 à 12% chez *M. arabica*, *M. intertexta*, *M. orbicularis*, *M. scutellaria* et *M. turbinata*. Ceci est valable aussi au sein de la même espèce, chez *M. lupulina* il est de 1 à 35% dans différentes conditions de croissances.

Les observations microscopiques à fluorescences des boutons floraux et des fleurs non déclenchées de ces espèces annuelles montrent qu'il y a un développement précoce des gamétophytes mâles et femelles ceci par la présence des grains de pollen germés, et la réalisation de la double fécondation chez certains cas ; conditions préalables des boutons cleistogames. Les fleurs cleistogames et chasmogames sont difficilement distinguables, car elles peuvent se réunir sur une même plante et même sur une même grappe. La cleistogamie peut être donc obligatoire ou facultative (Novoselova, 2003).

1.7.2/ Les barrières d'isolement reproducteur et flux de gènes chez *Medicago*

La majorité des espèces pérennes sont allogames interfertiles, avec des niveaux d'autofécondation variables mais non négligeables (Genier *et al.*, 1992). Une même espèce peut présenter des plantes de ploïdies différentes, peu ou pas interfécondes. C'est le cas de *M. sativa*, *M. falcata*, *M. prostrata*, *M. papillosa* et *M. arborea* (Prosperi *et al.*, 1995).

Dans le complexe *M. sativa*- *M. falcata*, les hybrides sont facilement obtenus, si les deux espèces ont le même niveau de ploïdie. Si le nombre de chromosomes est différent les hybrides seront difficilement obtenus. En effet, *M. falcata* de forme diploïde ($2n = 2x = 16$) ne s'hybride pas facilement avec *M. sativa* de forme tétraploïde ($2n = 4x = 32$). Lorsque *M. falcata* est le parent femelle, la fécondation se produit et l'embryon précoce se développe lentement durant deux semaines il y a avortement de l'ovule, alors que l'ovaire continue à se développer. Lorsque *M. sativa* est le parent femelle la fécondation se déroule lentement, et le développement de l'embryon et de l'endosperme s'arrête après le deuxième jour de la fécondation. Dans les croisements réciproques de *M. falcata* et *M. sativa*, le développement de la graine dépend de la différence du taux de l'activité et de la division cellulaire lancée dans l'endosperme lors de la fécondation où le rôle du nombre de chromosomes des noyaux mâle et femelle est d'une grande importance. Même si le développement de l'endosperme et de l'embryon se déroule lentement, il est évident que certaines parties de l'ovule ou de l'ovaire se développent jusqu'à ce que l'avortement de l'embryon se produise (Ledingham, 1940).

Seulement deux hybrides triploïdes ont été obtenus lorsque *M. sativa* est le parent femelle. Habituellement, 8 bivalents et 8 univalents sont formés en première métaphase, et quelques gamètes femelles étaient viables dans le croisement entre les deux parents. La F₂ est fortement variable mais les caractères, couleur des fleurs, type de gousses et le nombre de chromosomes sont semblables à ceux de *M. sativa*. Lorsque *M. falcata* est le parent femelle, seulement quelques hybrides tétraploïdes ont été obtenus. La couleur des fleurs et le type de gousses sont semblables à ceux de *M. falcata*. La fertilité de ces hybrides tétraploïdes est élevée, 16 bivalents sont formés en première métaphase. La F₂ est fortement viable, les chromosomes homologues

sont bien appariés. La forme diploïde de *M. falcata* ne s'hybride pas facilement avec *M. sativa* en raison du développement défectueux qui se déroule après la fécondation (Ledingham, 1940).

Sangduen *et al.* (1983) ont étudié le type d'incompatibilité par les observations microscopiques des grains de pollen en phase de germination et la croissance des tubes polliniques entre les espèces annuelles (*M. scutellata*, *M. disciformis* et *M. rigidula*) et l'espèce pérenne (*M. sativa*) après l'intrapollinisation, l'interpollinisation et l'autopollinisation. L'autopollinisation des espèces annuelles autofertiles et la pollinisation intraspécifique des individus pérennes des croisements fertiles sont caractérisées par un taux de germination des grains de pollen très élevé et une croissance normale (rapide) des tubes polliniques. Le taux de germination des grains de pollen est très bas avec une croissance anormale des tubes polliniques dans la pollinisation interspécifique des espèces annuelles autofertiles, et dans l'autopollinisation de l'espèce pérenne autostérile. La stérilité ou l'incompatibilité s'exprime après la fécondation, puisque la fécondation a eu lieu dans tous les croisements réalisés.

Les espèces annuelles du genre *Medicago* sont à prédominance autogame et présentent de fortes barrières d'interfécondité spécifique. Ces barrières d'interfécondité ne sont pas toujours efficaces, il existe souvent des flux de gènes entre des taxons végétaux différents (Rieberg et Morefield, 1995 in Judd *et al.*, 2002).

Chérifi *et al.* (1993) ont trouvé qu'une population de *M. intertexta* s'est isolée de son groupe d'origine et de celui de *M. ciliaris* en se singularisant par un taux de fertilité des grains de pollen relativement faible (57%) et une baisse du nombre de gousses formées par grappe. Cette population intermédiaire de *M. intertexta* semble présenter des similarités morphologiques avec celle de *M. ciliaris*. Cette situation particulière traduirait la possibilité d'hybridation entre les deux espèces. Ces résultats ont été confirmés par l'étude enzymatique de Chérifi (1996), où il a montré que la population intermédiaire présente une similitude enzymatique importante avec les populations de *M. ciliaris*, et occupe ainsi une position intermédiaire. Cette situation appuie l'hypothèse de la présence de flux génique entre *M. ciliaris* et *M. intertexta*. D'après les études des systèmes enzymatiques de Small *et al.* (1999), *M. intertexta* est l'espèce la plus polymorphe ; elle possède un grand nombre de loci polymorphes et une grande diversité allélique. Ainsi, l'hétérozygotie est plus élevée chez *M. intertexta* que *M. ciliaris*. Les fleurs de *M. intertexta* sont parmi les plus grandes des espèces annuelles du genre *Medicago*, la taille de la fleur qui est à un caractère indicateur du degré d'allogamie explique l'hétérozygotie élevée chez *M. intertexta* par rapport aux autres espèces annuelles et l'existence d'un flux de gène de *M. ciliaris* vers *M. intertexta*. Cinq loci polymorphes de quatre systèmes enzymatiques étudiés par Abdelkefi *et al.* (2001) ont montré que ces deux espèces sont fortement apparentées, constituant un même complexe d'espèces, subdivisé en deux compartiments, l'un à un régime préférentiellement autogame (*M. ciliaris*) et l'autre à tendance allogame (*M. intertexta*).

D'après Lesins et lesins (1979), des croisements occasionnels peuvent avoir lieu dans des conditions naturelles chez l'espèce autogame *M. polymorpha*. L'analyse RADP (de *M. polymorpha* (Vitale *et al.*, 1998) et de *M. truncatula* (Bonnin *et al.*, 2001) révèle que des événements d'allogamie peuvent se produire entre les individus locaux et les génotypes de migration. Les mécanismes biologiques de cette allogamie sont inconnus. Cependant, chez *M. polymorpha* des larves sont souvent trouvées dans les fleurs fermées (Vitale *et al.*, 1998).

1.7.3/ Les croisements réalisés dans le genre *Medicago*

1.7.3.1/ Les croisements réalisés *in vivo*

1.7.3.1.1/ Dans la section des *Intertextae* (Lesins *et al.*, 1971)

M. intetexta* x *M. intertexta

Le croisement entre *M. intertexta* (de Sicile) sans tache rouge à la base des feuilles et *M. intertexta* (du jardin botanique de Birmingham) avec une tache rouge triangulaire à la base des feuilles et des gousses à épines courbées a donné en F₁ des plantes avec une tache rouge triangulaire à la base des feuilles avec une fertilité pollinique très élevée. A la F₂, la ségrégation du caractère de la présence de tache rouge à la base des feuilles est de 3:1, ainsi le gène responsable de ce caractère est codé par une seule paire d'allèles; **M** (avec tache) le caractère dominant et **m** (sans tache) est le caractère récessif. La fertilité pollinique élevée et la ségrégation normale du caractère étudié impliquent que les deux échantillons font partie de la même espèce.

M. granadensis* x *M. granadensis

La couleur noire de la graine de *M. granadensis* est utilisée pour confirmer l'origine hybride de la F₁. Le croisement entre *M. granadensis* (originaire du sud de la Turquie) avec des tiges poilues, une tache blanche au milieu de la feuille et des graines brunes, et *M. granadensis* (du sud de la Turquie) avec des tiges rouges lisses, tache rouge au milieu de la feuille et des graines noires a produit en F₁ des individus ayant une fertilité pollinique très élevée (98%). En F₂, les proportions obtenues pour la tache sur les feuilles sont : 9 avec tache rouge au milieu de la feuille, 3 avec tache blanche au milieu de la feuille et 4 sans tache. Ce caractère semble être déterminé par un gène "**P**" pour la présence de la tache et un autre gène "**C**" responsable de la couleur de cette tache. Pour les caractères de présence de poils sur la tige et la couleur des graines, la ségrégation était indépendante et les proportions étaient de 3:1, avec la dominance des caractères tiges poilues et graines noires. La ségrégation indépendante des caractères indique que les gènes sont situés dans des chromosomes différents ou sur des parties très éloignées. La ségrégation normale des caractères en F₂ et la forte fertilité en F₁ indiquent que les deux échantillons sont de la même espèce.

M. ciliaris* x *M. intertextata

Le croisement entre *M. ciliaris* (originaire de Palestine) sans tache sur les feuilles et gousses poilues et *M. intertextata* avec une tache rouge triangulaire à la base des feuilles donne une F₁ avec une tache rouge à la base des feuilles, avec une ségrégation de 3:1. La F₁ présente un taux de fertilité pollinique correspondant à 40%. Dans cette génération, la pilosité des gousses était faible par rapport au parent *M. ciliaris*, la ségrégation de ce caractère en F₂ est de 3:1 et en F₃ il est de 1 :2 :1. Ces résultats montrent que la pilosité des gousses est codée par un seul gène à deux allèles: l'allèle dominant "**H**" donne des gousses poilues et l'allèle récessif "**h**" donne des gousses glabres. La ségrégation des deux caractères, présence de tache sur les feuilles et pilosité des gousses étaient de 9:3:3:1 en F₂, ce qui indique que les deux gènes codant pour ces caractères se trouvent sur deux chromosomes différents, ou sur deux parties très éloignées d'un même chromosome.

Le croisement entre *M. ciliaris* (originaire de la Palestine) avec une petite tache rouge au milieu des feuilles et gousses poilues et *M. intertextata* (origine du jardin botanique de Birmingham) avec une tache rouge triangulaire à la base des feuilles, produit en F₁ des plantes avec une petite tache au milieu des feuilles, qui ressemble à celle des feuilles de *M. ciliaris*. Cependant, ce caractère n'est pas complètement exprimé car la présence de tache n'est pas bien décernée sur toutes les feuilles. Deux populations de la F₂ ont été étudiées, la première population a donné 13 plantes avec tache à la base des feuilles, 22 plantes avec tache rouge au milieu des feuilles, et 7 sans taches. Dans la 2^{ème} population, les deux caractères, sans tache et avec tache aux milieux des feuilles ne sont pas séparés, et a donnée 33 plantes avec une tache à la base des feuilles et 47 plantes non distinguées dont 11 familles sont douteuses. La F₃ issue de ces dernières est constituée de 9 familles avec taches ce qui prouve que les plantes en F₂ étaient hétérozygotes et 2 familles (composées de 2 plantes chacune) étaient sans tache. Ce qui suggère que le rapport 1:3 est issu du rapport 3:4:9. Ainsi, les deux taches (tache à base des feuilles et tache au milieu des feuilles) sont codées par des allèles situés dans un même locus ou dans deux locus différents. Concernant la ségrégation du caractère des poils le rapport est de 3:1.

M. muricoleptis* x *M. intertextata

Le croisement entre *M. muricoleptis* (originaire de Sicile) avec des feuilles sans tache, de petites gousses cylindriques et à petites graines et *M. intertextata* (originaire du jardin Botanique de Birmingham) avec une tache rouge triangulaire à la base des feuilles et des gousses à épines courbées donne une F₁ composée de plantes portant des feuilles avec un taux de fertilité correspondant à 50%. La F₂ est composée de 96 plantes à feuilles avec tache rouge triangulaire à la base et 35 plantes sans taches. Après le transfert de ces plantes vers un phytotron, deux classes se sont distinguées; sur les 96 plantes avec tache, la première est constituée de 33 plantes avec tache rouge foncée et la deuxième est composée de 63 plantes avec une tache rouge claire. Ces résultats laisse suggérer qu'il y a un gène avec deux allèles responsables de cette tache, "**M**" et "**m**", "**MM**" donne des plantes avec tache rouge foncée "**Mm**" donne des plantes avec une tache

rouge claire et "mm" donne des plantes sans tache. Selon les poids des graines, cinq classes ont été distinguées avec une proportion de 1:4:6:4:1, ce qui montre que le poids des graines est codé par deux gènes à effet cumulatif. La distribution du caractère tache sur ces différentes classes a révélé que le caractère tache sur les feuilles, et le caractère poids s'agrègent indépendamment (Lesins *et al.*, 1971).

M. muricoleptis* x *M. ciliaris

Le croisement entre *M. muricoleptis* (originale de Sicile) avec de petites gousses cylindriques, de petites graines et des feuilles sans tache et *M. ciliaris* (originale de la Sardaigne) avec une tache rouge au milieu des feuilles et des poils sur les gousses donne une F₁ des plantes à feuilles avec une tache au centre et à gousses poilues, avec une fertilité pollinique de 35%. La F₂ est composée de 54 plantes avec tache au milieu des feuilles et 42 plantes sans taches, ce qui laisse suggérer que quelques plantes avaient l'allèle codant pour la tache rouge au milieu des feuilles mais qui ne peut pas s'exprimer, ce qui donne un rapport de 3:1. Cette situation ressemble à celle du croisement entre *M. ciliaris* et *M. intertexta*, où les porteuses d'allèle codant pour la tache au milieu des feuilles sont incapables de s'exprimer dans la F₂, mais leur hétérozygotie est révélée en F₃. La ségrégation du caractère de pilosité des gousses donne 48 plantes aux gousses poilues et 18 plantes aux gousses glabres (avec un rapport de 3:1, donc ce caractère dépend de l'expression d'un seul gène).

M. intertexta, *M. ciliaris* et *M. muricoleptis* peuvent être croisées et produire des hybrides, mais avec une fertilité pollinique faible. Les analyses de la méiose dans la F₁ de ces hybrides ont montré des irrégularités en métaphase, ce qui implique donc que ces espèces sont séparées.

M. granadensis* x *M. intertexta* et *M. intertexta* x *M. galilaea

Le croisement entre *M. granadensis* (originale du sud de la Turquie) avec une tache rouge au milieu des feuilles et des tiges poilues rouges et *M. intertexta* (du jardin botanique de Birmingham) avec une tache rouge triangulaire à la base des feuilles et des gousses à épines courbées. Le croisement entre *M. galilaea* (originale de la Turquie) avec des gousses poilues et *M. intertexta* (du jardin botanique de Birmingham) avec une tache rouge triangulaire à la base des feuilles et des gousses avec des épines courbées n'ont donné aucun hybride même répété à plusieurs reprises pour chacun. Ce résultat affirme la présence d'une forte barrière d'interfertilité entre *M. intertexta* et *M. granadensis*- *M. galilaea*.

1.7.3.1.2/ Dans la section des *Pachyspirae*

Simon (1965) a réalisé 212 croisements réciproques entre *M. litorallis* var. *litorallis* (Gousses cylindriques, 4–5 spires/ gousses, épines longues avec une base épaisse) et *M. tornata* var. *aculeata* (Gousses lenticulaires avec 1,25–2,5 spires/ gousse, épines courtes et minces insérées à environ 180°/ surface de la gousse), seulement six hybrides ont pu être obtenus jusqu'à maturité malgré le nombre élevé de gousses obtenues. Les hybrides ont montré une déficience

chlorophyllienne jusqu'au stade de 8–15 feuilles. Les jeunes plantes se développaient très lentement par rapport aux parents. A l'exception de la longueur du tube et des dents du calice et de l'ovaire qui sont inférieurs à ceux des parents, tous les autres caractères morphologiques des hybrides étaient intermédiaires entre ceux des parents. La fertilité pollinique est de 7% et la production en graines est de 10% par gousse. Les analyses de la méiose indiquaient des irrégularités méiotiques par au moins une translocation.

D'après Simon et Millington (1967), ont réussi facilement des hybridations interspécifiques entre 7 races de *M. truncatula* et 3 races de *M. littoralis*. Les jeunes plants obtenus de ces croisements montrent une déficience chlorophyllienne qui disparaît après le stade 8-15 feuilles. Les hybrides avaient des caractères morphologiques intermédiaires entre les parents où la position de la suture dorsale et de la veine latérale n'était pas constante dans les gousses mûres de chacun des hybrides et même sur une même plante. Dans 3/5 des combinaisons interspécifiques, les plantes étaient semi-stériles avec une fertilité pollinique de 50 à 60%.

Lesins *et al.* (1980) ont réussi à croiser *M. truncatula* et *M. turbinata*. Dans le croisement réciproque 6 gousses ont été obtenues avec *M. turbinata* comme parent femelle. 81 autres croisements utilisant *M. truncatula* comme parent femelle ont permis l'obtention d'une seule gousse qui a avorté avant maturité. Au total, sur 6 gousses obtenues, seulement 4 graines ont germé et donné des plantes minces à développement lent et à déficience chlorophyllienne. La F₁ était stérile, mais un dédoublement chromosomique a été obtenue en mettant des plantes dans une solution de colchicine à 0,06 %, a rendu la F₁ fertile. En F₂ 56 jeunes plantes ont été obtenues dont 10 moururent et 2 ne donnèrent pas de gousses. Les autres donnèrent des gousses mûres. La fertilité pollinique de la F₂ était de 35 à 72% et tous les individus étaient intermédiaires entre les deux parents.

1.7.3.1.3/ Dans la section des *Leptospirae*

Lesins et Erac (1968) ont réalisé des croisements entre *M. aschersoniana* avec des feuilles dentées dans la partie apicale, des gousses sphériques, et des pédoncules inférieures aux pétioles et deux accessions de *M. Laciniata*. La première accession se caractérise par la forme des feuilles lobées, des gousses sphériques aux ovoïdes qui sont plus large que les gousses de *M. aschersoniana* et pédoncules supérieures aux pétioles. La deuxième accession correspond à *M. Laciniata* var. *integrifolia* avec des feuilles complètes comme celles de *M. aschersoniana*, les gousses sont sous forme de cône et les pédoncules sont plus longs que les pétioles. En F₁ ces croisements ont engendré un taux de fertilité très élevée, identique aux parents, et en F₂ tous les individus sont viables. La ségrégation des caractères est de 3:1 pour la forme des feuilles, et la feuille complète dont le caractère récessif ; de 15:1 pour le caractère de pédoncule / pétiole où le pédoncule court est le caractère récessif et de 3:1 pour la forme des gousses où les gousses sont sous forme de cône est le caractère récessif. Ces résultats montrent que les deux accessions sont bien des variétés ou même des formes seulement.

D'après Singh et Lesins (1972) ont réalisés des croisements entre *M. sauvagei* et *M. laciniata*. La F₁ obtenue présente une déficience en chlorophylle et ils sont pauvres en pollen. A la deuxième génération, 20% de graines seulement ont germé. Parmi ces dernières, 40% seulement ont engendré des hybrides F₂ présentant une déficience chlorophyllienne. La majorité des plantes ne dépassent pas le stade de cotylédons. Le croisement réciproque, *M. laciniata* x *M. sauvagei* a engendré une F₁ normale. A la F₂, 25% seulement de graines ont germé. Les plantules de la F₂ meurent en grande quantité.

Lesins et Lesins (1979) ont analysé du point de vue génétique, chez *M. polymorpha* d'un échantillon venant des Iles Canaries (UAG. 2239) composé de deux types de plantes. Le premier est constitué de plantes à gousses épineuses et le deuxième est composé de plantes à gousses inermes, poussant ensemble, 7 graines d'une gousse épineuse donnèrent 6 plantes à gousses inermes et 1 plante à gousses épineuses. Très probablement, la plante à gousses épineuses aurait été engendrée par un pollen transféré par des insectes d'une plante à gousses inermes sur une plante à gousses épineuses, vu que la plante à gousses épineuses avait ségrégué en 43 plantes à gousses épineuses et 11 plantes à gousses inermes. Ainsi, un seul gène à deux allèles déterminait le caractère gousses épineuses et gousses inermes, le dernier étant récessif. Le nombre de spires a fait lui aussi l'objet d'une investigation chez deux échantillons à gousses tuberculeuses, l'un avait des gousses avec plus de 3 spires, l'autre des gousses d'au plus de 3 spires. Les descendants F₂ eux-mêmes se répartissent en 171 plantes bien vertes et 9 plantes vertes claires et semi naines. L'état nain des plantes vertes claires était probablement causé par la déficience dans la production de la chlorophylle ; bien que leur production grainière fût faible, plusieurs descendants poussèrent mais tous chlorophyllo-déficients et nains. Apparemment, pour une synthèse normale chez les deux échantillons parentaux, deux différentes voies (contrôlées par deux gènes différents) sont concernées. Les plantes F₂ qui n'auraient pas hérité l'un des deux facteurs actifs auraient failli dans la synthèse normale de la chlorophylle.

De Haan et Barnes (1998) ont croisé des populations de différentes régions pour déterminer la transmission des caractères du type de gousse (épineuse/ lisse), de la couleur de tige (rouge/ vert) et du nanisme de *M. polymorpha*. La descendance des croisements effectués a été évaluée dans les générations F₁, F₂, F₃. La transmission des caractères type de gousses et la couleur de tige a été étudiée dans les croisements Pi 292424 (Israël) x Pi 505427 (Espagne) et Pi 459135 (Turquie) x Pi (197339 (Australie), alors que le croisement Pi 197346 (Australie) x Pi 283653 (Israël) a été employé pour étudier la transmission du type de gousse, de la couleur de tige et du nanisme. En F₁ tous les individus des trois croisements ont des tiges rouges et des gousses épineuses, ce qui indique que les caractères gousses épineuses et tiges rouges dominent les caractères gousses lisses et tiges vertes. En F₂ la ségrégation des caractères est de 3 : 1. Cela montre que le type de gousses a été codé par un gène simple (Sp1) avec un allèle dominant pour le type épineux et un autre gène simple (Rp1) avec un allèle dominant qui code pour la couleur rouge. Les deux gènes sont indépendants. Le caractère nain n'est pas présent ni chez les parent ni

dans la F₁, mais il a été observé en F₂ dans l'un des croisements. Les plantes naines présentent des tiges, des entrenœuds des pétioles et des feuilles beaucoup plus courts que les plantes normales. Ce caractère est codé par deux gènes (Dw1, Dw2) avec une épistasie récessive partielle.

Des croisements ont été effectués entre deux variétés de *M. minima* var. *minima* (épines longues et pédoncules supérieurs aux pétioles) et var. *brevispira* (épines courtes et pédoncules inférieurs aux pétioles ou sessiles). A la F₂, 3/4 des hybrides étaient à pédoncules supérieurs aux pétioles et 1/4 étaient à pédoncules inférieurs aux pétioles. Alors que, sur 52 plantes, aucune ne présente des épines courtes. Le caractère à épines courtes est donc récessif. La ségrégation est de 3 :1 (Lesins et Lesins, 1979).

Lesins et Lesins (1979), des croisements ont été tentés entre différentes espèces ; *M. sauvagei* x *M. disciformis*, *M. sauvagei* x *M. polymorpha*, *M. disciformis* x *M. tenoreana*, *M. coronata* x *M. praecox* et *M. polymorpha* x *M. praecox* de la section *Leptospirae*, mais aucun hybride fertile viable n'a été observé. Aucun hybride viable n'a été observé aussi, lors des croisements entre certaines espèces de la section *Leptospirae* et celles de la section *Pachysirae* à l'exception des espèces suivantes: *M. minima* (section *Leptospirae*) x *M. truncatula* (section *Pachysirae*). *M. polymorpha* (section *Leptospirae*) x *M. rigidula* (section *Pachysirae*). *M. praecox* (section *Leptospirae*) et *M. rigidula* (section *Pachysirae*).

1.7.3.2/ Les hybrides obtenus par culture d'embryon *in vitro*

Plusieurs tentatives de culture *in vitro* ont été effectuées entre *M. sativa* et plusieurs autres espèces pérennes du genre *Medicago* par culture d'embryon isolé, culture d'embryon *in ovulo* ou culture d'ovule embryon. C'est seulement grâce à cette dernière que des hybrides ont été récupérés, et elle consiste à réaliser une préculture d'un ovule fécondé (10 à 12 jours après pollinisation) pendant une période de 6 à 12 jours, suivie de l'excision et de la culture directe de l'embryon. La culture d'ovule-embryon était essentielle pour récupérer les hybrides interspécifiques entre *M. sativa* diploïde ($2n = 2x = 16$) et les espèces diploïdes suivantes ($2n = 2x = 16$) : *M. Hybrida*, *M. marina*, *M. papillosa*, *M. rhodopea* et *M. rupestris*. Des hybrides trispécifiques ont été aussi obtenus par croisement de la F₁ du croisement *M. sativa* x *M. dzhawakhetica* ($2n = 3x = 24$) avec *M. cancellata* ($2n = 6x = 48$) et *M. saxatilis* ($2n = 6x = 48$) par culture d'ovule embryon. Sur 1 000 croisements entre *M. sativa* x *M. rhodopea* et *M. sativa* x *M. rupestris*. Dans chaque croisement respectivement seulement 157 et 66 hybrides ont été récupérés. A partir de 2 000 croisements, entre *M. sativa* et *M. papillosa*, seulement 13 hybrides ont été obtenus et juste 2 hybrides sur 3 000 croisements ont été récupérés dans les croisements *M. sativa* x *M. hybrida* et *M. sativa* x *M. marina* (McCoy et Smith, 1986).

1.7.3.3/ Les hybrides obtenus par hybridation somatique

Pupilli *et al.* (1992) ont pu obtenir pour la première fois dans le genre *Medicago* des hybrides somatiques symétriques de niveaux de ploïdie différents par électrofusion entre les protoplastes des feuilles de *M. sativa* ($2n = 4x = 32$) et les protoplastes de calcs de *M. coerulea* ($2n = 2x = 16$). Six calcs hybrides ont été sélectionnés dont deux ont généré plusieurs plantes. La nature hybride des régénérants a été confirmée par les analyses cytologiques et d'isozymes.

Plusieurs caractères morphologiques ont été pris en considération pour comparer les hybrides par rapport aux parents. La croissance des plantes hybrides était plus lente que celle des parents, mais après leur transfert à la serre, les hybrides semblent plus vigoureux avec une croissance droite par rapport à leurs parents du même âge. La forme et la taille des feuilles sont intermédiaires. La longueur des entre-nœuds et le secteur de feuilles des hybrides somatiques sont plus élevés que ceux de *M. coerulea* mais ne diffère pas significativement de *M. sativa*. Le nombre de poils par unité de surface (mm^2) est beaucoup plus élevé (presque en double) que celui de *M. sativa* et presque le même que celui de *M. coerulea*. Les stipules sont deux fois plus longues que *M. coerulea* et trois fois plus longues que *M. sativa*. *M. coerulea* se caractérise par un nombre élevé de stomates de taille plus réduite (presque la moitié) que *M. sativa*. Les plantes hybrides ont montré une faible densité de stomates d'une taille plus grande que chez les parents. Les hybrides ont montré une fertilité pollinique et une production en graines élevée.

Pupilli *et al.* (1995) ont analysé les hybrides précédents par RFLP (Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction) pour révéler la stabilité de la composition nucléaire. Les chromosomes des deux espèces sont présents dans les hybrides somatiques, avec une incorporation incomplète des allèles du parent diploïde. Des croisements manuels ont été réalisés entre ces hybrides somatiques hexaploïdes. Les allèles étudiés ont montré une ségrégation de type mendélien. Les analyses cytologiques des microspores ont montré seulement quelques anomalies, formation des monovalents et des chromosomes retardataires, en comparaison aux hybrides spontanés. Les plantes dérivées des hybrides somatiques cultivés au champ sont vigoureuses avec un rendement plus élevé que les parents.

Nenz *et al.* (1996) ont obtenu pour la première fois des hybrides somatiques symétriques dans le genre *Medicago* entre deux espèces sexuellement incompatibles *M. sativa* ($2n = 4x = 32$) et *M. arborea* ($2n = 4x = 32$) par électrofusion symétrique. La morphogénèse des calcs a été induite par le régulateur de croissance 1,2 benzisoxazole-3-acide acétique. Les analyses d'isozymes et de RFLP ont montré un réarrangement intensif du génome des hybrides.

Les caractéristiques morphologiques de *M. sativa* et *M. arborea* sont très différentes : *M. arborea* est un arbuste ayant une seule tige droite pouvant atteindre une hauteur de 1,5 à 2 m, à feuilles persistantes, croissant et fleurissant activement en hiver. *M. sativa* est une espèce herbacée pérenne, possédant plusieurs tiges droites pouvant atteindre rarement 1 m, elle est en croissance active au printemps et en automne et en phase de dormance en hiver ; en été sa

croissance s'arrête. Les hybrides somatiques ont de 6 à 10 tiges par plante, leur croissance est active en hiver et passe par une phase de latence en été presque comme *M. sativa*.

Pupilli *et al.* (2001) ont étudié les réarrangements mitochondriaux, des trois hybrides précédents, qui ont montré plusieurs degrés de réarrangement par la RFLP: L'hybride *M. sativa*-*M. coerulea* a gardé toutes les bandes spécifiques de *M. coerulea* et a perdu la majorité des bandes spécifiques de *M. sativa*, l'hybride *M. sativa*-*M. falcata* a montré que les bandes spécifiques de *M. sativa* avec des bandes non détectées. Tandis que l'hybride *M. sativa*-*M. arborea* a montré une incorporation partielle des bandes des deux parents avec des bandes non parentales. Ces différences sont attribuées à des différences entre les parents, au niveau des distances génétiques et au niveau des cycles cellulaires. L'analyse de la descendance issue de la reproduction sexuée de l'hybride *M. sativa*-*M. coerulea* a révélé une sous unité résiduelle de l'ADN mitochondrial de *M. sativa* retenue dans le cytoplasme de l'hybride.

Tian et Rose (1999) ont obtenu des hybrides somatiques entre deux espèces annuelles incompatibles *M. truncatula* et *M. scutellata* à partir de protoplastes des feuilles de *M. truncatula* et protoplastes des cotylédons de *M. scutellata* irradiée, et fusionnés par le PEG. 50 plantes ont été obtenues par régénération. Les analyses des chromosomes, et la RFLP, de 20 plantes ont identifié que les plantes sont des hybrides asymétriques.

Mizukami *et al.* (2006) ont obtenu des hybrides somatiques asymétriques en utilisant des protoplastes non embryogéniques (cotylédons) de *M. rugosa* ($2n = 30$) et *M. scutellata* ($2n = 30$) électrofusionnés avec des protoplastes de cals de *M. sativa* traités par l'acide iodoacétique. Les hybrides ont été régénérés et confirmés par les analyses moléculaire, morphologique et cytologique.

Les caractéristiques morphologiques de huit régénérants de *M. sativa*-*M. rugosa*, et cinq régénérants de *M. sativa*-*M. scutellata* montrent une grande ressemblance avec *M. sativa* avec quelques variations : la couleur des fleurs, principalement violette, quelques individus ont des fleurs de couleur jaune, jaune violet, et présence de feuilles et fleurs anormales. La forme des feuilles des hybrides *M. sativa*-*M. rugosa* est semblable à celle de *M. rugosa* ; dans les hybrides *M. sativa*-*M. scutellata*, les feuilles sont semblables à *M. sativa*. La présence de poils sur les feuilles et les tiges est presque absente chez les hybrides comme *M. sativa*, alors que la présence des poils est une caractéristique des deux espèces annuelles *M. rugosa* et *M. scutellata*. Tous les individus hybrides sont pérennes comme *M. sativa*. L'analyse chromosomique et la fertilité pollinique montrent que tous les hybrides sont aneuploïdes ; dans l'hybride *M. sativa*-*M. rugosa*, le nombre de chromosomes varie de 43-59, et dans l'hybride *M. sativa*-*M. scutellata* le nombre chromosomique varie de 31-35. Les hybrides sont asymétriques, le nombre complet de chromosomes (62) existe seulement lors de la fusion des protoplastes, et au cours de la prolifération végétative le nombre de chromosomes s'est réduit jusqu'à 32. L'aneuploïdie résulte de l'échange ou élimination d'ADN durant la croissance des cals dans le produit de fusion. Ces

variations chromosomiques résultent aussi de la différence de la période du déroulement des cycles cellulaires exprimant ainsi l'instabilité phénotypique.

Les clones végétatifs de *M. sativa*- *M. rugosa* ont une fertilité pollinique presque normale (76- 87 %) avec production de graines par autopollinisation. En F₁, le nombre de chromosomes est stable et est de 32. L'analyse GISH a détecté quelques parties de chromosomes de l'espèce *M. rugosa* dans le génome de la F₁ qui sont introduites lors de la fusion des cellules de *M. sativa* et *M. rugosa*. Certains clones végétatifs des hybrides *M. sativa*- *M. rugosa* ont retrouvé une fertilité pollinique presque normale et donnent des graines par autopollinisation. Cependant les hybrides somatiques entre *M. sativa*- *M. scutellata* ont perdu leur fertilité femelle et aucune graine n'est produite par autopollinisation.

2/ Matériel et méthodes

2/ Matériel et méthodes

2.1/ Réalisation des croisements

2.1.1/ Origine du matériel végétal

Six espèces annuelles ont été utilisées pour la réalisation des croisements: *M. intertexta* et *M. ciliaris* de la section des *Intertextae*, *M. arabica*, *M. polymorpha* et *M. minima* de la section de *Leptospirae*, et *M. orbicularis* de la section des *Orbiculares* (Tab.5).

Tab. 5 : Les différents échantillons d'espèces utilisées et leurs origines géographiques.

Espèce	morphotype	Origines géographiques du matériel végétal
<i>M. intertexta</i>	- Sans tache sur les folioles - A tache noire au centre des folioles	- Campus universitaire de Targa Ouzemmour (Bejaïa)
	- Sans tache sur les folioles et aux stipules normales - A tache brune sur aux centre des folioles et aux stipules foliacées	- Campus universitaire de Targa Ouzemmour (Bejaïa)
<i>M. ciliaris</i>	- Sans tache sur les folioles - A tache noire au centre des folioles	- Ighzer Amokrane
<i>M. orbicularis</i>	- Gousse avec spire recourbée - Gousse avec spire étalée	- INRA (de Oued Ghir) - Ighzer Amokrane
<i>M. arabica</i>	- Grande tache noire au centre des folioles	- Ighzer Amokrane
	- Petite tache noire au centre des folioles	- Ighzer Amokrane
<i>M. polymorpha</i>	- A tache brune à la base des folioles	- Allaghan
	- A tache noire au centre des folioles	- Ighzer Amokrane
<i>M. minima</i>	- A grosses gousses et nervures principales pourpres	- Allaghan
	- A petites gousses et nervures principales vertes	- Ighzer Amokrane

2.1.2/ Mise en culture de la génération parentale

Les plantes adultes utilisées sont issues de plantules récoltées à partir de leur milieu d'origine et transplantées et parfois à partir de mise à germination des graines après scarification. La scarification a été réalisée en frottant légèrement les graines entre deux bouts de papier verre.

Au laboratoire, les cultures ont été faites dans des pots en plastique de 20 cm de diamètre. Le sol utilisé est celui du Campus universitaire de Targa Ouzemmour. Après la transplantation, les plantules ont été mises à l'extérieur du laboratoire (sur les bords des fenêtres, orientation ouest) et sont arrosées régulièrement à l'eau de robinet.

Au champ, les cultures ont été faites à même le sol. La station utilisée se trouve à Ighzer Amokrane (Didoun) à une altitude d'environ 300m, sol argileux et orientation est. Les cultures au champ, quand il n'a pas plu, sont arrosées également à l'eau de robinet.

Les périodes se sont étalées du mois de décembre au mois de juin de l'année 2004 et juin 2005.

En cas de nécessité absolue, des pesticides anti-pucerons et ceux anti-escargots ont été utilisés au champ.

2.1.3/ Les marqueurs génétiques

Les marqueurs génétiques utilisés sont:

- La présence des taches sur les folioles pour *M. intertexta*, *M. ciliaris*, *M. arabica*.
- La forme des gousses (spires étalées ou recourbées) pour *M. orbicularis*.
- Le type de stipules (stipules normales ou foliacées) pour *M. intertexta* et *M. ciliaris*.
- La pilosité des gousses pour *M. intertexta* et *M. ciliaris*.
- Couleur de la nervure principale et la taille des gousses pour *M. minima*.

2.1.4/ La pureté des individus utilisés comme parents dans les croisements

Les différents morphotypes utilisés dans les différents croisements sont de lignées pures puisque leur culture sur plusieurs générations n'a montré aucune ségrégation pour les caractères utilisés comme marqueurs.

2.1.5/ La technique de déstamination et de pollinisation

2.1.5.1/ La déstamination

Au stade juste avant l'anthèse à l'œil nu, la déstamination a été effectuée manuellement pour la plupart des plantes. Quelques unes seulement ont été traitées par l'alcool.

2.1.5.1.1/ La déstamination manuelle

Après avoir étalé l'étendard et les ailes de la fleur par une aiguille, la colonne staminale qui enveloppe le style est libérée de la carène par une légère pression entre le pouce et l'index. Les étamines sont éliminées avec un petit pinceau, ensuite on lave le stigmate par un jet d'eau à l'aide d'une seringue pour éliminer le pollen afin de réduire les risques d'autopollinisation.

2.1.5.1.2/ La déstamination par traitement à l'alcool (Lesins, 1955)

Après avoir libéré la colonne staminale et le style, on applique sur les anthères à l'aide d'une seringue l'alcool dilué à 57% durant 6 secondes, puis immédiatement après on procède au rinçage à l'eau de robinet en utilisant une autre seringue.

2.1.5.2/ La pollinisation

Les fleurs des parents mâles sont recueillies au stade d'anthèse. Après les avoir débarrassées de leurs étendards et libéré leurs colonnes staminales, elles sont directement utilisées en les frottant doucement sur les fleurs déstaminées des parents femelles. Cette

pollinisation est répétée pendant trois jours pour être sûr que le stigmate est arrivé à maturité et augmenter les chances de réussite de l'hybridation.

Les fleurs pollinisées sont marquées en accrochant un fil étiqueté au pétiole de la feuille axillante. Cette étiquette est ensuite déplacée sur le pédoncule de la grappe, et enfin accrochée autour des gousses obtenues.

2.2/ La culture de la génération F₁ et F₂ des hybrides

2.2.1/ Le Matériel végétal

2.2.1.1/ Les hybrides F₁ des croisements réalisés au laboratoire

Le matériel végétal représente les graines F₁ obtenues des croisements interspécifiques entre *M. intertexta*, *M. ciliaris*, *M. orbicularis* et *M. arabica* réalisés au laboratoire.

2.2.1.2/ Les hybrides F₂

Les graines F₂ sont celles des croisements intraspécifiques réalisés en 2004 :

- *M. polymorpha* à tache brune à la base des folioles ♀ x *M. polymorpha* à tache noire au centre des folioles ♂ et son croisement réciproque;
- *M. intertexta* sans tache sur les folioles et stipules normales ♀ x *M. intertexta* (à tache noire au centre des folioles et stipules foliacées ♂ ;
- *M. minima* avec grosses gousses et nervures principales pourpres ♀ x *M. minima* avec petites gousses et nervures principales vertes ♂ et son croisement réciproque (Sahnoune, 2004).

2.2.2/ La mise en culture

La mise en culture des deux générations (F₁ et F₂) a été réalisée au printemps 2005 au laboratoire (Béjaïa) qui se trouve à une altitude de 29 m, et au champ qui se trouve dans le village Didoun (à 3 Km d'Ighzer Amokrane) d'environ 300 m d'altitude et d'exposition est.

2.2.2.1/ La mise en culture de la première génération F₁

Après scarification, triage et étiquetage, les graines F₁ sont mises à germer dans des boîtes de Pétri sur papier filtre imbibé d'eau et placées à l'obscurité pendant 3 à 4 jours. Après la germination les graines sont repiquées dans des pots en plastique et arrosées régulièrement. La culture a été effectuée au laboratoire (sur les bords des fenêtres, orientation ouest).

2.2.2.2/ La mise en culture de la deuxième génération F₂

Les gousses des croisements intraspécifiques de *M. intertexta* sans tache et aux stipules normales ♀ x *M. intertexta* avec tache et aux stipules foliacées ♂ et de *M. polymorpha* à tache brune à la base des folioles ♀ x *M. polymorpha* à tache noire au centre des folioles ♂ sont partagées en deux lots pour chaque croisement; les premiers lots sont constitués d'un petit

nombre de gousses, cultivées au laboratoire et les seconds lots sont constitués de plusieurs gousses, cultivées au champ.

Les gousses du croisement *M. minima* à grosses gousses et nervures principales pourpres ♀ x *M. minima* à petites gousses et nervures principales vertes ♂ sont cultivées au laboratoire.

Les graines cultivées au laboratoire sont scarifiées, triées et étiquetées. Ensuite elles sont mises à germer dans des boîtes de Pétri. Les graines germées sont repiquées dans les pots contenant du sol argileux. Pour *M. minima*, on a utilisé de la terre végétale enrichie de sable rouge arrosée une fois par une solution du sol de ses populations d'origine. Ces pots sont placés au laboratoire (sur les bords des fenêtres, orientation est). Les graines cultivées au champ après scarification sont cultivées directement au sol. Le Tableau 6 donne les différents hybrides F₁ et F₂ cultivés au laboratoire et au champ.

Tab. 6: Les différents hybrides F₁ et F₂ cultivés au laboratoire et au champ

Croisement		Date de récolte	Date de mise en culture	
Culture au laboratoire				
F ₁	<i>M. ciliaris</i> ♀ x <i>M. intertexta</i> ♂	En juin 2005	En mars 2006	
	<i>M. ciliaris</i> ♀ x <i>M. arabica</i> ♂			
	<i>M. orbicularis</i> ♀ x <i>M. intertexta</i> ♂			
	<i>M. orbicularis</i> ♀ x <i>M. ciliaris</i> ♂			
	<i>M. orbicularis</i> ♀ x <i>M. Arabica</i> ♂			
	<i>M. Arabica</i> ♀ x <i>M. intertexta</i> ♂			
	<i>M. orbicularis</i> ♀ x <i>M. ciliaris</i> ♂			
F ₂	<i>M. intertexta</i> sans tache et aux stipules normales ♀ x <i>M. intertexta</i> avec tache et aux stipules foilacées ♂	En juin 2004	23 novembre 2005	
	<i>M. polymorpha</i> à tache noire ♀ x <i>M. polymorpha</i> à tache brune ♂	En juin 2004	6 décembre 2005	
	<i>M. polymorpha</i> à tache brune ♀ x <i>M. polymorpha</i> à tache noire ♂	En juin 2004	6 décembre 2005	
	<i>M. minima</i> avec petites gousses et nervures principales vertes ♀ x <i>M. minima</i> avec grosses gousses et nervures principales pourpres ♂	En juin 2004	10 décembre 2005	
	Culture au champ			
	<i>M. intertexta</i> sans tache et aux stipules normales ♀ x <i>M. intertexta</i> avec tache et aux stipules foliacées ♂	En juin 2004	janvier 2006	
	<i>M. polymorpha</i> à tache brune ♀ x <i>M. polymorpha</i> à tache noire ♂	En juin 2004	janvier 2006	

2.3/ La fertilité pollinique

2.3.1/ L'origine du matériel végétal

Lors de la période de floraison, des échantillons de fleurs sont récoltés au stade avant l'anthèse pour tous les morphotypes des espèces cultivées. Les échantillons de fleurs sont fixés dans la solution de Carnoy II (constitué d'éthanol, chloroforme, acide acétique : 6 : 3 : 1), dans des tubes à essai hermétiquement fermés, puis conservés à l'obscurité au réfrigérateur (4°C). Le Tableau 7 donne la liste des différents échantillons à étudier pour la fertilité pollinique.

Tab. 7 : Liste des échantillons analysés pour l'étude de la fertilité pollinique

Les Hybrides intraspécifiques F ₁ et F ₂ expérimentaux	Les hybrides interspécifiques F ₁ naturels
<ul style="list-style-type: none"> • <i>M. intertexta</i> sans tache et aux stipules normales ♀ x <i>M. intertexta</i> avec tache et aux stipules foliacées ♂ • <i>M. polymorpha</i> à tache noire ♀ x <i>M. polymorpha</i> à tache brune ♂ • <i>M. polymorpha</i> à tache brune ♀ x <i>M. polymorpha</i> à tache noire ♂ • <i>M. minima</i> avec grosses gousses et nervures principales pourpres ♀ x <i>M. minima</i> avec petites gousses et nervures vertes (normales) ♂ • <i>M. minima</i> avec petites gousses et nervures principales vertes ♀ x <i>M. minima</i> avec grosses gousses et nervures principales pourpres ♂ 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>M. intertexta</i> ♀ x <i>M. ciliaris</i> ♂ • <i>M. ciliaris</i> ♀ x <i>M. intertexta</i> ♂

2.3.2/ La technique d'étude de la fertilité pollinique

La technique utilisée pour l'étude de la fertilité pollinique est la coloration au bleu de Coton au lactophénol selon le protocole de Mertens & Hamnersmith (1998). Le colorant est composé de :

- 8 V de glycérine ;
- 4 V d'acide lactique à 85% ;
- 4 V d'un mélange de cristaux de phénol (1g de phénol + 4 ml d'eau distillée)
- 2 V d'eau distillée ;
- 1 V de bleu d'aniline à 1% (0,05 ml + 100 ml d'eau distillée).

2.3.3/ La technique de coloration des grains de pollen

Sous la loupe binoculaire, sur une lame de microscope dans une goutte d'eau les anthères sont dégagées à partir des boutons floraux. Les anthères sont écrasées en utilisant des aiguilles pour libérer le maximum de grains de pollen. Une fois les débris de la fleur et les anthères sont éliminées on laisse sécher la goutte d'eau contenant les grains de pollen. On ajoute alors une petite goutte de bleu de coton et on recouvre d'une lamelle. Les grains de pollen sont vite colorés et l'observation se fait au microscope photonique. On compte entre 400 et 500 grains de pollen par fleur puis on calcule le taux de fertilité pollinique.

Les grains de pollen colorés uniformément d'un bleu foncé sont considérés viables et fertiles, par contre les grains de pollen de forme et de taille anormales et non colorés uniformément sont considérés non viables et stériles.

2.3.4/ L'évaluation du taux de fertilité pollinique

Le taux de fertilité pollinique est la division de la somme des grains de pollen fertiles sur la somme des grains de pollen fertiles et des grains de pollen non fertiles.

$$TF = \frac{N}{AN + N}$$

TF : Taux de fertilité pollinique

N : Nombre des grains de pollen fertiles

AN : Nombre des grains de pollen non fertiles.

2.4/ Analyse statistique

Le logiciel utilisé est : STATISTICA (version 5 : 1997) qui est utilisé pour :

- L'analyse des histogrammes des paramètres descriptifs importants : la fertilité pollinique et la taille des taches ;
- Le test χ^2 pour étudier la divergence entre les résultats expérimentaux de la ségrégation des marqueurs génétiques en F₂ et les résultats prévus par le modèle théorique ;
- Le test de la variance (ANOVA) pour détecter si les moyennes du nombre de graines/gousse des parents *M. intertexta* et *M. ciliaris* et celles des hybrides sont significativement différentes.
- Le test de comparaison des proportions.

2.5/ L'analyse de la méiose

2.5.1/ La préparation des solutions

2.5.1.1/ Le fixateur

Le fixateur assure un arrêt rapide des divisions cellulaires, sans léser ou détruire la structure chromosomique et une bonne conservation du matériel végétal par son rôle aseptisant. De même, le fixateur assure aussi une meilleure conservation pour la disponibilité du matériel végétal pendant une longue période, lorsqu'il est conservé à l'obscurité à 4°C (Jahier *et al.*, 1992).

Le fixateur utilisé est celui de Carnoy II :

- 6 V d'éthanol
- 3 V de chloroforme
- 1 V d'acide acétique

2.5.1.2/ Le colorant

Le colorant utilisé est à base d'orcéine lactopropionique préparé selon Dyer (1963).

Dans un grand erlenmeyer, dissoudre 2g d'orcéine dans 23 ml d'acide propionique et 23 ml d'acide lactique, ensuite ajouter de l'eau distillée jusqu'à 100 ml et bien agiter la solution puis filtrer. La solution d'orcéine ainsi obtenue se conserve longtemps dans un flacon en verre fumé.

2.5.2/ Le matériel végétal à observer

Les anthères constituent un matériel de choix pour analyser les chromosomes. La principale difficulté consiste à récolter les anthères au moment où les cellules mères des pollens (CMP) subissent la méiose.

2.5.3/ Les principales étapes de l'analyse de la méiose

2.5.3.1/ Le prélèvement et la fixation

Durant la période de floraison, sous des conditions de température fraîche et d'humidité optimales, les boutons floraux très jeunes (apex des tiges en fleurs) sont prélevés et mis immédiatement dans des tubes à essais contenant du Carnoy II.

2.5.3.2/ L'hydrolyse à HCl

Les boutons floraux fixés sont transférés dans le HCl (1N) à 60° C pendant 3 à 4 minutes. Cette étape a pour but de ramollir les cellules et éclaircir le cytoplasme. Après l'hydrolyse, les boutons floraux sont remis à nouveau dans le fixateur.

2.5.3.3/ Le choix des boutons floraux

Sous la loupe binoculaire les plus jeunes boutons floraux sont disséqués à l'aide de deux aiguilles, puis chaque fleur choisie est prise isolément dans une autre lame bien propre en lui ajoutant une goutte d'eau. Les anthères sont alors séparées à l'aide d'une aiguille. On laisse sécher la goutte d'eau puis on passe à la coloration.

2.5.3.4/ La coloration

Sur la lame préparée, recouvrir l'échantillon par une goutte de la solution d'orcéine et couvrir d'une lamelle. Mettre du papier filtre sur la lamelle pour absorber le surplus du colorant en exerçant une légère pression avec le pouce pour étaler les anthères et libérer les cellules mères polliniques.

2.5.3.5/ L'observation

Les cellules mères sont repérées facilement au microscope photonique à l'aide d'un objectif de grossissement ($G = 10$ ou $G = 12,5$). L'observation des chromosomes est obtenue par un grossissement supérieur, le plus souvent avec le grossissement ($G = 100$).

Les lames sont conservées pendant quelques jours en luttant les lames avec du vernis à ongles transparent.

2.6/ La photographie

Les préparations réussies sont photographiées à l'aide d'un appareil photo numérique (Sony DSC-P100).

3/ Résultats et discussions

3.1/ Analyse des croisements

3.1.1/ Cas de *Medicago polymorpha*

3.1.1.1/ Analyses des croisements intraspécifiques de *M. polymorpha* à tache noire au centre des folioles et *M. polymorpha* à tache brune à la base des folioles.

3.1.1.1.1/ Analyse de la F₁ des croisements intraspécifiques de *Medicago polymorpha*

3.1.1.1.1.1/ Analyse morphologique de la F₁ des croisements intraspécifiques de *M. polymorpha*

Le Tableau 8 représente les résultats du croisement *M. polymorpha* à tache brune à la base des folioles ♀ x *M. polymorpha* à tache noire au centre des folioles ♂ et son croisement réciproque obtenus en 2004 (Sahnoune, 2004) (Fig. 21).



Fig. 21 : Le morphotype *M. polymorpha* à tache brune à la base des folioles (à gauche) et le morphotype *M. polymorpha* à tache noire au centre des folioles (à droite).

Tab. 8: Les différents croisements réalisés et le nombre de gousses, de graines et des individus F₁ obtenus dans les croisements intraspécifiques de *Medicago polymorpha*.

Croisements réalisés	Nombre de gousses obtenues	Nombre de graines obtenues	Effectifs phénotypiques des F ₁
<i>M. polymorpha</i> à tache brune ♀ x <i>M. polymorpha</i> à tache noire ♂	27	146	5 individus avec tache noire et le reste des individus avec tache brune
<i>M. polymorpha</i> à tache noire ♀ x <i>M. polymorpha</i> à tache brune ♂	29	149	Tous avec tache noire

Parmi les individus F₁ du croisement *M. polymorpha* à tache brune ♀ x *M. polymorpha* à tache noire ♂ seulement 5 individus issus des graines semées sont présumés des hybrides par la présence de la tache noire d'environ 5 mm de largeur, caractère du parent mâle. Ces individus ont un développement normal et ont produit beaucoup de fleurs et par la suite de gousses fertiles. Le taux faible d'hybrides obtenus (5 individus /146 graines semées) serait dû à la technique

utilisée qui ne prévient pas à 100% contre l'autofécondation. De plus, d'après Knowless (1944), l'autofécondation est favorisée même en présence d'un pollen étranger.

Dans le croisement réciproque, *M. polymorpha* à tache noire ♀ x *M. polymorpha* à tache brune ♂, tous les descendants F₁ portent la tache noire au centre des folioles, caractère du parent femelle. Ce qui indique que la tache noire serait un caractère dominant le caractère tache brune ou bien que l'hybridation n'aurait pas réussi dans ce croisement.

Parmi ces individus une vingtaine de plantes ont présenté une déficience chlorophyllienne dont une moitié a dépéri précocement et l'autre moitié a été très peu développée (naine) et a donné très peu de fleurs et de gousses.

3.1.1.1.2/ Analyse de la fertilité pollinique de la F₁ des croisements intraspécifiques chez *M. polymorpha*

L'analyse de la fertilité pollinique effectuée sur les plantes F₁ issues du croisement *M. polymorpha* à tache brune ♀ x *M. polymorpha* à tache noire ♂ et celle du croisement réciproque a donné les résultats présentés dans le Tableau 9.

Tab. 9: La fertilité pollinique des hybrides F₁ entre le morphotype à tache noire et le morphotype à tache brune sur les folioles de *M. polymorpha*.

Croisement	Nombre de plantes analysées	Nombre de fleurs analysées	Fertilité pollinique (%)
<i>M. polymorpha</i> à tache brune ♀ x <i>M. polymorpha</i> à tache noire ♂	4	4	98-99
<i>M. polymorpha</i> à tache noire ♀ x <i>M. polymorpha</i> à tache brune ♂	15	17	7-54, 73, 94-99

La plupart des fleurs de différentes plantes analysées ont montré une fertilité pollinique très élevée, elles varient de 98-99% dans le croisement *M. polymorpha* à tache brune ♀ x *M. polymorpha* à tache noire ♂ et de 94-99 % dans le croisement *M. polymorpha* à tache noire ♀ x *M. polymorpha* à tache brune ♂ sauf pour deux individus qui ont un taux de fertilité pollinique faible (7- 54, 73%) (Tab. 9 et Fig. 22).

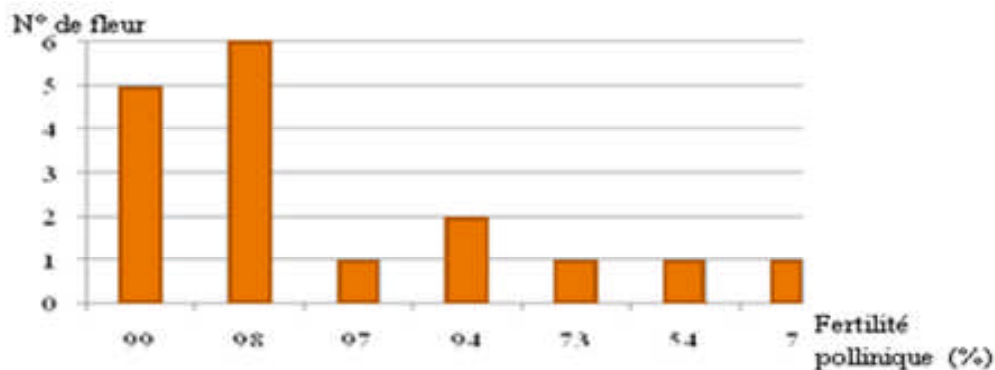


Fig. 22: Histogramme de la fertilité pollinique de F₁ du croisement *M. polymorpha* à tache noire ♀ x *M. polymorpha* à tache brune ♂.

Cette forte fertilité pollinique suggère que *M. polymorpha* à tache noire et *M. polymorpha* à tache brune sont des variétés de la même espèce *M. polymorpha*.

Le taux de fertilité faible des descendants F₁ du croisement *M. polymorpha* à tache noire ♀ x *M. polymorpha* à tache brune ♂ ne serait pas dû aux irrégularités de la méiose, mais à une stérilité mâle d'origine mutationnelle puisque des fleurs à faible fertilité pollinique (19%) et des fleurs stériles ont été signalées chez la population parentale de *M. polymorpha* à tache noire (Bouallag, 2004). Ces populations parentales ne montrent aucune ségrégation de caractères suggérant une origine hybride et de plus, ont montré une méiose normale à 7 bivalents (2 n = 14) comme le morphotype à tache brune (Fig. 23). La stérilité mâle est codée par des gènes mitochondriaux d'après Budar et Pelletier (2001) et Linke et Börner (2005).

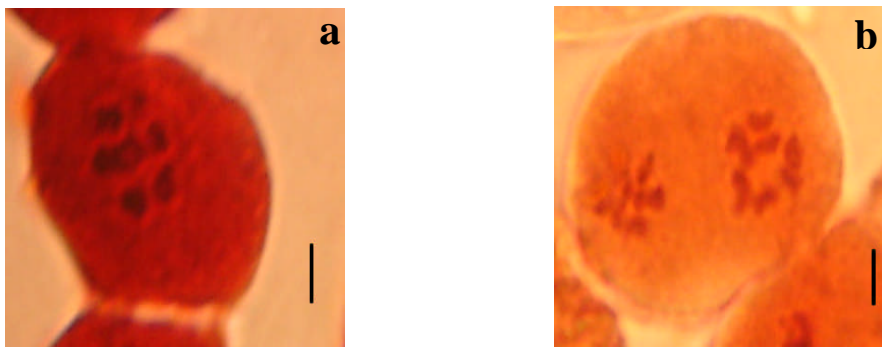


Fig. 23: Méiose des parents de *M. polymorpha* à tache brune et *M. polymorpha* à tache noire.
a: Metaphase I- b: Metaphase II. La barre d'échelle correspond à 10 µm.

3.1.1.1.2/ Analyse de la F₂ des croisements intraspécifiques de *M. polymorpha*

3.1.1.1.2.1/ Analyse du déterminisme génétique des états de caractères des taches sur les folioles

7 gousses produites par les descendants F₁ du croisement *M. polymorpha* à tache noire ♀ x *M. polymorpha* à tache brune ♂ ont été choisies au hasard pour la culture au laboratoire, dont 2 gousses se sont révélées hybrides et ont donné 8 plantes F₂.

Dans le croisement réciproque, 13 gousses ont été prises pour la culture au laboratoire. Ces gousses ont donné 64 plantes F₂. Les autres gousses restantes sont cultivées au champ et ont donné 200 plantes F₂.

3.1.1.1.2.1.1/ Analyse du déterminisme des états de caractère "tache noire" et "sans tache noire"

Le Tableau 10 donne les différentes classes phénotypiques de la F₂ du croisement *M. polymorpha* sans tache noire ♀ x *M. polymorpha* à tache noire et son croisement réciproque selon le type de culture.

Tab. 10: Effectifs des classes phénotypiques de la F₂ du croisement *M. polymorpha* sans tache noire ♀ x *M. polymorpha* avec tache noire ♂ et son croisement réciproque.

Parents et F ₁	Type de culture	Nombre de plantes		Rapport	χ^2 (ddl= 1)	P
		Avec tache noire	Sans tache noire			
Croisement : <i>M. polymorpha</i> sans tache noire ♀ x <i>M. polymorpha</i> à tache noire ♂ F₁ : avec tache noire	Au champ	111	89	3 :1	40,56	0,00
	Au laboratoire	47	17	3 :1	0,083	0,77
Croisement : <i>M. polymorpha</i> à tache noire ♀ x <i>M. polymorpha</i> sans tache noire ♂ F₁ : avec tache noire	Au laboratoire*	4*	4*	3 :1	2,66	0,10

* Les gousses des hybrides F₁ de *M. polymorpha* à tache noire ♀ x *M. polymorpha* à tache brune ♂ ont été laissées naturellement pousser au champ. Nous avons observé que certaines gousses ont donné à la fois des individus avec tache noire et d'autres avec tache brune. Ce qui prouve leur état hybride et que le caractère "tache noire" empêche l'expression du caractère "tache brune".

* Les conditions d'application du test χ^2 ne sont pas réunies (effectifs des classes inférieurs à 5). Nous avons utilisé le test de comparaison de deux proportions : la proportion 4/8 (= 0,5) de la classe des individus avec tache a été comparée à la proportion théorique de 3/4 (0,75) et la proportion 4/8 (= 0,5) de la classe des individus sans tache a été comparée à la proportion théorique de 1/4 (0,25). Les probabilités obtenues sont toutes deux de P = 0,32 (supérieures à 0,05). L'hypothèse 3 :1 est donc retenue.

D'après le Tableau 10, le croisement *M. polymorpha* sans tache noire ♀ x *M. polymorpha* à tache noire ♂, au champ, a donné en F₂: 111 plantes avec tache noire et 89 plantes sans tache noire. Le test χ^2 de l'hypothèse du rapport 3:1 donne une probabilité P = 0,00, ce qui est très faible (très inférieure à P = 0,05). L'hypothèse du rapport 3:1 ne peut donc être retenue. Avant d'interpréter ce résultat voyons ce qui se passe dans les deux autres cas.

Les descendants du croisement *M. polymorpha* sans tache noire ♀ x *M. polymorpha* à tache noire ♂ (Tab.10) cultivés au laboratoire sont répartis en 47 plantes avec tache noire et 17 plantes sans tache noire. La probabilité P pour l'hypothèse du rapport 3:1 est P = 0,77 (très supérieure à 0,05) l'hypothèse du rapport 3:1 peut donc être retenue pour le cas des F₂ cultivés au laboratoire.

Dans le croisement *M. polymorpha* à tache noire ♀ x *M. polymorpha* sans tache noire ♂ (au laboratoire), les individus sont répartis en 4 plantes avec tache noire et 4 sans tache noire. La probabilité P pour le rapport 3:1 est P = 0,10 (supérieure à 0,05). Dans ce cas aussi, l'hypothèse du rapport 3 :1 peut être retenue.

Nous pouvons constater d'après ces résultats que le rapport 3:1 se retrouve seulement lorsque la F₂ est cultivée au laboratoire ou les conditions de croissance sont optimales (arrosage régulier, absence de compétition et de sélection, température et lumière non excessives).

Lorsque la F₂ est cultivée au champ, le rapport 3:1 n'est pas vérifié. Ceci suggère deux hypothèses : ou bien l'expression du phénotype "tache noire" est inhibée par l'excès de lumière (phénomène signalé par Lesins *et al.*, 1971 pour *Medicago* sect. *Intertextae*), ou bien certains génotypes d'individus à tache noire sont moins adaptés aux conditions au champ et seraient donc partiellement éliminés par la sélection naturelle.

L'hypothèse d'un gène a deux allèles **N** dominant (codant la présence de la tache noire) et **n** récessif (codant l'absence de la tache noire) suggérée par les résultats de la F₁ est confirmée par les résultats de la F₂.

3.1.1.2.1.2/ Analyse du déterminisme génétique des états de caractère "tache brune" et "sans tache brune"

Le Tableau 11 donne les effectifs des différentes classes phénotypiques de la F₂ du croisement *M. polymorpha* à tache brune ♀ x *M. polymorpha* sans tache brune ♂ et son croisement réciproque selon le type de culture.

Tab. 11: Effectifs des classes phénotypiques de la F₂ du croisement *M. polymorpha* à tache brune ♀ x *M. polymorpha* sans tache brune ♂.

Parents et F ₁	Type de culture	Nombre de plantes		Rapport	χ^2 (ddl = 1)	P
		Avec tache brune	Sans tache brune			
Croisement : <i>M. polymorpha</i> à tache brune ♀ x <i>M. polymorpha</i> sans tache brune ♂ F₁ : avec tache noire	Au champ	29	171	3 :1	390,42	0,00
	Au laboratoire	16	48	3 :1	85,33	0,00
Croisement : <i>M. polymorpha</i> sans tache brune ♀ x <i>M. polymorpha</i> à tache brune ♂ F₁ : avec tache noire	Au laboratoire	4*	4*	3 :1	0,888	0,10

* condition d'application du test χ^2 non respectées (effectifs < 5). Le test de comparaison de deux proportions a été utilisé (voir Tab.11) et l'hypothèse 3 :1 a été retenue.

Les tests de χ^2 (Tab.11) du rapport 3:1 supposant un gène à deux allèles **B** dominant (codant la présence de la tache brune) et **b** récessif (codant l'absence de la tache brune) a donné des probabilités très faibles. L'hypothèse du rapport 3:1 n'est pas vérifiée. Ceci serait dû au fait que la présence du gène **N** (présence de la tache noire) est épistatique sur **B** (présence de la tache brune). Autrement dit, parmi les individus sans tache brune, ceux portant un allèle **N** (présence de la tache noire) ne voient pas leur tache brune s'exprimer quand bien ils portent l'allèle **B** (présence de la tache brune).

3.1.1.1.2.1.3/ Analyse combinée du déterminisme génétique des états de caractères "tache noire" et "tache brune"

Le Tableau 12 donne les effectifs des différentes classes phénotypiques des individus F₂ du croisement *M. polymorpha* à tache brune ♀ x *M. polymorpha* à tache noire ♂ et son croisement réciproque selon le type de culture.

Tab. 12: Effectifs des classes phénotypiques du croisement *M. polymorpha* à tache brune ♀ x *M. polymorpha* ♂ à tache noire et son croisement réciproque.

Parent et F ₁	Type de culture	Effectifs observés			Rapport	χ^2 (ddl = 2)	P
		Avec tache noire	Avec tache brune	Sans tache			
Croisement : <i>M. polymorpha</i> à tache brune ♀ x <i>M. polymorpha</i> à tache noire ♂ F₁ : avec tache noire	Au champ	111	29	60	12 :3 :1	192,56	0,00
	Au laboratoire	47	16	1 ¹	12 :3 :1	3,604	0,16
Croisement : <i>M. polymorpha</i> à tache noire ♀ x <i>M. polymorpha</i> à tache brune ♂ F₁ : avec tache noire	Au laboratoire	4 ²	4 ²	0 ²	12 :3 :1	5,33	0,07

1- condition du test de χ^2 enfreintes (effectif <5). Le test χ^2 de l'hypothèse 12:4 (après avoir réuni la 2^{ème} et la 3^{ème} classe) a donné $\chi^2 = 0,083$ avec P = 0,77 (>>0,05) : l'hypothèse 12 :4 et (par ricochet) celle de 12 :3 :1 sont retenues.
2- Effectifs < 5 pour toutes les classes. L'application du test de comparaison des proportions observées des trois classes (0,5, 0,5 et 0 respectivement) aux proportions théoriques (0,75, 0,1875 et 0,0625) a donné des probabilités respectivement de P₁ = 0,33, P₂ = 0,21 et P₃ = 0,48, sont supérieures à 0,05, l'hypothèse 12 :3 :1 est donc retenue.

Nous avons vu précédemment que lorsque le caractère "tache noire" est présent le caractère "tache brune" n'est pas exprimé quand bien même l'allèle **B** (codant la tache brune) est présumé être présent. Ce qui suggère une épistasie de l'allèle **N** (tache noire) sur l'allèle **B** (tache brune). Cette hypothèse prévoit en F₂ un rapport 12:3:1.

Le test χ^2 (Tab.12) montre que cette hypothèse est vérifiée pour les hybrides F₂ cultivées au laboratoire (P > 0,05) mais pas vérifiée pour les F₂ cultivées au champ. La non vérification de cette hypothèse sur les hybrides F₂ au champ peut être attribuée à l'effectif accru des individus sans taches (Tab. 12 et Fig. 24, a). Cet effectif accru des sans taches serait dû, comme mentionné précédemment, à l'excès de lumière défavorisant l'expression des taches ou à une faible compétitivité de certains individus portant les caractères de tache.

Sous cette hypothèse, les génotypes et les phénotypes des parents et des hybrides F1 et F2 seraient comme suit :

Génération parentale :

Phénotype: Parent 1 avec tache noire x Parent 2 avec tache brune

Génotype: NNbb x nnBB

Gamètes : 1 Nb 1 nB

Génération F₁ :**Génotype :** 100% NnBb**Phénotype :** 100% avec tache noire**Gamètes :** ¼ NB, ¼ Nb, ¼ nB, ¼ nb**Génération F₂ :** croisement de F₁ x F₁**Fréquences génotypiques :**

	¼ NB	¼ Nb	¼ nB	¼ nb
¼ NB	1/16 NNBB	1/16 NNBb	1/16 NnBB	1/16 NnBb
¼ Nb	1/16 NNBb	1/16 NNbb	1/16 NnBb	1/16 Nnbb
¼ nB	1/16 NnBB	1/16 NnBb	1/16 nnBB	1/16 nnBb
¼ nb	1/16 NnBb	1/16 Nnbb	1/16 nnBb	1/16 nnbb

Fréquences phénotypiques :

9/16 N-B - } 12 avec tache noire
 3/16 N-bb }
 3/16 nnB- } 3 avec tache brune
 1/16 nnbb } 1 sans tache

La répartition en cloche des différentes classes de tailles des taches suggère que ces caractères seraient quantitatifs, c'est-à-dire, codés par plusieurs gènes (Fig.24).

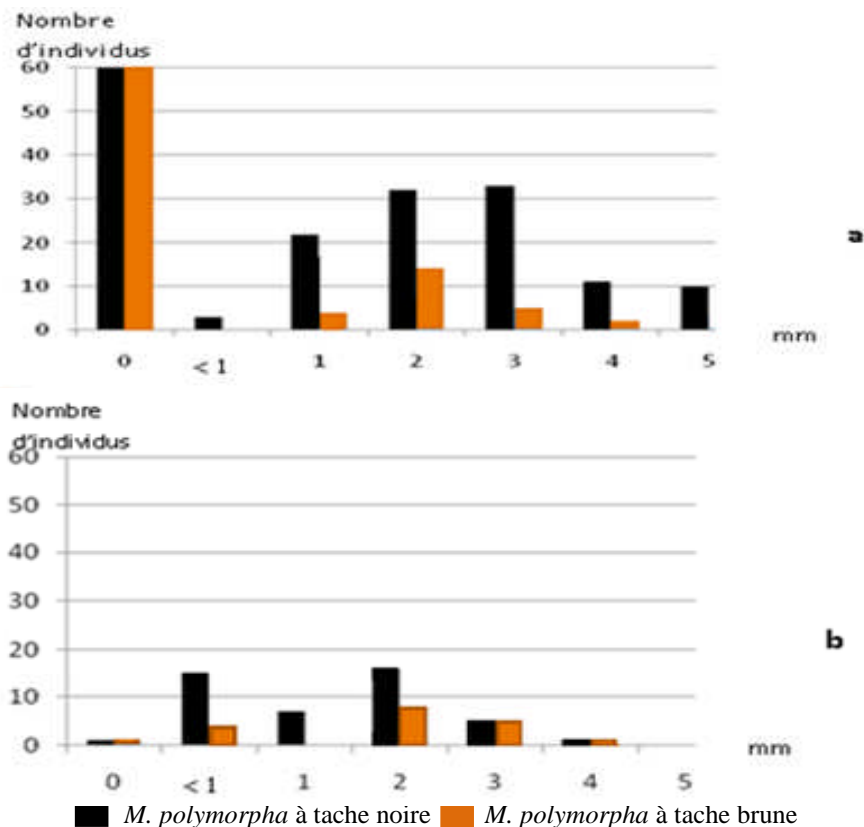


Fig. 24: Variabilité de la taille des taches noires et brunes sur les folioles de la F₁ du croisement *M. polymorpha* à tache noire ♀ x *M. polymorpha* à tache brune ♂.

a : au champ cultivé en janvier 2006 ; **b :** au laboratoire cultivé en décembre 2005

3.1.1.1.2.2/ Phénomène de nanisme chez les descendants F₂ du croisement intraspécifique chez *M. polymorpha*

Parmi les descendants F₂ cultivés au champ, 116 ont montré un développement normal et 84 sont nains dont 10 à déficience chlorophyllienne. Au laboratoire, 56 plantes F₂ ont montré un développement normal et 8 plantes sont naines (Fig. 25). Ce phénomène de nanisme, suggère que les génomes des deux morphotypes parentaux sont assez différents et comportent des gènes incompatibles défavorisant le développement des hybrides F₂. Cette faiblesse hybride des F₂ contribue certainement à la limitation du flux de gènes entre le morphotype à tache noire et le morphotype à tache brune qui formeraient de ce fait deux compartiments d'un même complexe d'espèces. Ce phénomène de nanisme, a déjà été signalé par d'autres auteurs chez les hybrides intraspécifiques F₂ chez *M. polymorpha*.

D'après Lesins et Lesins (1979) l'état nain des descendants hybrides F₂ issu d'un croisement entre une plante à gousses épineuses et une plante à gousses inermes chez *M. polymorpha* est causé par la déficience dans la production de la chlorophylle. Apparemment, pour une synthèse normale chez les parents, deux différentes voies sont concernées pour la production de la chlorophylle.

D'après De Haan et Barnes (1998), le caractère nain absent chez les parents et chez les descendants hybrides F₁ est codé par deux gènes (Dw1, Dw2) avec une épistasie récessive partielle. Les descendants F₂ nains présentent des tiges, des entrenœuds, des pétioles et des feuilles beaucoup plus courts que les parents.



Fig. 25 : Nanisme chez les hybrides F₂ du croisement *M. polymorpha* à tache brune ♀ x *M. polymorpha* à tache noire ♂. Individus nains à gauche et individus normaux à droite.

3.1.1.1.2.3/ Analyse de la fertilité pollinique de la F₂ des croisements intraspécifiques chez *M. polymorpha*

L'analyse de la fertilité pollinique effectuée sur les plantes F₂ du croisement *M. polymorpha* à tache brune ♀ x *M. polymorpha* à tache noire ♂ et son croisement réciproque est présentée dans le Tableau 13.

Tab. 13: La fertilité pollinique de la F₂ entre le morphotype à tache noire et le morphotype à tache brune sur les folioles de *M. polymorpha*.

Croisements	Nombre de plantes analysées	Nombre de fleurs analysées	Fertilité pollinique (%)
<i>M. polymorpha</i> à tache brune ♀ x <i>M. polymorpha</i> à tache noire ♂	22	22	97-99
<i>M. polymorpha</i> à tache noire ♀ x <i>M. polymorpha</i> à tache brune ♂	10	10	97-100

La fertilité pollinique des deux croisements est très élevée et elle varie de 97- 99% dans le croisement *M. polymorpha* à tache brune ♀ x *M. polymorpha* à tache noire et 97-100% (Tab.13) dans le croisement *M. polymorpha* à tache noire ♀ x *M. polymorpha* à tache brune ♂.

3.1.2/ Cas de *Medicago intertexta*

3.1.2.1/ Analyse du croisement intraspécifique de *Medicago intertexta* sans tache sur les folioles et aux stipules normales ♀ x *M. intertexta* à tache brune au centre des folioles et aux stipules foliacées ♂.

3.1.2.1.1/ Analyse de la F₁ du croisement intraspécifique de *Medicago intertexta*.

3.1.2.1.1.1/ Analyse morphologique de la F₁ du croisement intraspécifique de *Medicago intertexta*.

Le Tableau 14 représente les résultats du croisement *M. intertexta* sans tache sur les folioles et aux stipules normales ♀ x *M. intertexta* à tache brune au centre des folioles et aux stipules foliacées ♂ réalisés en 2004 (Sahnoune, 2004) (Fig. 26 et 27).



Fig. 26 : Le morphotype *M. intertexta* avec tache brune au centre des folioles.



Fig. 27 : Le morphotype *M. intertexta* à tache brune au centre des folioles et aux stipules foliacées (à gauche) et le morphotype *M. intertexta* sans tache et aux stipules normales (à droite).

Tab. 14: Nombre de gousses et de graines et les individus F_1 obtenus après croisement intraspécifique chez *Medicago intertexta*.

Croisements	Type de culture	Nombre de gousses obtenues	Nombre de graines obtenues	Effectifs phénotypiques des F_1
<i>M. intertexta</i> sans tache, aux stipules normales ♀ x <i>M. intertexta</i> avec tache et aux stipules foliacées ♂	Au champ	4	21	5 individus avec tache brune et stipules normales le reste tous sont sans tache et aux stipules normales

Dans le croisement *M. intertexta* sans tache et aux stipules normales ♀ x *M. intertexta* avec tache et aux stipules foliacées ♂, 4 gousses ont été obtenues et ont donné 21 individus, dont 5 sont présumés des hybrides par la présence de la tache brune au centre des folioles (Tab. 14) mais aux stipules normales. Cela indique que les états de caractères "tache brune" et "stipules normales" seraient dominants et les états des caractères "sans tache au centre" et "stipules foliacées" seraient récessifs.

Le nombre de gousses obtenues dans le croisement *M. intertexta* sans tache et aux stipules normales ♀ x *M. intertexta* avec tache et aux stipules foliacées ♂ est faible (4 gousses) par rapport au nombre des gousses obtenues dans les croisements intraspécifiques de *Medicago polymorpha* (29 gousses). Cela est dû au fait que *M. intertexta* supporte moins le stress de la manipulation des fleurs que *M. polymorpha*.

La proportion d'individus hybrides est plus élevée chez *M. intertexta* (5/21) que chez *M. polymorpha* (5/176). Il est utile de rappeler ici que *M. intertexta* est une espèce allogame (allofécondation favorisée/ autofécondation) tandis que *M. polymorpha* est une espèce autogame (autofécondation favorisée/ allofécondation) (Heyn, 1963, Lesins et Lesins, 1979 & Abdelkefi *et*

al., 2001). De plus, d'après Novoselova (2003), *M. intertexta* se compte parmi les espèces annuelles de *Medicago* les moins cleistogames. La cleistogamie favorise l'autogamie tandis que la chasmogamie favorise l'allogamie.

3.1.2.1.1.2/ Analyse de la fertilité pollinique de la F₁ du croisement intraspécifique de *Medicago intertexta*

Le taux de fertilité pollinique effectué sur 16 fleurs des descendants hybrides (5 plantes) F₁ obtenus varie de 78- 99% dans le croisement *M. intertexta* sans tache et aux stipules normales ♀ x *M. intertexta* avec tache et aux stipules foliacées ♂. Ce qui suggère que les deux morphotypes *M. intertexta* sans tache et aux stipules normales et *M. intertexta* avec tache et aux stipules foliacées sont deux variétés de la même espèce *M. intertexta*.

L'analyse de la méiose effectuée sur les populations parentales et les descendants F₁ ont montré une ségrégation normale à 8 bivalents (Fig. 28).

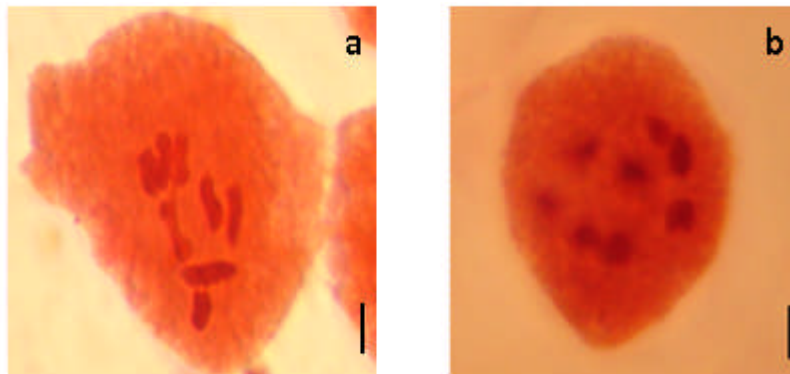


Fig. 28: Méiose normale chez *Medicago intertexta*.

a: Métaphase I de *M. intertexta* avec stipules normales (été 2005)- **b:** Métaphase I de *M. intertexta* avec stipules foliacées (printemps 2006). La barre d'échelle correspond à **10 µm**.

3.1.2.1.2/ Analyse de la F₂ du croisement intraspécifique chez *M. intertexta*

3.1.2.1.2.1/ Analyse du déterminisme génétique des états de caractère "tache brune" et sans "tache brune" au centre des folioles

12 gousses produites par les descendants F₁ du croisement *M. intertexta* sans tache et aux stipules normales ♀ x *M. intertexta* avec tache et aux stipules foliacées ♂ ont été choisies au hasard pour la culture au laboratoire, et ont donné 86 plantes F₂. Les autres gousses ont été cultivées au champ et ont donné 289 plantes F₂. Le Tableau 15 donne les effectifs de classes phénotypiques de la F₂ du croisement *M. intertexta* sans tache ♀ x *M. intertexta* avec tache ♂ selon le type de culture.

Tab. 15: Effectifs des classes phénotypiques de la F₂ du croisement *M. intertexta* sans tache ♀ x *M. intertexta* à tache brune ♂.

Parents et F ₁	Type de culture	Nombre de plantes		Rapport	χ^2 (ddl = 1)	p
		Avec tache au centre des folioles	Sans tache au centre des folioles			
Croisement : <i>M. intertexta</i> sans tache, ♀ x <i>M. intertexta</i> avec tache ♂ F₁ : avec tache brune au centre des folioles	Au champ	77	212	3 : 1	360,416	0,00
	Au laboratoire	68	18	3 : 1	0,76	0,38

Les descendants cultivés au champ (Tab.15) sont répartis en 77 plantes avec tache brune au centre des folioles et 212 plantes sans tache. Le test χ^2 de l'hypothèse du rapport 3:1 donne P = 0,00 (très inférieure à 0,05). L'hypothèse du rapport 3:1 ne peut donc être retenue.

Au laboratoire, les descendants sont répartis en 68 plantes avec tache brune au centre des folioles et 18 plantes sans tache. Le test χ^2 (Tab.15) de l'hypothèse du rapport 3:1 donne P = 0,38 (supérieure à 0,05). L'hypothèse du rapport 3:1 peut donc être retenue.

D'après ces résultats, le rapport 3:1 est vérifié lorsque la F₂ est cultivée au laboratoire (orientation est) où les conditions de croissance sont favorables (arrosage régulier, température et lumière non excessives). Par contre le rapport 3:1 n'est pas vérifié lorsque la F₂ est cultivée au champ. Au champ, la proportion des individus sans tache est excessive. Ceci serait dû au fait que, lorsque les individus sont trop exposés à la lumière, l'expression de la tache est inhibée, phénomène aussi signalé par Lesins *et al.* (1971).

Nous retenons donc l'hypothèse d'un gène à deux allèles avec **B** allèle dominant codant pour le caractère "tache brune" et **b** allèle récessif codant pour le caractère "sans tache".

La grande variabilité de la taille de la tache au centre des folioles suggère que ce caractère serait quantitatif (Fig. 29).

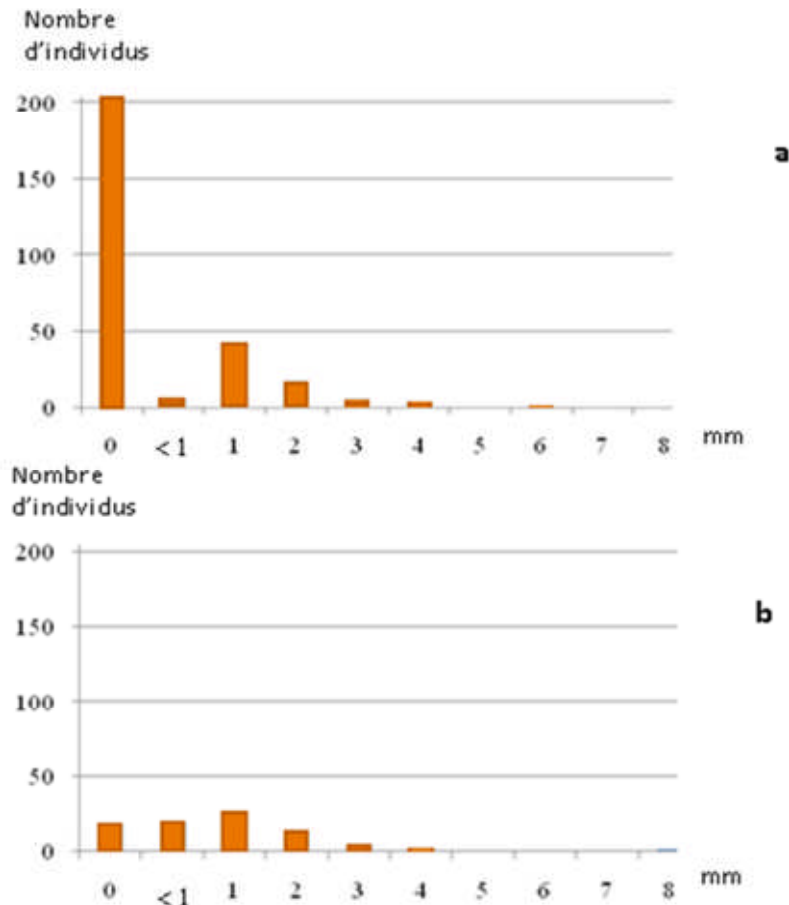


Fig. 29 : Variabilité de la taille de la tache brune au centre des folioles dans la F₂ du croisement *M. intertextata* avec tache ♀ x *M. intertextata* sans tache ♂.
a : culture au champ (janvier 2006)- **b** : culture au laboratoire (décembre 2005).

3.1.2.1.2.2/ Analyse du déterminisme génétique des états de caractère "stipules normales" et "stipules foliacées".

Le Tableau 16 donne les effectifs des différentes classes phénotypiques de la F₂ du croisement *M. intertextata* aux stipules normales ♀ x *M. intertextata* aux stipules foliacées ♂ selon le type de culture.

Tab. 16: Effectifs des classes phénotypiques de la F₂ du croisement *M. intertextata* aux stipules normales ♀ x *M. intertextata* aux stipules foliacées ♂.

Parents et F ₁	Type de culture	Nombre de plantes		Rapport	χ^2 (ddl = 1)	p
		Avec stipules normales	Avec stipules foliacées			
Croisement : <i>M. intertextata</i> aux stipules normales ♀ x <i>M. intertextata</i> aux stipules foliacées ♂ F ₁ : avec tache brune au centre des folioles	Au champ	253	36	3 : 1	24,25	0,00
	Au laboratoire	72	14	3 : 1	3,488	0,61

Les descendants F_2 cultivés au champ sont répartis en 253 plantes avec des stipules normales et 36 plantes avec des stipules foliacées. Le test χ^2 (Tab. 16) de l'hypothèse du rapport 3:1 donne $P = 0,00$ (très inférieure à 0,05). Cette hypothèse ne peut donc être retenue.

Concernant les individus F_2 cultivés au laboratoire, ils sont répartis en 72 avec stipules normales et 14 avec stipules foliacées. Le test χ^2 de l'hypothèse du rapport 3:1 (Tab. 16) donne $P = 0,061$ (très supérieure à 0,05). Cette hypothèse peut donc être retenue.

La proportion des individus F_2 aux stipules foliacées est de 0,12 pour la culture au champ et de 0,16 pour la culture au laboratoire. Le test de comparaison de deux proportions a montré que ces deux valeurs (0,12 et 0,16) sont statistiquement identiques ($P = 0,33$). Ces deux proportions sont toutes deux différentes de la valeur de 0,25 prévue par l'hypothèse 3:1. Les individus aux stipules foliacées sont moins nombreux qu'il était attendu. Cette réduction de la proportion des F_2 aux stipules foliacées serait due au fait que la F_2 analysée n'est pas issue uniquement des croisements F_1 mais aussi des croisements F_1 avec d'autres individus de *M. intertexta* et *M. ciliaris* cultivés à côté des F_1 . Pour preuve nous avons observé parmi les F_2 des individus hybrides entre *M. intertexta* et *M. ciliaris* reconnaissables à leurs gousses légèrement poilues, fertilité pollinique réduite (8- 35%) et méioses irrégulières. 32/86 individus (37%) en culture au laboratoire se sont ainsi révélés de nature hybride.

Le rapport 3:1 prévoyait 64 individus aux stipules normales et 22 individus aux stipules foliacées. A cause du croisement des F_1 avec *M. ciliaris*, grâce aux insectes, l'effectif des F_2 serait réduit de 37% (fréquence des hybrides) c'est-à-dire de 8 individus. Si nous retranchons 8 individus des 22 attendus nous retrouvons les 14 individus observés.

Sans l'hybridation des F_1 avec *M. ciliaris*, nous devrions avoir au laboratoire 64 individus aux stipules normales et 22 individus aux stipules foliacées. Le test χ^2 du rapport 3:1 avec ces effectifs donne $\chi^2_{(1)} = 0,015$ et $P = 0,90$ (rapport 3:1 hautement probable).

Au champ, 217 F_2 aux stipules normales et 72 aux stipules foliacées étaient attendus en absence des croisements des F_1 avec *M. ciliaris*. En supposant une fréquence d'hybridation de 37% des F_1 avec *M. ciliaris*, nous nous attendrions à 226 F_2 aux stipules normales et 63 aux stipules foliacées. Le test χ^2 de ces nouveaux effectifs donne $\chi^2_{(1)} = 1,57$ et $P = 0,2$. L'hypothèse du rapport 3:1 est donc aussi vérifiée.

L'hérédité du type de stipules chez *M. intertexta* dépend d'un gène chromosomique à deux allèles avec **S** dominant codant pour "stipules normales" et **s** récessif codant pour "stipules foliacées".

Autre raisonnement :

Soient Ss le génotype des F_1 femelles, $(1-x) Ss$ la proportion des F_1 mâle et $x S_c S_c$ la proportion des individus *M. ciliaris* mâles ayant participé à l'obtention de la F_2 .

Nous avons :

$$\text{Gamètes: } \begin{matrix} Ss \text{ } \text{♀} \\ \left[\begin{array}{l} \frac{1}{2} S \\ \frac{1}{2} s \end{array} \right] \end{matrix} \quad \text{X} \quad \begin{matrix} (1-x) Ss \text{ } \text{♂} \\ \left[\begin{array}{l} \frac{1}{2} (1-x) S \\ \frac{1}{2} (1-x) s \end{array} \right] \end{matrix} + x S_c S_c \text{ } \text{♂} \\ + x S_c \end{matrix}$$

Formules gamétiques:

Parents ♀: $\frac{1}{2} S + \frac{1}{2} s$

Parents ♂: $(\frac{1}{2} - x/2) S + x S_c + (\frac{1}{2} - x/2) s$

La F_2 : Gamètes ♀	Gamètes ♂	Génotypes F_2	Phénotypes F_2	
$\frac{1}{2} S$	$(\frac{1}{2} - x/2) S$	$(\frac{1}{4} - x/4) SS$	} Stipules normales	
	$x S_c$	$x/2 SS_c$ hybrides		
	$(\frac{1}{2} - x/2) s$	$(\frac{1}{4} - x/4) Ss$		
$\frac{1}{2} s$	$(\frac{1}{2} - x/2) S$	$(\frac{1}{4} - x/4) Ss$		} Stipules foliacées
	$x S_c$	$x/2 S_c s$ hybrides		
	$(\frac{1}{2} - x/2) s$	$(\frac{1}{4} - x/4) ss$		

Détermination de x (proportion des gamètes ♂ de *M. ciliaris* ayant participé à la formation de la F_2):

$x/2 SS_c + x/2 S_c s = 0,37$ (proportion des hybrides avec *M. ciliaris* au laboratoire).

$x/2 + x/2 = 0,37 \Rightarrow x = 0,37$.

Proportion des F_2 aux stipules foliacées est $(\frac{1}{4} - x/4) ss$.

En remplaçant x par $0,37$, cette proportion est de $\frac{1}{4} - 0,37/4 = 0,1575 \simeq 0,16$, proportion des F_2 aux stipules foliacées observée au laboratoire.

Le test de χ^2 des résultats de ce raisonnement :

Effectifs observés : 72 stipules normales + 14 stipules foliacées.

Effectifs théoriques : 72,455 stipules normales + 13,545 stipules foliacées.

Les résultats sont : $\chi^2_{(1)} = 0,018$ avec $P = 0,89$ (hypothèse hautement probable).

3.1.2.1.2.3/ Analyse combinée des caractères de tache sur les folioles et de type de stipules.

Le Tableau 17 donne les effectifs des différentes classes phénotypiques de la F₂ du croisement *M. intertexta* sans tache et stipules normales ♀ x *M. intertexta* avec tache et stipules foliacées ♂.

Tab. 17: Effectifs des classes phénotypiques de la F₂ du croisement *M. intertexta* sans tache sur les folioles et aux stipules normales ♀ x *M. intertexta* avec tache sur les folioles et aux stipules foliacées ♂.

Parents et F ₁	Type de culture	Nombre de plantes F ₂ issues de la F ₁				Rapport	χ^2 (ddl = 3)	P
		Avec tache au centre des folioles		Sans tache au centre des folioles				
		stipules normales	stipules foliacées	stipules normales	stipules foliacées			
Croisement : <i>M. intertexta</i> sans tache, stipules normales ♀ x <i>M. intertexta</i> avec tache et stipules foliacées ♂ F₁ : avec tache et stipules normales	Au champ	61	16	192	20	9 : 3 : 3 : 1	441,06	0,00
	Au laboratoire	57	11	15	3*	9 : 3 : 3 : 1	4,294	0,23

* Effectif inférieur à 5 enfreignant les conditions d'applications du test χ^2 : la reprise du test χ^2 de l'hypothèse 9 : 4 : 3 (effectifs observés: 57, 14 et 15) a donné $\chi^2 = 4,23$ avec P = 0,12 (supérieure à 0,05) ; l'hypothèse 9:4:3 donc, par ricochet 9:3:3:1, peut être retenue.

Le test χ^2 (Tab.17) de l'hypothèse 9:3:3:1 est vérifiée pour les F₂ cultivées au laboratoire avec P = 0,23 (très supérieure à 0,05) mais pas vérifiée pour les F₂ cultivées au champ avec P = 0,00 (très inférieure à 0,05). La non vérification de cette hypothèse sur les F₂ au champ peut être attribuée à l'effectif accru des individus sans taches (Tab.17) et le croisement interspécifique avec *M. ciliaris*.

L'effectif accru des sans taches serait dû à l'excès de lumière défavorisant l'expression des taches, phénomène signalé par Lesins *et al.* (1971).

L'hypothèse de deux gènes indépendants du rapport 9 : 3 : 3 : 1 codant pour la présence/absence de la tache brune au centre des folioles et le type de stipules est retenue. Nous serions donc en présence de deux gènes indépendants :

Gène 1: allèle B : dominant, codant pour la présence de la tache brune au centre des folioles ;
allèle b : récessif, codant pour l'absence de la tache.

Gène 2: allèle S : dominant, codant le type normal des stipules ;
allèle s : récessif, codant pour le type foliacé des stipules.

Sous cette hypothèse, les génotypes et les phénotypes des parents et des hybrides F1 et F2 seraient comme suit :

Génération parentale :

Phénotype: Parent 1 sans tache **X** Parent 2 avec tache brune
et aux stipules normales et aux stipules foliacées

Génotype: bbSS **X** BBss

Gamètes: 1 bS 1 Bs

Génération F₁ :

Génotype : 100% BbSs

Phénotype : 100% avec tache brune et aux stipules normales

Gamètes : ¼ BS, ¼ Bs, ¼ bS, ¼ bs

Génération F₂ : croisement de F₁ x F₁

Fréquences génotypiques :

	¼ BS	¼ Bs	¼ bS	¼ bs
¼ BS	1/16 BBSS	1/16 BBSs	1/16 BbSS	1/16 BbSs
¼ Bs	1/16 BBSs	1/16 BBss	1/16 BbSs	1/16 Bbss
¼ bS	1/16 BbSS	1/16 BbSs	1/16 bbSS	1/16 BbSs
¼ bs	1/16 BbSs	1/16 Bbss	1/16 bbSs	1/16 bbss

Fréquences phénotypiques :

9/16 B-S- 9 avec tache brune et aux stipules normales

3/16 B-ss 3 avec tache brune et aux stipules foliacées

3/16 bbS- 3 sans tache et aux stipules foliacées

1/16 bbss 1 sans tache et aux stipules normales

3.1.2.1.3/ Analyse de la fertilité pollinique de la F₂ du croisement intraspécifique *M. intertexta* sans tache et aux stipules normales ♀ x *M. intertexta* avec tache et aux stipules foliacées ♂.

L'analyse de la fertilité pollinique a porté sur 50 plantes F₂ cultivées au laboratoire du croisement *M. intertexta* sans tache et aux stipules normales ♀ x *M. intertexta* avec tache brune et aux stipules foliacées ♂. En tout 64 fleurs ont été analysées et les taux de fertilité pollinique sont de 70-99%, valeurs élevées et non différentes de celles trouvées pour les parents (78- 99%).

Le développement normal des individus F₂ et leur haute fertilité pollinique confirment le statut taxonomique de variété du morphotype aux stipules foliacées.

3.1.2.2/ Analyses des croisements interspécifiques entre *Medicago intertexta* et *M. ciliaris*.

3.1.2.2.1/ Analyse des hybrides entre *Medicago intertexta* et *M. ciliaris*.

La tentative de croisement expérimentale par la technique manuelle de *Medicago intertexta* et *M. ciliaris* n'a pas jusqu'ici donné de résultats (Sahnoune, 2004).

Cependant, la culture au champ de plantes de *M. intertexta* (Fig. 30) et de *M. ciliaris* (Fig. 31) a permis d'obtenir des hybrides F₁ entre ces deux espèces grâce à des insectes pollinisateurs butinant sur leurs fleurs. Ces insectes appartiennent essentiellement à différentes espèces d'abeilles solitaires ou de papillons (Fig. 32).

Ce sont ces hybrides F₁ obtenus grâce aux insectes que nous allons analyser.



Fig. 30 : *M. intertexta* en culture au champ.



Fig. 31 : *M. ciliaris* en herbier.

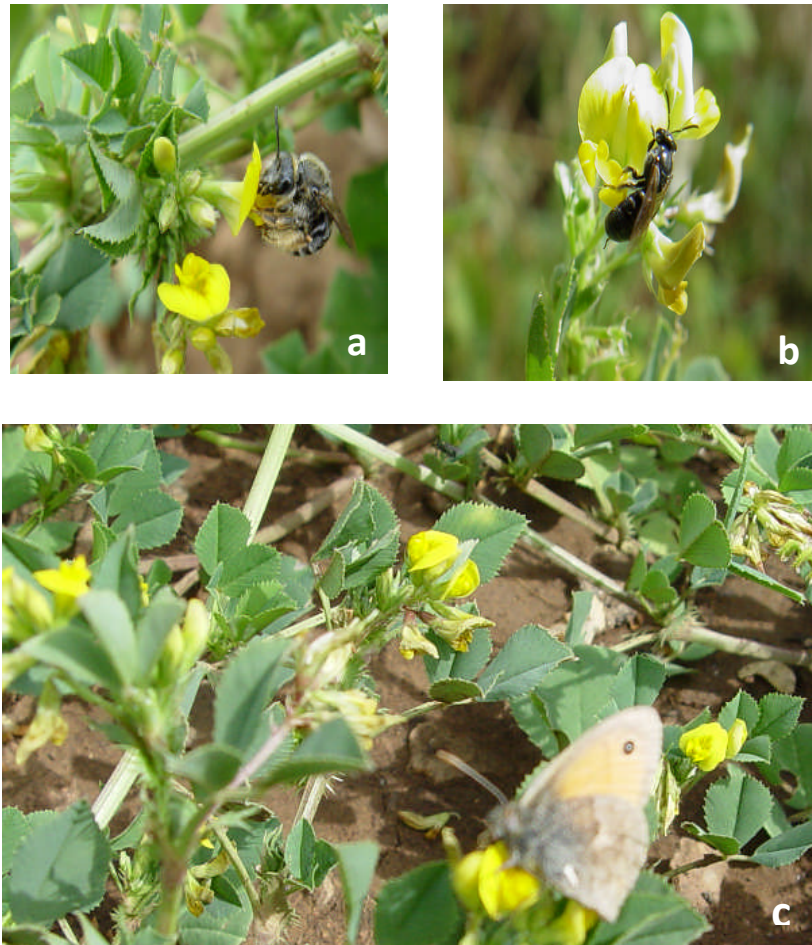


Fig. 32 : Insectes butinant sur les fleurs de *Medicago intertexta*.
a et b : abeilles solitaires ; c : papillon.

3.1.2.2.1.1/ Analyse morphologique de la F₁ du croisement *M. intertexta* ♀ x *M. ciliaris* ♂.

Le Tableau 18 résume les principaux caractères morphologiques des hybrides en comparaison avec leurs parents *M. intertexta* et *M. ciliaris*.

Tab. 18: Principaux caractères distinguant les hybrides interspécifiques F₁ de leurs parents *M. intertexta* et *M. ciliaris*.

Principaux caractères	<i>M. intertexta</i>	Hybrides	<i>M. ciliaris</i>
Nombres de fleurs par grappe	(1) 2- 12	2-6	1-5
Pilosité de gousses	Glabres	Peu poilues	Très poilues
Longueur des épines des gousses	≈ 4 mm	2-3 mm	2 mm
Nombre moyen de graines fertiles par gousse	8,4 ± 2,03	2,43 ± 1,25	7,89 ± 1,55

Le caractère qui nous a permis au premier abord de reconnaître ces hybrides est la pilosité des gousses qui est moindre chez les hybrides, absente chez *M. intertexta* et dense chez *M. ciliaris* (Fig. 33).



Fig. 33 : La pilosité des gousses chez les parents et les hybrides F₁ du croisement *M. intertexta* ♀ x *M. ciliaris* ♂.
a : gousses glabres de *M. intertexta* ; **b** : gousses très poilues chez *M. ciliaris* ; **c** : gousses peu poilues chez les hybrides F₁.

Le résultat très intéressant à retenir est le nombre moyen de graines fertiles par gousses des hybrides ($2,43 \pm 1,25$) qui diffère de façon très hautement significative (test LSD, $P = 0,00$) de ceux de *M. intertexta* ($8,4 \pm 2,03$) et *M. ciliaris* ($7,89 \pm 1,55$) (Tab. 18 et Annexe 1).

Ce résultat confirme l'observation faite sur une population d'El Kseur où *M. intertexta* et *M. ciliaris* poussent en mélange et dont certains individus soupçonnés hybrides entre les deux espèces ont montré un nombre de graines fertiles par gousse relativement réduit (Messaoudi, 2002).

3.1.2.2.1.2/ Analyse de la fertilité pollinique des hybrides F₁ entre *Medicago intertexta* et *M. ciliaris*.

Le Tableau 19 donne les taux de fertilité pollinique des hybrides F₁ entre ces deux espèces cultivés au laboratoire et de ceux cultivés au champ.

Tab. 19: La fertilité pollinique des hybrides F₁ entre *M. intertexta* et *M. ciliaris*.

Croisements	Nombre de plantes analysées	Nombre de fleurs analysées	Fertilité pollinique (%)
<i>M. intertexta</i> ♀ x <i>M. ciliaris</i> ♂	32	59	6-35
<i>M. ciliaris</i> ♀ x <i>M. intertexta</i> ♂	4	10	7-26

L'analyse de la fertilité pollinique des hybrides F₁ du croisement *M. intertexta* ♀ x *M. ciliaris* ♂ cultivés au laboratoire a montré des taux de fertilité pollinique faibles variant entre 6-35% (Tab. 19). Pour le croisement inverse (*M. intertextax* ♀ x *M. ciliaris* ♂), les taux de fertilité pollinique sont de 7-26%. Nous avons observé une grande fluctuation des fertilités polliniques au cours de la vie des individus de *M. intertexta* et *M. ciliaris* même lorsqu'ils ne sont pas d'origine hybride. Cette fluctuation du taux de fertilité pollinique n'a pas été signalée dans la bibliographie pour *M. intertexta* et *M. ciliaris*. D'après Mertens & Hamnersmith (1998), la fluctuation de la fertilité pollinique chez les plantes peut être attribuée aux conditions du milieu (humidité, température). De ce fait nous basons nos interprétations sur les plus forts taux de fertilité pollinique obtenus.

L'observation de façon répétée d'un taux de fertilité pollinique ne dépassant pas 35% permet de préciser le statut des deux taxa *M. intertexta* et *M. ciliaris*. Cette interfertilité réduite à la fois en conditions expérimentales et en conditions naturelles démontre que *M. intertexta* et *M. ciliaris* méritent plutôt le statut de sous-espèces au lieu de celui d'espèce. Cette interprétation rejoint celle de Lesins *et al.* (1971) qui ont rapporté un taux de fertilité pollinique de 40% pour les hybrides F₁ entre *M. intertexta* et *M. ciliaris*. La Figure 34, montre des grains de pollen normaux (fertiles) et des grains de pollen anormaux (non fertiles) chez les hybrides F₁ entre *M. intertexta* et *M. ciliaris*.

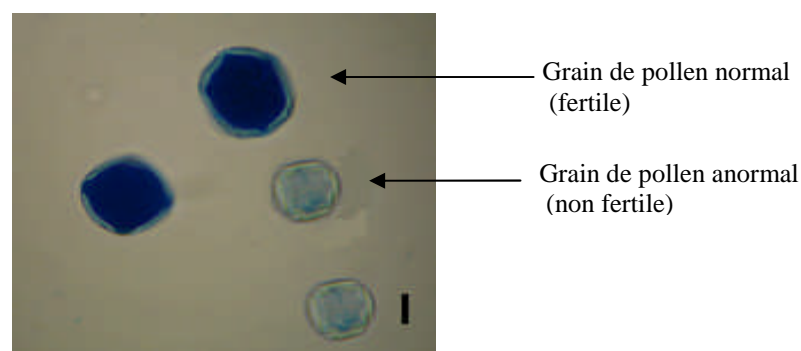


Fig. 34 : Photographie des grains de pollen des hybrides F₁ entre *M. intertexta* ♀ et *M. ciliaris*. La barre d'échelle correspond à 10 µm.

3.1.2.2.1.3/ Analyse de la méiose des hybrides F₁ entre *M. intertexta* et *M. ciliaris*.

L'analyse des cellules mères polliniques des hybrides F₁ du croisement *M. intertexta* ♀ x *M. ciliaris* ♂ a révélé des irrégularités de la méiose. Ces irrégularités de la méiose sont la présence de chromosomes univalents en métaphase I (Fig.35, a) et des chromosomes retardataires en télophase II (Fig. 35, b). Ces deux types d'anomalies de la méiose sont liés à l'état hybride des noyaux. Il y a apparition de chromosomes univalents (monovalents) à cause de la non homologie parfaite des deux caryotypes parentaux engendrant un non appariement des chromosomes au stade métaphase I. Dans les méioses analysées, le nombre d'univalents semble varier de 0 à 8 correspondants à 8-4 bivalents (voir Tab. 20).

Tab. 20: Interprétation des métaphases I chez les hybrides F₁ entre *M. intertexta* x *M. ciliaris*.

Nombre de blocs chromosomiques	Nombre de bivalents déduits	Nombre d'univalents déduits	Nombre de paires chromosomiques concernées par le non appariement
8	8	0	0
9	7	2	1
10	6	4	2
11	5	6	3
12	4	8	4

Il semblerait que le taux de réussite des appariements des 2 chromosomes d'une paire serait proportionnel au degré d'homologie des 2 chromosomes. Le taux de fertilité pollinique maximal de 35% observé pour les hybrides F₁ correspondrait hypothétiquement essentiellement au taux de cellules mères où l'appariement aurait réussi. Il serait intéressant de pousser les observations afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse.

D'autres anomalies ont aussi été observées sur les préparations de jeunes anthères à la fois des hybrides F₁ et des individus de type parental. Ces anomalies sont essentiellement la formation de ponts de viscosité (Fig. 35, c), la cytomixie (Fig. 35, d et e), les micronoyaux (Fig. 35, f et g) et les tétrades anormales (Fig. 35, h, i, j et k).

D'après Pires Bione *et al.* (2000), Bellucini (2003) et Sheidai et fadaei (2005), la viscosité chromosomique et la cytomixie sont des anomalies liées aux facteurs environnementaux. Les cellules montrant des ponts de viscosité vont conduire à une dégénérescence des noyaux (pynose) et par la suite à la mort des cellules. La cytomixie (échanges de chromosomes entre cellule adjacentes), a comme conséquence la formation de cellules aneuploïdes conduisant dans la plupart des cas à la formation de gamètes non fonctionnels.

Les chromosomes retardataires, anomalie liée au phénomène de l'hybridation, peuvent être dus aux chromosomes univalents formés en métaphase I. Ces chromosomes retardataires vont former des micronoyaux et par la suite des polyades (tétrades anormales, pentades, dyades) (Pupilli *et al.*, 1995 & Mendes- Bonato *et al.*, 2001). Les tailles des microspores formées sont différentes et le taux de fertilité pollinique fertiles sera réduit.

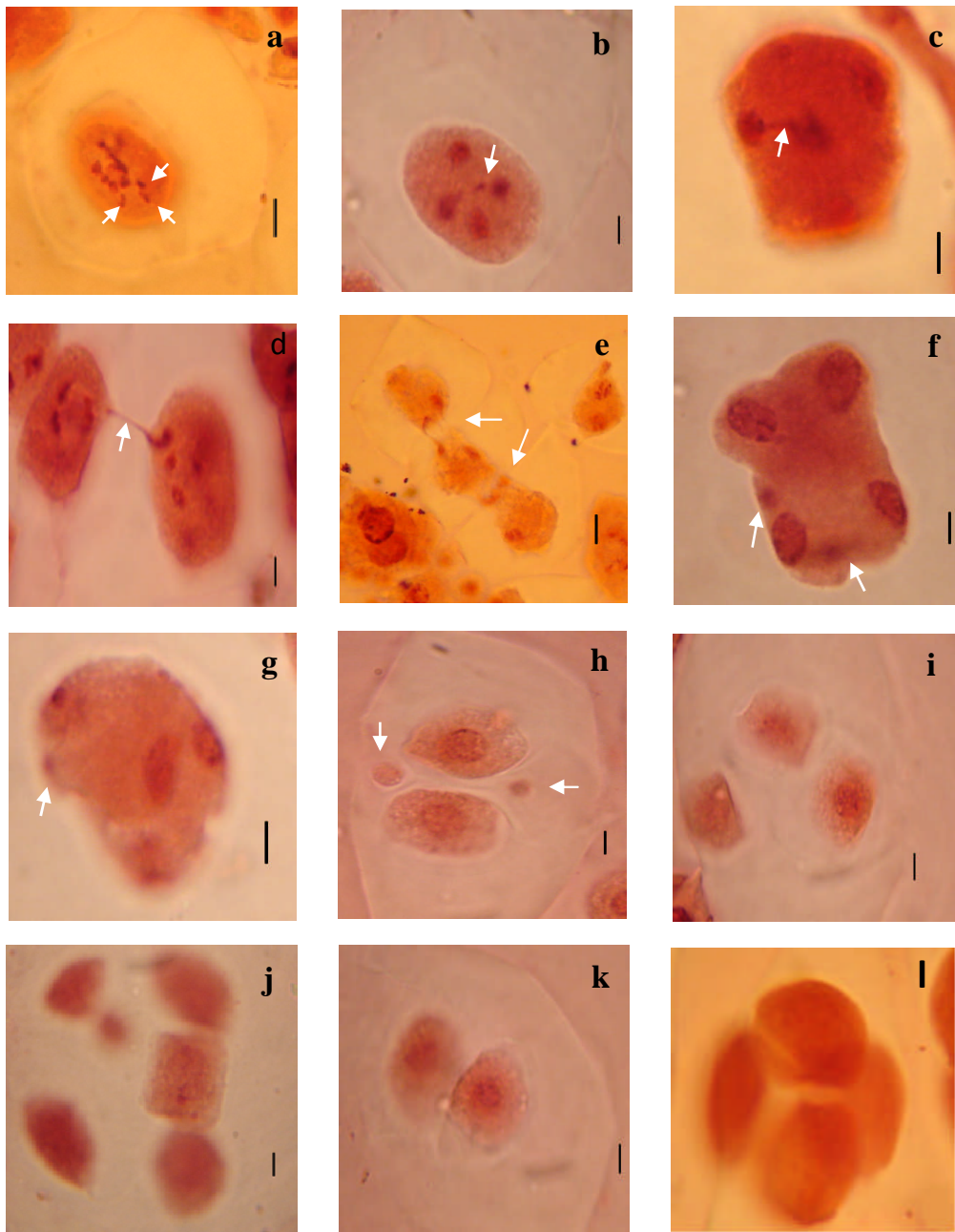


Fig. 35 : Anomalies associées aux méioses des hybrides entre *Medicago intertexta* et *M. ciliaris*.

a : Métaphase I anormale (présence de univalents) ; **b** : Télaphase II avec un chromosome retardataire ; **c** : Télaphase II avec un pont de viscosité ; **d** : Cytomixie chez le parent *M. intertexta* ; **e** : Cytomixie chez les individus hybrides ; **f** : Télaphase II avec deux micronoyaux ; **g** : Télaphase II avec un micronoyau. **h** : Tétrade anormale (2 microspores de taille normale et 2 de taille réduites) ; **i** : Triade ; **j** : Hexade ; **k** : Dyade ; **l** : tétrade normale du parent *M. intertexta*. La barre d'échelle correspond à 10 μm .

3.1.2.2.1.4/ Adaptabilité des hybrides F₁ entre *M. intertexta* et *M. ciliaris*.

Pour évaluer l'adaptabilité des hybrides F₁ relativement à celle de leurs parents *M. intertexta* et *M. ciliaris* les graines issues de plantes de *M. intertexta* cultivées en présence de *M. ciliaris* ont été utilisées. Ces graines ont été subdivisées en deux lots, un lot a été cultivé au laboratoire et l'autre au champ. Au champ 10/289 individus se sont révélés hybrides F₁ contre 32/86 au laboratoire. Autrement dit, les proportions des hybrides F₁ entre *M. ciliaris* et *M. intertexta* sont respectivement de 0,035 et 0,372 au champ et au laboratoire. Le test de comparaison des proportions a montré une différence très hautement significative entre ces valeurs ($P = 0,0000$). La proportion très réduite des hybrides F₁ au champ suggère que ceux-ci présentent une faiblesse hybride et survivent très mal aux conditions du milieu au champ (froid en hiver, compétitivité). Au laboratoire plus d'hybrides F₁ auraient survécu à cause des conditions plus favorables (température plus clémente, compétitivité moindre).

Nous retenons donc de ces résultats que les hybrides F₁ entre *M. intertexta* ♀ et *M. ciliaris* ♂ sont de loin moins bien adaptés que leurs parents *M. intertexta* aux conditions difficiles du milieu naturel.

3.1.2.2.1.5/ Flux de gènes entre *M. intertexta* et *M. ciliaris*.

L'obtention d'hybrides F₁ fertiles entre *M. intertexta* et *M. ciliaris* confirme l'existence d'un flux de gènes entre ces deux taxa (Chérifi *et al.*, 1993 ; Chérifi, 1996 ; Small, 1999 & Abdelkefi, 2001). Nos résultats précisent que ces flux de gènes sont limités par les faits suivants :

- *M. intertexta* et *M. ciliaris* présentent des autoécologies différentes. *M. intertexta* ne pousse pas au-delà de 100 m d'altitude tandis que *M. ciliaris* peut aller jusqu'à 1000 m (Messaoudi, 2002). C'est très rarement que les deux taxa poussent ensemble limitant ainsi les occasions de s'hybrider.
- Les hybrides F₁ quand ils apparaissent, ont une fertilité réduite limitant ainsi les taux de reproduction et d'hybridation avec leurs parents.
- Les hybrides F₁ sont peu prolifères par les graines. Leurs gousses ne contiennent en moyenne que $2,43 \pm 1,25$ graines contre $7,89 \pm 1,55$ et $8,40 \pm 2,03$ graines par gousse chez *M. ciliaris* et *M. intertexta*.
- Les hybrides F₁ supportent moins la compétitivité et les conditions du milieu comparativement avec leurs parents.

Une autre observation en rapport avec les flux de gènes est le fait que *M. ciliaris* est moins visité par les insectes que *M. intertexta*. Cette observation appuie le fait que *M. intertexta* est plus allogame que *M. ciliaris* (Small, 1999 & Abdelkefi, 2001) et explique pourquoi les flux de gènes sont plus intenses dans le sens *M. ciliaris* vers *M. intertexta* que dans le sens inverse (Chérifi, 1996, Small, 1999 & Abdelkefi, 2001).

3.1.2.3/ Essai d'hybridation de *Medicago intertexta* et *M. ciliaris* avec *M. arabica* et *M. orbicularis*.

Les résultats de Bene *et al.* (1998a, b) sur les relations phylogénétiques des espèces de *Medicago* en se basant sur les séquences de l'ADNr 16S et les séquences des régions ITS et ETS de l'ADN ont montré que les espèces les plus proches de la section des *Intertextae* (*M. intertexta*, *M. ciliaris*, *M. granadensis* et *M. muricoleptis*) sont *M. orbicularis* et *M. arabica*. C'est pour vérifier cette proche parenté de *M. intertexta* et *M. ciliaris* avec *M. arabica* et *M. orbicularis* que nous avons tenté de croiser (Tab.21). Notre expérience n'a pas permis de façon inévitable de démontrer l'interstérilité de *M. intertexta* et *M. ciliaris* avec *M. orbicularis* et *M. arabica* et l'interstérilité de *M. arabica* avec *M. orbicularis* (Tab. 21).

Tab. 21 : Essai de croisement de *Medicago intertexta* et *M. ciliaris* avec *M. arabica* et *M. orbicularis*.

Croisements réalisés	Nombres de fleurs pollinisées	Nombres de gousses obtenues
♀ <i>M. intertexta</i> x ♂ <i>M. orbicularis</i>	18	0
♀ <i>M. intertexta</i> x ♂ <i>M. arabica</i>	15	0
♀ <i>M. ciliaris</i> x ♂ <i>M. arabica</i>	23	2
♀ <i>M. ciliaris</i> x ♂ <i>M. orbicularis</i>	9	0
♀ <i>M. orbicularis</i> x ♂ <i>M. intertexta</i>	27	2
♀ <i>M. orbicularis</i> x ♂ <i>M. ciliaris</i>	13	1
♀ <i>M. orbicularis</i> x ♂ <i>M. arabica</i>	18	4
♀ <i>M. arabica</i> x ♂ <i>M. intertexta</i>	8	1
♀ <i>M. arabica</i> x ♂ <i>M. ciliaris</i>	7	1
♀ <i>M. arabica</i> x ♂ <i>M. orbicularis</i>	2	0

3.1.3/ Analyse des croisements entre morphotypes de *Medicago minima*.

Le Tableau 22 donne les résultats des croisements entre morphotypes de *M. minima* avec petites gousses et nervures principales vertes (normales) ♀ x *M. minima* avec grosses gousses et nervures principales pourpres ♂ et son croisement réciproque obtenus en 2004 (Sahnoune, 2004) (Fig. 36).



Fig. 36 : Le morphotype *M. minima* avec grosses gousses et nervures principales pourpres (à gauche) et le morphotype *M. minima* avec petites gousses et nervures principales vertes (normales).

Tab. 22: Croisements entre morphotypes de *Medicago minima* et le nombre de gousses, de graines d'individus F₁ obtenus.

Croisements	Nombre de gousses obtenues	Nombres de graines obtenues	Effectifs phénotypiques
<i>M. minima</i> avec petites gousses et nervures vertes ♀ x <i>M. minima</i> avec grosses gousses et nervures pourpres ♂	78	181	Tous les individus sont sans tache comme le parent femelle.
<i>M. minima</i> avec grosses gousses et nervures pourpres ♀ x <i>M. minima</i> avec petites gousses et nervures vertes ♂	21	110	Tous les individus portent la tache pourpre comme le parent femelle

Parmi les descendants F₁ de ces croisements (Tab. 22) aucun ne porte les caractères du parent male. L'analyse de la F₂ de ces croisements n'a montré non plus aucune ségrégation des caractères, tous les individus F₂ ressemblent aux F₁ par la présence ou l'absence de la tache pourpre selon le cas. Nous en déduisons que l'hybridation entre les morphotypes de *M. minima* (morphotype aux nervures pourpres et grosses gousses) n'a pas marché. Les taux de fertilité pollinique des hybrides F₁ (63- 100%) et des hybrides F₂ (86- 98%) sont comme ceux trouvés pour leurs parents (66- 99%) (Tab. 23).

L'échec de ces croisements suscite deux hypothèses : ou bien la technique de croisement ne convient pas ou les deux morphotypes présentent une barrière reproductive entre eux. Dans le cas de l'existence d'une barrière reproductive entre les deux morphotypes, ceux-ci appartiendraient à deux espèces différentes.

Pour s'en assurer, il faudra utiliser une technique de croisement évitant mieux les autofécondations, analyser la caryomorphologie et procéder à la comparaison du polymorphisme de l'ADN des populations des deux morphotypes (RFLP, RADP et séquençage de l'ADNr 16S).

Tab. 23: La fertilité pollinique de la F₁ et la F₂ du croisement entre morphotypes de *Medicago minima*.

Croisements	Analyse de F ₁			Analyse de F ₂		
	Nombres de plantes analysées	Nombres de fleurs analysées	Fertilité pollinique (%)	Nombres de plantes analysées	Nombres de fleurs analysées	Fertilité pollinique (%)
<i>M. minima</i> avec petites gousses et nervures principales vertes ♀ x <i>M. minima</i> avec grosses gousses et nervures principales pourpres ♂	29	35	63-72 ; 92-100	7	12	86-98
<i>M. minima</i> avec grosses gousses et nervures principales pourpres ♀ x <i>M. minima</i> avec petites gousses et nervures principales vertes ♂	20	29	80-99	-	-	-

* La fertilité pollinique chez les parents est de 66- 99%.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

L'analyse des résultats des croisements intra- spécifiques ou/et interspécifiques chez *Medicago polymorpha*, *M. intertexta*, *M. ciliaris*, *M. orbicularis*, *M. arabica* et *M. minima* de la région de Béjaïa permettent de tirer les conclusions suivantes:

Dans le croisement intraspécifique entre le morphotype *M. polymorpha* à tache brune à la base des folioles et le morphotype *M. polymorpha* à tache noire au centre des folioles, les hybrides F₁ ont tous montré une tache noire au centre des folioles (caractère dominant), et une forte fertilité pollinique variant de 98-99 % dans le croisement *M. polymorpha* à tache brune ♀ x *M. polymorpha* à tache noire ♂ et de 94-99% dans son croisement réciproque. Cette forte fertilité pollinique permet d'interpréter ces deux morphotypes comme deux variétés de la même espèce *M. polymorpha*. En F₂, que ce soit en culture au champ ou au laboratoire, certains individus ont montré le phénomène de nanisme interprété comme une faiblesse hybride. Ces individus nains, déjà très peu fertiles en conditions expérimentales, auraient certainement beaucoup de mal à échapper à la sélection. Ce phénomène de nanisme contribuerait donc à la limitation du flux de gènes entre les deux morphotypes qui formeraient alors deux compartiments d'un même complexe d'espèces *M. polymorpha*.

Les rapports phénotypiques en F₂ sont de 3:1 (test χ^2 , P = 0,05) à la fois pour le caractère « tache noire » et celui « tache brune ». Ces deux caractères impliqueraient donc chacun deux allèles: l'allèle N (dominant) codant pour la présence de la tache noire, l'allèle n (récessif) codant pour l'absence de la tache noire ; de même, l'allèle B (dominant) codant la présence de la tache brune et l'allèle b (récessif) codant pour l'absence de la tache brune. Ces rapports 3 :1 ne sont vérifiés que sur les cultures au laboratoire; au champ, les effectifs des individus aux folioles sans tache sont accrus probablement à cause de l'excès de lumière qui empêcherait l'expression de la présence de la tache.

L'analyse combinée des deux caractères en F₂ a montré que les rapports phénotypiques de 12:3:1 (test χ^2 , P=0,05). Le rapport entre les deux caractères indépendants serait de la nature d'une épistasie dominante. Lorsque le caractère "tache noire" est présent le caractère "tache brune" n'est pas exprimé quand bien même l'allèle B (codant pour la tache brune) est présumé présent. L'allèle N (codant pour la tache noire) est épistatique sur l'allèle B (codant pour la tache brune). De plus, en F₂, les tailles des taches ont été très variables pour les deux caractères, la taille de la tache serait donc un caractère quantitatif, c'est-à-dire codé par plusieurs gènes.

Dans le croisement intraspécifique *M. intertexta* sans tache et aux stipules normales ♀ x *M. intertexta* à tache brune au centre des folioles et aux stipules foliacées ♂, les hybrides F₁ étaient tous avec tache brune et aux stipules normales (caractères dominants). La fertilité pollinique élevée 78-99% et le développement normal des hybrides F₁ permettent d'interpréter ces deux morphotypes comme deux variétés de la même espèce *M. intertexta*.

Le test χ^2 du rapport 3:1 pour le caractère "tache brune" est vérifié chez les individus F_2 cultivés au laboratoire. La non vérification de ce test au champ est attribuée comme dans le cas précédent, à la forte intensité de la lumière au champ inhibant l'expression de la tache. Le test χ^2 pour le rapport 3 :1 montre que le caractère "tache brune" est codé par un gène à deux allèles ; B (dominant) codant pour la présence de la tache brune au centre des folioles et b (récessif) codant pour l'absence de la tache.

Concernant le caractère "type de stipules", le test χ^2 du rapport 3(stipules normales) : 1 (stipules foliacées) est vérifié au laboratoire mais pas au champ. Les proportions des individus F_2 à phénotype récessif (stipules foliacées) sont de 0,12 au champ et 0,16 au laboratoire. Ces deux proportions statistiquement identiques ($P = 0,33$) sont toutes deux significativement inférieures à la valeur 0,25 prévue par l'hypothèse du rapport 3:1. Cette réduction de la proportion des F_2 aux stipules foliacées est due au fait que la F_2 analysée n'est pas issue uniquement de l'auto- ou l'interfécondation des individus F_1 mais aussi des croisements F_1 avec *M. ciliaris* cultivés à proximité. L'explication retenue est que le caractère "type de stipules" est codé par un gène à deux allèles où S (allèle dominant) code pour les stipules normales et s (allèle récessif) code pour les stipules foliacées.

L'analyse combinée des deux caractères (présence de la tache brune au centre des folioles et le types de stipules) en F_2 a conduit à retenir les rapports 9:3:3:1 prévus pour deux gènes indépendants avec chacun un allèle dominant (B ou S respectivement) et un allèle récessif b ou s respectivement comme précisé précédemment.

Des hybrides F_1 entre *M. intertextata* et *M. ciliaris*, ont été obtenus au champ grâce aux insectes pollinisateurs (abeilles solitaires et papillons). Ces hybrides F_1 étaient reconnaissables à leurs gousses très peu poilues aisément distinguables de celles des parents *M. intertextata* (gousses glabres) et *M. ciliaris* (gousses très poilues). Ces hybrides interspécifiques F_1 ont aussi montré un nombre de graines fertiles par grappe ($2,43 \pm 1,25$) très significativement inférieure à celui des parents *M. intertextata* ($8,4 \pm 2,03$) et *M. ciliaris* ($7,89 \pm 1,55$). L'observation de façon répétée chez ces hybrides F_1 entre *M. intertextata* et *M. ciliaris* d'un taux de fertilité pollinique ne dépassant pas 35% à la fois en conditions expérimentales et en conditions naturelles démontre que ces deux taxa méritent plutôt le statut de sous-espèces au lieu de celui de l'espèce ou de variété adoptés par certains auteurs. Ces taux de fertilité pollinique faibles de ces hybrides F_1 ont été confirmés par l'analyse des cellules mères polliniques qui a révélé l'apparition de chromosomes univalents en métaphase I, où le nombre d'univalents semble varier de 0 à 8 correspondants à 8-4 bivalents (4 paires de chromosomes avec plus ou moins des problèmes d'appariement), et l'apparition de chromosomes retardataires en anaphase II. Cette analyse de la méiose a montré que cette réduction de la fertilité pollinique n'est pas uniquement due à l'état hybride des individus mais aussi aux conditions environnementales causant chez certaines

cellules mères l'apparition des ponts de viscosité et de la cytomixie conduisant à la formation des grains de pollen non fertiles.

La proportion de ces hybrides F1 a été de 3,5% pour les cultures au champ et 37,2% pour les cultures au laboratoire, valeurs différant de façon très hautement significative. La valeur relativement très faible de la proportion des hybrides au champ révèle que ces derniers sont moins adaptés aux conditions difficiles que leur parents *M. intertexta* et *M. ciliaris*.

M. intertexta et *M. ciliaris* forment deux compartiments d'un même complexe d'espèces entre lesquels les limitations des flux de gènes sont dus essentiellement au fait que les deux taxa poussent rarement ensemble pour pouvoir s'hybrider (écologies différentes) ainsi que l'inadaptation et la faible fertilité de leurs hybrides.

Le fait que les fleurs de *M. ciliaris* sont de loin moins visitées par les insectes que celles de *M. intertexta* semble expliquer pourquoi, selon certains auteurs, les flux de gènes sont plus intenses de *M. ciliaris* vers *M. intertexta*. Peu de pollen de *M. ciliaris* polliniserait beaucoup de fleurs de *M. intertexta* et beaucoup de pollen de *M. intertexta* polliniserait peu de fleurs de *M. ciliaris*.

Les tentatives d'hybridation expérimentale de *M. arabica* et *M. orbicularis* (espèces moléculairement (ITS et ETS) les plus proches de la section des *Intertextae*) avec *M. intertexta* et *M. ciliaris* n'ont pas donné de résultats. Ceci serait dû ou à la technique d'hybridation inadaptée ou à l'interstérilité entre ces espèces analysées.

Concernant les croisements entre le morphotype *M. minima* avec petites gousses et nervures principales vertes et le morphotype *M. minima* avec grosses gousses et nervures principales pourpres, aucun individu ne s'est révélé un hybride d'après les marqueurs génétiques et la fertilité pollinique des descendants F₁ et F₂. Cet échec des croisements est attribué soit à la technique de croisement non convenable, soit à l'existence d'une barrière reproductive entre ces deux morphotypes de *M. minima*. Afin de préciser le rang taxonomique et le lien de parenté des morphotypes *M. minima* avec petites gousses et nervures principales vertes et le morphotype *M. minima* avec grosses gousses et nervures principales pourpres, il serait intéressant d'utiliser une autre technique de croisement évitant mieux les autofécondations, analyser la caryomorphologie et procéder à la comparaison du polymorphisme de l'ADN des populations de ces deux morphotypes (RFLP, RADP et séquençage de l'ADNr 16S).

Références bibliographiques

- Abdelkefi A., Boussaid M. & Marrakchi M., 2001-** Complexe d'espèces et régime de reproduction dans la section des *Intertextae* : *Medicago ciliaris*, *Medicago intertexta*. *Option méditerranéennes* **45**: 107-110.
- Acciarri N., Restaino F., Vitelli G., Perrone D., Zottini M., Pandolfini T., Spina A. & Rotino G. L., 2002-** Genetically modified parthenocarpic eggplants: improved fruit productivity under both greenhouse and open field cultivation. *BMC Biotechnology* **2** (4): 1472-6750.
- Akiyama Y., Conner J-A., Goel S., Morishige D.T., Mullet J.E., Hanna W.W. & Ozias - Akins. P., 2004-** High-Resolution Physical Mapping in *Pennisetum squamulatum* Reveals Extensive Chromosomal Heteromorphism of the Genomic Region Associated with Apomixis. *Plant Physiology* **134**:1733-1741.
- Anonyme, 2006-** [http:// cours enligne-perso. Vegtal.net/deng/ deng/biologie végétale 2. HtmL](http://cours.enligne-perso.Vegtal.net/deng/deng/biologie_végétale_2.HtmL). Consulter en 2007.
- Badoc A., Lamarti A., Bourgeois G., Carde J-P. & Deffieux G., 1995-** Hybridation intraspécifique chez le fenouil, *Foeniculum vulgare* Mill. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* **134**:107-126.
- Bass H.W., Bordoli S.J. & Foss E.M., 2003-** The desynaptic (dy) and desynaptic1 (dys1) mutations in maize (*Zea mays* L.) cause distinct telomere-misplacement phenotypes during meiotic prophase. *Journal of Experimental Botany* **54** (380): 39-46.
- Bauchan G.R., 1987-** Embryo culture of *Medicago scutellata* and *M. sativa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **10** (1): 21 – 29.
- Beasley C. A. & Ting I.P., 1987-** The effects of plant growth substances on *in vitro* fiber development from fertilized cotton ovules. *American Journal of Botany* **60** (2):130-139.
- Bellucci M., Roscini C. & Mariani A., 2003-** Cytomixis in pollen mother cells of *Medicago sativa* L. *Journal of Heredity* **94** (6):512-516.
- Bena G., Jubier M. F., Oliveri I. et Leujeune, 1998a-** Evolution of annual species of the genus *Medicago*: A molecular phylogenetic approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **9** (3): 552-559.
- Bena G., Lejeune B, Prosperi J-M. and Oliveri I., 1998b-** Ribosomal external and internal transcribed spacers: combined use in the phylogenetic analysis of *Medicago* (Leguminosae). *Journal of Molecular Evolution* **46**: 299-306.
- Bhat V., Dwivedi K.K., Khurana J.P. & Sopory S.K., 2005-** Apomixis: An enigma with potential applications. *CURRENT SCIENCE* **89** (11): 1879- 1893.
- Bione N. C.P., Pagliarini M.S. & De Toledo J. F.F., 2000-** Meiotic behavior of several Brazilian Soybean varieties. *Meiotic Genetics and Molecular Biology* **23** (3): 623-63.
- Bissuel-Belaygue C., Cowan A.A., Marshall A.H. & Wery J., 2002-** Reproductive Development of White Clover (*Trifolium repens* L.) is not impaired by a moderate water deficit that reduces vegetative growth: II. Fertilization efficiency and seed set. *Crop Science* **42**: 414-422.
- Bonnin I., Ronfort J., Wozniak F. & Olivieri I., 2001-** Spatial effects and rare outcrossing events in *Medicago truncatula* (Fabaceae). *Molecular Ecology* **10**: 1371-1383.
- Bouallag L., 2004-** Evaluation de la fertilité pollinique de quelques morphotypes de *Medicago polymorpha*, *M. minima*, *M. intertexta* et *M. ciliaris* en culture expérimentale. Rapport d'activités de recherche pour l'année 2003-2004. Projet cnpru contribution à l'évaluation de la diversité phytogénétique de la région de Béjaïa. F0601/01/2003.
- Budar F. & Pelletier G., 2001-** Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. *Revue C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie* **324**: 543–550.
- Burke J. J., 2002-** Moisture Sensitivity of Cotton Pollen: An emasculation tool for hybrid production. *Agronomy Journal* **94**: 883-888.

- Chen Q-F., 1999-** Hybridization between *Fagopyrum* (Polygonaceae) species native to China. *Botanical Journal of the Linnean Society* **131**: 177-185.
- Chérifi K., 1996-** Polymorphisme enzymatique de quelques populations naturelles de *Medicago ciliaris* (L.) Krok et *Medicago intertexta* (L.) Mill. *Acta Botanica Gallica* **143** (2/3) 155- 165.
- Chérifi K., Boussaid M. & Marrakchi K., 1993-** Diversité génétique de quelques populations de *Medicago ciliaris* (L.) Krok et *Medicago intertexta* (L.) Mill. I. Analyse de la variabilité morphologique. *Agronomie* **13**: 895-908.
- Chi H.S., 2002-** The efficiencies of various embryo rescue methods in interspecific crosses of *Lilium*. *Botanical Bulletin Academia Sinica* **43**: 139-146.
- Cluster P.D., Calderini O., Pupilli F. & Crea F., 1996-** The fate of ribosomal genes in three interspecific somatic hybrids of *Medicago sativa*: three different outcomes including the rapid amplification of new spacer-length variants. *Theoretical and Applied Genetics* **93**: 801-808.
- Connor H.E., 1967-** Interspecific hybrids in *Chionochloa* (Gramineae). *New Zealand Journal of Botany*, **5**: 3-16.
- Costa M. A. P. de C., de Almeida W. A. B., Filho F. de A. A. M., Mendes B. M. J., and Rodriguez A. P. M., 2004-** Notas científicas stomatal analysis of citrus somatic hybrids obtained by protoplast fusion. *Pesq. agropec. bras., Brasília* **39**(3): 297-300.
- De Haan R.L. & Barnes D.K., 1998-** Inheritance of pod type, stem color, and dwarf growth habit in *Medicago polymorpha*. *Crop Science*, **38**:1558–1561.
- De Sousa E. dos S., 2001-** Apomixia em *Manihot esculenta* e em seus híbridos interespecíficos(1). *Pesq. agropec. bras, Brasília* **36** (9): 1191-1197.
- De Jeu M.J. & Jacobsen E., 1995-** Early postfertilization ovule culture in *Alstroemeria* L. and barriers to interspecific hybridization. *Euphytica*, **86** (1):15–23.
- Demarly Y. & Sibi M., 1996-** Amélioration des plantes et biotechnologies. 2^{ème} Ed. *John Libbey Eurotext.*, 151 p.
- Dudits D., Maroy E., Praznovszky T., Olah Z. & Gyorgyey J., 1987-** Transfer of resistance traits from carrot into tobacco by asymmetric somatic hybridization: Regeneration of fertile plants. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*. **84**: 8434-8438.
- Duroc Y., Gaillard C., Hiard S., Defrance M.C., Pelletier G. & Budar F., 2005-** Biochemical and functional characterization of ORF138, a mitochondrial protein responsible for Ogura cytoplasmic male sterility in *Brassicaceae*. *Biochimie* **87**: 1089–1100.
- Dyer, A.F., 1963-** The use of Lacto-Propionic Orcein in Rapid Squash. Methods for chromosomes preparations. *Stain Technology* **38**: 85-90.
- Elrord S. & Stansfield W., 2003-** Génétique. 4^{ème} ed. EdiScience, **490** p.
- Emershad R.L. & Ramming D.W., 1984-** *In ovulo* embryo culture of *Vitis vinifera* L. C.V. 'Thompson Seedless'. *American Journal of Botany* **71** (6): 873-877.
- Emershad R.L., Ramming D.W. & Serpe M.D., 1989-** *In ovulo* embryo Development and plant formation from stenospermic genotypes of *Vitis vinifera*. *American Journal of Botany* **76** (3):397-402.
- Favre-Duchartre M., 1970-** Des ovules aux graines Ed. *Masson & Cie* 136 p.
- Fehér A., Preiszner J., Litkey Z., Csanádi G. & Dudits D. 1992-** Characterization of chromosome instability in interspecific somatic hybrids obtained by X- ray fusion between potato (*Solanum tuberosum* L.) and *S. brevidens* Phil. *Theoretical and Applied Genetics* **84** (7-8): 880 -890.
- Fishman L. & Willis J.H. 2005-** A Novel Meiotic Drive locus almost completely distorts segregation in *Mimulus* (Monkeyflower) hybrids. *Genetics* **169**: 347–353.

- Fitter J.T., Thomas M.R., Niu C. & Rose R.J., 2005-** Investigation of *Nicotiana tabacum* (+) *N. suaveolens* cybrids with carpelloid stamens. *Journal of Plant Physiology*, **162**: 225-235.
- Frank S. & Santamour J., 2002-** Interspecific hybridization in *Carpinus*. National Arboretum, Agricultural Research Service, U.S. Department Of Agriculture, Washington, D. C. 73-79.
- Genier G., Guy P. & Prospero J.M., 1992-** Les légumineuses. Ed. INRA, Paris. 778p.
- Gibbs P. & Sasaki R., 1998-** Reproductive biology of *Dalbergia miscolobium* Benth. (Leguminosae-Papilionoideae) in SE Brazil: The effects of pistillate sorting on fruit-set. *Annals of Botany* **81**: 735-740.
- Gibbs P., Bianchi M.B. & Ranga N.T., 2004-** Effects of self chase and mixed self/cross-pollinations on pistil longevity and fruit set in *Ceiba* species (*Bombacaceae*) with late-acting self-incompatibility. *Annals of Botany* **94**: 305–310.
- Gorenflot R., 1997-** Biologie végétale, plantes supérieures: appareil reproducteurs. 4^{ème} Ed. Masson, 278 p.
- Gounaris Y., 2005-** Asymmetric potato cybrids derived from protoplast fusion between the selection ND860-2 and the cultivar Russet burbank. *Journal of Food Agriculture & Environment* **3** (1): 157-160.
- Graham R.D., 1986-** Induction of male sterility in wheat using organic ligands with high specificity for binding copper. *Euphytica* **35** (2): 621 – 629.
- Grimanelli D., Garcia M., Kaszas E., Perotti E. & Leblanc O., 2003-** Heterochronic expression of sexual reproductive programs during apomictic development in *Tripsacum*. *Genetics* **165**: 1521–1531.
- Guignard J.L., 1989-** Botanique. 7^{ème} Ed. Masson, 259 p.
- Guignard J.L., 1998-** Botanique. 11^{ème} Ed. Masson, 278 p.
- Haïcour R., 2000-** Biotechnologie végétales techniques de Laboratoires. Ed. Tec. & Doc., 305 p.
- Heyn, C. C., 1963-** The annual species of *Medicago* Jerusalem: Magnes. Press, the Hebrew university: Vol. XII. 154 p.
- Ilcheva V., San L.H., Zagorska N., & Dimitrov B., 2001-** Production of male sterile interspecific somatic hybrids between transgenic *N. tabacum* (Bar) And *N. rotundifolia* (Npt II) and their identification by RFLP analysis. *In Vitro Cell. Dev. Biol. –Plant* **37**:496- 502.
- Jahier J., Chevre A.M., Eber F., Delourme R. & Tanguy A.M., 1992-** Techniques de cytogénétique végétale. Ed. INRA, Paris. 183p.
- Judd W. S., Campbell C. S, Kellogg E.A & Stevens P., 2002-** Botanique systématique. Une approche phylogénétique. *De Boeck Université*, 467 p.
- Knowless P. F., 1944-** Interspecific hybridizations of *Bromus*. *Genetics* **128**- 140.
- Kranz E., Wiegen P.V., Quader H. & Lörz H., 1998-** Endosperm development after fusion of isolated, single Maize Sperm and Central Cells *in Vitro*. *The Plant Cell*, **10**: 511–524.
- Kulawiec M., Tagashira N., Plader W., Bartoszewski G., Kuc D., Śniezko R. & Malepszy S., 2003-** Chromosome number variation in somatic hybrids between transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) and *Solanum lycopersicoides*. *J. Appl. Genet.* **44**(4): 431-447.
- Kumlehn J, Schieder O., & Lörz H., 1997-** *In vitro* development of wheat (*Triticum aestivum* L.) from zygote to plant via ovule culture. *Plant Cell Reports* **16** (10): 663 – 667.
- Kumlehn J., Kirik V., Cizhal A., Altschmied L., Matzk F., Lörz H. & Bäumlein H., 2001-** Parthenogenetic egg cells of wheat: cellular and molecular studies. *Sexual Plant Reproduction* **14**:239–243.
- Laberche, 1999-** Biologie végétale Ed. Dunord, **240** p.

- Lafon J.P., Tharmaud-Prayer C. & Levy G., 1990-** Biologie des plantes cultivées. Physiologie du développement génétique et amélioration des plantes (volume 2). *Lavoisier Tec. & Doc.* 172 p.
- Lammerts W., 1929-** Interspecific Hybridization in *Nicotiana*. IX. Further studies of the cytology of the backcross progenies of the *Paniculata-Rustica* hybrid. *Genetics* **14**: 286-304.
- Ledingham G. F., 1940-** Cytological and developmental studies of hybrids between *Medicago Sativa* and a diploid form of *M. Falcata*. *Genetics* **25**: 1 - 15.
- Lesins K., 1955-** Techniques for rooting cuttings, chromosome doubling and flower emasculation in Alfalfa. *Canadian journal of Agriculture Science* **35**: 58- 67.
- Lesins K. & Erac A., 1968-** Relationship of taxa in the genus *Medicago* as revealed by hybridization. III. *M. aschersoniana* x *M. laciniata*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **10** (4): 777- 781.
- Lesins K., Singh S.M. & Erac A., 1971-** Relationship of taxa in the genus *Medicago* as revealed by hybridization. V. Section Intertextae. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **13**: 335- 346.
- Lesins K.A. D & Lesins I., 1979-** Genus *Medicago* (Leguminosae), a taxogenetic study. The Hague W. Junk. 228p.
- Lesins K., Dickson J. & Ostafichuk L., 1980-** Relationship of taxa in the genus *Medicago* as revealed by hybridization. IX. *M. Turbinata* x *M. Truncatula*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **22**: 137- 142.
- Li S. T. et Yang H. Y., 2000-** Gene transfer into isolated and cultured tobacco zygotes by a specially designed device for electroporation. *Plant Cell Reports* **19**: 1184-1187.
- Lichtenzweig J., Abbo S., Nerd A., Tel-Zur N. & Mizrahi Y., 2000-** Cytology and mating systems in the climbing Cacti *hylocereus* and *Selenicereus*. *American Journal of Botany* **87**(7): 1058–1065.
- Linke B. & Börner T., 2005-** Mitochondrial effects on flower and pollen development. *Mitochondrion* **5**: 389–402.
- Lord E.M. & Russell S.D., 2002-** The mechanisms of pollination and fertilization in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**: 81–105.
- Loussaert D., 2004-** Trihalogenated methylsulfonamides as specific male gametocides. *Sexual Plant Reproduction*, **16** (6): 299-307.
- Love R.M., 1938-** Somatic variation of chromosome numbers in hybrid wheats. *Genetics* **23**: 517-522.
- Mayr, 1974-** Population, espèces et évolution. HERMANN, Paris, 496p.
- McCoy T.J. & Smith L.Y., 1986-** Interspecific hybridization of perennial *Medicago* species using ovule-embryo culture. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **71** (6):772 - 783.
- McKersie B. D. & Brown D. C.W., 1997-** Biotechnology and the Improvement of forage legumes. Eastern Cereal and Oilseed Research Centre of Agriculture and Agri-Food Canada 29p.
- Mendes B. M.J., Mourão Filho, F. de A. A., Farias Paulo C. de M. & Benedito V. A., 2001-** *Citrus* somatic hybridization with potential for improved blight and ctv resistance. *In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant* **37**: 490-495.
- Mendes-Bonato A. B., Pagliarini M. S., da Silva N. & Borges do Valle C. 2001-** Meiotic instability in invader plants of signal grass *Brachiaria decumbens* Stapf (*Gramineae*). *Acta Scientiarum Maringá*, **23** (2): 619-625.
- Mendes-Bonato A.B., Pagliarini M.S. & Valle C.B.D., 2006-** Abnormal spindle orientation during microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* (*Gramineae*) hybrid. *Genetics and Molecular Biology* **29** (1): 122-125.

- Mertens T. R. & Hamnersmith R. L., 1998-** Genetics, Laboratory investigations, Eleventh edition, Prentice Hall inc., Upper Saddle River, New Jersey, 275p.
- Messaoudi B., 2002-** Le genre *Medicago* L. sect. *Intertextae* (Fabaceae) dans la région de Béjaïa : Analyse phénétique de la morphologie, Caryologie, statuts taxonomiques et théorie d'évolution. Mémoire de magister de l'université de Béjaïa. 129p.
- Meziani S., 2002-** Le genre *Medicago* L. sct. *Leptospearia* (Fabaceae) dans la région de Béjaïa : Analyse phénétique de la morphologie, Caryologie, statuts taxonomiques. Mémoire de magister de l'université de Béjaïa 157p.
- Meyer S., Reeb C. & Bosdeveix R., 2004-** Botanique. Biologie et physiologie végétales. *Maloine*. 461p.
- Miajima D., 2006-** Ovules that failed to form seeds in Zinnia (*Zinnia violacea* Cav.). *Scientia horticulturae* **107**: 176-182.
- Mizukami Y., Kato M., Takamizo T., Kanbe M., Inami S. & Hattori K., 2006-** Interspecific hybrids between *Medicago sativa* L. and annual *Medicago* containing Alfalfa weevil resistance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **84**: 79-88.
- Morison N., Vaissière B. E., Martin F., Pécaut P. & Cambon G., 2000-** Pollinisation de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) par l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) en production de semences hybrides sous abris grillagés. *Apidologie* **31**: 115–128.
- Motley T.J. & Carra G.D., 1998-** Artificial Hybridization in the Hawaiian endemic genus *Labordia* (Loganiaceae). *American Journal of Botany* **85** (5): 654–660.
- Nassar N. M.A. 2002-** Apomixis and cassava (manioc). *Genetics and Molecular Research* **1**(2): 147-152.
- Navabi A., Singh R.P., Tewari J.P. & Briggs K.G., 2003-** Genetic analysis of adult-plant resistance to leaf rust in five spring wheat genotypes. *Plant Disease* **87** (12): 1522-1529.
- Nenz E., Pupilli F., Damiani F. & Arcioni S., 1996-** Somatic hybrid plants between the forage legumes *Medicago sativa* L. and *Medicago arborea* L. *Theoretical and Applied Genetics* **93**: 183-189.
- Nesvadba Z., Vyhnánek T. & Bednár J., 2001-** The testing of efficacy of CHA genesis for production of hybrid Wheat and hybrid Triticale. *Acta fytotechnica et zootechnica* **4**: 266-268.
- Novoselova L.V., 2003-** Bud Cleistogamy at Annual Species of Genus *Medicago* L. *Czech J. Genet. Plant Breed.* **39**: 288-290.
- Oddie R. L. A. & Mccomb J. A., 1998-** Stigma Receptivity in *Eucalyptus camaldulensis* DEHNH. *Silvae Genetica* **47**: 2-3.
- Olivares-Fuster O., Pena L., Duran-Vila N. & Navarro L., 2002-** Green fluorescent protein as a visual marker in somatic hybridization. *Annals of Botany* **89**: 491-497.
- Ortiz-Perez E., Horner H.T., Hanlin S.J. & Palmer R.G., 2006-** Evaluation of insect-mediated seed set among soybean lines segregating for male sterility at the ms6 locus. *Field Crops Research* **97**: 353–362.
- Pagliarini M.S., 2000-** Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. *Genetics and Molecular Biology* **23** (4): 997-1002.
- Pesson P. & Louveaux J., 1984-** Pollinisation et productions végétales. Ed. INRA. 663p.
- Prosperi J.M., Guy P. & Balfourier F., 1995-** Ressource génétique des plantes fourragères et à gazon. Ed. INRA, Paris. 245p.
- Przywara L., White D.W.R., Sanders P.M. & Maher D., 1989-** Interspecific hybridization of *Trifolium repens* with *T. hybridum* using *in ovulo* embryo and embryo culture. *Annals of Botany* **64**: 613-624.

- Pupilli E., Scarpa G.M., Damiani F. & Arcioni S., 1992-** Production of interspecific somatic hybrid plants in the genus *Medicago* through protoplast fusion. *Theoretical and Applied Genetics* **84** (7-8): 792 - 797.
- Pupilli F., Businelli S., Caceres M.E., Damiani F. & Arcioni S., 1995-** Molecular, cytological and morpho-agronomical characterization of hexaploid somatic hybrids in *Medicago*. *Theoretical and Applied Genetics*, **90** (3-4): 347- 355.
- Pupilli F., Labombarda P. & Arcioni S., 2001-** New mitochondrial genome organization in three interspecific somatic hybrids of *Medicago sativa* including the parent- specific amplification of substoichiometric mitochondrial DNA units. *Theoretical and Applied Genetics* **103**: 972-978.
- Rambaud C., Dubois J. & Vasseur J. 1993-** Male- sterile chicory cybrids obtained by intergeneric protoplast fusion. *Theoretical and Applied Genetic* **87** (3): 347-352.
- Rhee H. K., Van Tuyl J. H.L.J.M. & kim Y.J., 2005-** improvement of breeding efficiency for interspecific hybridization of Lilies in Korea. *Plant Research International* **673**: 107-112.
- Robert D., Dumas C. & Bajon C., 1998-** Biologie végétale. La reproduction (volume 3). Ed. Doin., 383p.
- Rose R.J, Thomas M.R. & Fitter J.T., 1996-** The Transfer of cytoplasmic and nuclear genomes by somatic hybridisation. *Australian Journal of Plant Physiology* **17**(3): 303-321.
- Sahnoune M., 2004-** Comportements en cultures expérimentales et hybridations de quelques morphotypes de *Medicago polymorpha*, *M. minima*, *M. intertexta* et *M. ciliaris*. Rapport d'activités de recherche pour l'année 2003-2004. Projet cnpru contribution à l'évaluation de la diversité phylogénétique de la région de Béjaïa. F0601/01/2003.
- Sahnoune M., 2005-** Résultats des Hybridation de quelques morphotypes de *Medicago polymorpha*, *M. minima*, *M. intertexta* et *M. ciliaris* en culture expérimentale. Rapport d'activités de recherche pour l'année 2004-2005. Projet cnpru contribution à l'évaluation de la diversité phylogénétique de la région de Béjaïa. F0601/01/2003.
- Sangduen N., Sorensen E.L., & Liang G.H., 1983-** Pollen germination and pollen tube growth following self-pollination and intra- and interspecific pollination of *Medicago* species. *Euphtica* **32** (2): 527-534.
- Sargent D.J., Geibel M., Hawkins J.A., Wilkinson M.J., Battey N.H. & Simpson D.W., 2004-** Quantitative and qualitative differences in morphological traits revealed between diploid *Fragaria* species. *Annals of Botany* **94**: 787-796.
- Scriban R., 1999-** Biotechnologie. 5^{ème} ed. *Tec. & Doc.*, 1042 p.
- Sheidai M. & Fadaei F., 2005-** Cytogenetic studies in some species of *Bromus* L., section *Genea* Dum. *Journal of Genetics* **84** (2): 189- 194.
- Showemimo F.A., 2003-** Insect –Host plant relationship: The case of *Eurytylus oldi* (Poppius) [Hemiptera: Miridae] and *Sorghum Bicolor* (L.) Moench. [Relaciones Insecto-Planta Hospedera: El Caso DE *Eurytylus Oldi* (Poppius) [Hemiptera: Miridae] Y *Sorghum Bicolor* (L.) Moench]. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* **2**: 117-120.
- Sigareva M.A. & Earle E.D., 1997-** Direct transfer of a cold-tolerant *Ogura* male-sterile cytoplasm into cabbage (*Brassica oleracea ssp. capitata*) via protoplast fusion. *Theoretical and Applied Genetics* **94**: 213-220.
- Simon J.P., 1965-** Relationship in annual species of *Medicago*. II. interspecific crosses between *M. tornata* (L.) Mill. and *M. Littoralis* Rhode. *Australian Journal of Agricultural Research* **16**: 51-60.
- Simon J.P. & Millington A. J., 1967-** Relationship in annual species of *Medicago*. III the complex *M. Littoralis* Rhode- *M.truncatula* Gaertn. *Australian Journal of Agricultural Research* **15**: 35-73.

- Singh S.M. & Lesins K., 1972-** Relationship of taxa in the genus *Medicago* as revealed by hybridization. VI. *M. laciniata* x *M.sauvagei*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **14**: 823-828.
- Small E. & Brookes B. S., 1983-** The systematic value of stigma morphology in the legume tribe Trifolieae with particular reference to *Medicago*. *Canadian journal of Botany* **61** (9): 2388-2404.
- Small E., Warwick S.I. and Brookes B., 1999-** Allozyme variation in relation to morphology and taxonomy in *Medicago* sect. Spirocarpos subsect. *Intertextae* (*Fabaceae*). *Plant Systematics and evolution (Historical Archive)* **214** (1-4): 29-47.
- Smith W. K., 1954-** Viability of interspecific hybrids in *Melilotus*. *Genetics* **39**: 266-279.
- Smith H.H., Kao K.N. & Combatti N.C., 1976-** Interspecific hybridization by protoplast fusion in *Nicotiana* confirmation and extension. *The Journal of Heredity* **67**:123-128.
- Souza A.M. & Pagliarini M.S., 1997-** Cytomixis in *Brassica napus* var. *oleifera* and *Brassica campestris* var. *oleifera* (*Brassicaceae*). *Cytologia* **62**: 25-29.
- Spichiger P. E., Savolainen V.V, Figeat M. & Jeanmonod D., 2002-** Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. 2^{ème} ed. *Presses polytechniques et universitaires Romandes*. 413 p.
- Srebniak M., Rasmussen O. & Małuszyńska J., 2002-** Cytogenetic analysis of an asymmetric potato hybrid. *J. Appl. Genet.* **43**(1):19-31.
- Streff K., Blouet A. & Guckert A., 1997-** Hybrid wheat seed production potential using the chemical hybridizing agent SC2053. *Plant Growth Regulation* **21**(2): 103-108.
- Sun Y., Zhang X., Nie Y., Guo X., Jin S. & Liang S., 2004-** Production and characterization of somatic hybrids between upland cotton (*Gossypium hirsutum*) and wild cotton (*G. klotzschianum* Anderss) via electrofusion. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 472-479.
- Sun Y.-H., Xue Q.-Z., Ding C.-M., Zhang X.-Y., Zhang L.-L., Wang W.-F. & Ali S. 2005-** Somatic cybridization between *Nicotiana tabacum* and *N. repanda* based on a single inactivation procedure of nuclear donor parental protoplasts. *Plant Science* **168**: 303-308.
- Tian D. & Rose R. J., 1999-** Asymmetric somatic hybridisation between the annual legumes *Medicago truncatula* and *Medicago scutellata*. *Plant Cell Reports* **18** (12): 989- 996.
- Tomasi P., Dierig D., & Dahlquist G., 2002-** An ovule culture technique for producing interspecific *Lesquerella* hybrids. *Trends in new crops and new uses* **5**: 208-212.
- Van Tuyl J. M., Van Dian M.P., Van Creij M.G.M., Van Kleinwee T.C.M., Franken J. & Bino R. J., 1991-** Application of *in vitro* pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. *Plant Science* **74**: 115-126.
- Vitale M., Pupilli F., Labombarda P. & Arcioni S., 1998-** RAPD analysis reveals a low rate of outcrossing in burr medic (*Medicago polymorpha* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution* **45**: 337-342, 1998.
- Wang J. & Cruzan M.B., 1998-** Interspecific mating in the *Piriqueta caroliniana* (*Turneraceae*) complex: effects of pollen load size and composition. *American Journal of Botany* **85** (9): 1172-1179.
- Wang Y.Y., Kuang A., Russell S.D. & Tian H.Q., 2006-** *In vitro* fertilisation as tool for investigation sexual reproduction of angiosperms. *Sexual plant reproduction* **19** (3): 103-115.
- Wiegrefe S.J. & Berg L.C., 2003-** New interspecific hornbeam hybrids bred for improved tolerances to environmental stresses. <http://www.ces.ncsu.edu>. Consulter en 2006.

- Williams E.G. & Verry I.M., 1981-** A partially fertile hybrid between *Trifolium repens* and *T. ambiguum*. *New Zealand Journal of Botany* **19**: 1-7.
- Williams J.H.JR., Friedman W.E. & Arnold M.L., 1999-** Developmental selection within the angiosperm style: using gamete DNA to visualize interspecific pollen competition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 9201–9206.
- Wong M., Blouet A. & Guckert A., 1995-** Effectiveness of SC2053 as a chemical hybridizing agent for winter wheat Importance of developmental stages and doses of application. *Plant Growth Regulation* **16** (3): 243-248.
- Yan C.-Q., Qian K.-X., Xue G.-P., Wu Z.-C., Chen Y.L., Yan Q.-S., Zhang X.-Q. & Wu P., 2004-** Production of bacterial blight resistant lines from somatic hybridization between *Oryza sativa* L. and *Oryza meyeriana* L. *J Zhejiang Univ SCI.* **5** (10): 1199-1205.
- Yao J.-L. & Cohen D., 1996-** Production of triploid *Zantedeschia* hybrids using embryo rescue. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **24**: 297-301.
- Young L.W., Wilen R.W. & Bonham-Smith P.C., 2004-** High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. *Journal of Experimental Botany* **55** (396): 485-495.
- Zrýd J. P., 1988-** Cultures de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques. 1^{ère} Ed. *Presses polytechniques Romandes*, 308p.

Annexes

Annexe I

Test de l'égalité des variances

N° de gousses	<i>M. intertexta</i>	Hybrides (<i>M. intertexta</i> ♀ x <i>M. ciliaris</i> ♂)	<i>M. ciliaris</i>
G1	9	3	8
G2	10	2	10
G3	8	1	9
G4	10	2	8
G5	11	3	9
G6	10	3	7
G7	8	3	9
G8	10	3	9
G9	8	3	8
G10	6	1	11
G11	7	1	5
G12	9	3	8
G13	12	1	5
G14	10	3	8
G15	9	2	7
G16	10	1	8
G17	8	1	9
G18	9	2	8
G19	9	2	9
G20	10	1	9
G21	5	2	8
G22	10	2	6
G23	10	2	4
G24	10	4	7
G25	9	1	9
G26	9	3	8
G27	9	4	8
G28	9	1	4
G29	9	4	8
G30	9	5	8
G31	3	1	9
G32	8	4	10
G33	8	4	6
G34	8	5	9
G35	5	5	7
G36	7	1	9
G37	9	2	9
G38	4	2	8
G39	9	2	7
G40	3		

Annexe I (suite)**Test de l'égalité des variances**

Test de Levene d'homogénéité des Variances				
	MC_EFFET	MC_ERREU	F	NIVEAU_P
NGG	2.277977	1.132473	2.011507	0.138467

Synthèse de tous les Effets ; plan : (intxcilgraines.sta)						
	DL_EFFET	MC_EFFET	DL_ERREU	MC_ERREU	F	NIVEAU_P
1	2	429.0382	115	2.719822	157.7450	0.00

Test LSD; variable NGG (intxcilgraines.sta)			
	MOY_	VAR2	VAR3
2 {2}	2.435897	xxxx	
3 {3}	7.897436		xxxx
1 {1}	8.400000		xxxx

Test LSD; variable NGG (intxcilgraines.sta)			
	_1_8_40	_2_2_43	_3_7_89
1 {1}		0.000000	0.178340
2 {2}	0.000000		0.000000
3 {3}	0.178340	0.000000	

Annexe 2

1/ Essais d'observations sur les ovules

1.1/ Les principes étapes

1.1.1/ Le prélèvement des fleurs

Des fleurs ouvertes ou fermés ont été prélevées et mises dans des tubes à essai contenant du Carnoy II.

1.1.2/ Le prélèvement

Sous la loupe binoculaire, les ovules sont isolés et séparés sur une lame à l'aide de deux aiguilles. On peut également couper une partie de l'ovaire pour voir la présence du tube pollinique.

1.1.3/ la coloration

Sur la lame préparée mettre une goutte d'orcéine et une goutte de bleu de coton et recouvrir d'une lamelle.

1.1.4/ L'observation

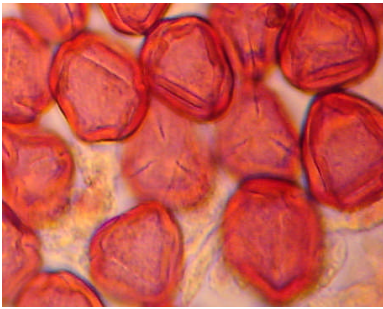
Sous le microscope photonique, la lame préparée est écrasée doucement à l'aide d'une aiguille jusqu'à ce que l'embryon ou le sac embryonnaire soit libéré des téguments de l'ovule. L'observation est faite par un grossissement supérieur, généralement avec le grossissement ($G = 100$). Si l'ovule n'est pas séparé de l'ovaire l'observation est faite directement, sans écrasement.

1.2/ La photographie

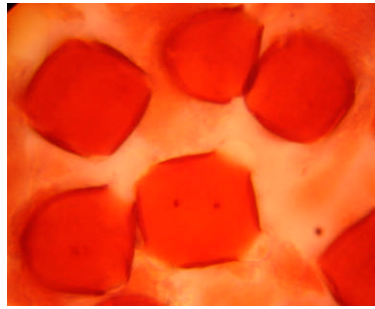
Les préparations réussies sont photographiées à l'aide d'un appareil photo numérique (Sony DSC-P100).

Les différentes fleurs observées nous ont permis de voir quelques étapes de l'évolution des grains de pollen sur le sporophyte femelles (Fig. 37).

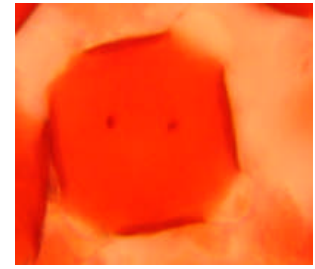
Annexe 2 (suite)



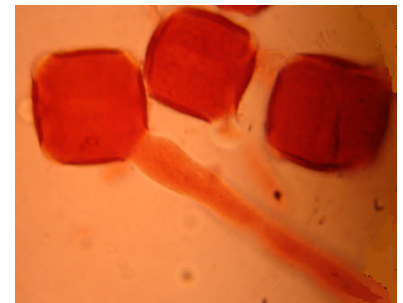
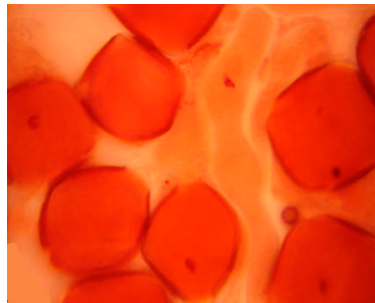
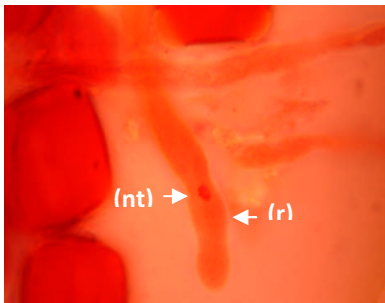
Grains de pollen immatures de *M. intertexta*



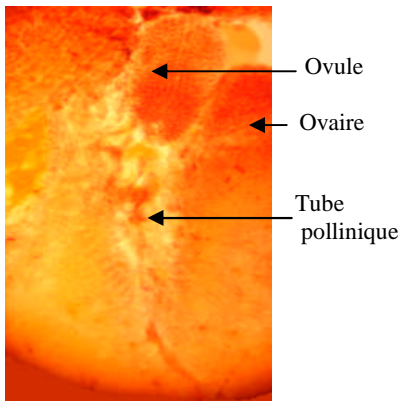
Grains de pollen matures de *M. intertexta*



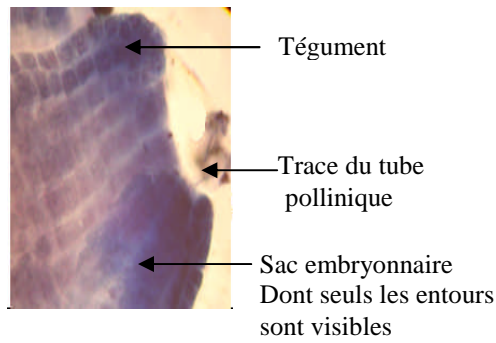
Grain de pollen à deux noyaux et début de germination de *M. intertexta*



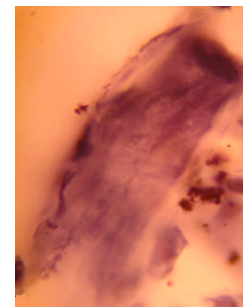
Formation d'un renflement sous-apical (r), noyau du tube végétatif (nt), noyau reproducteur (nr) de *M. intertexta*



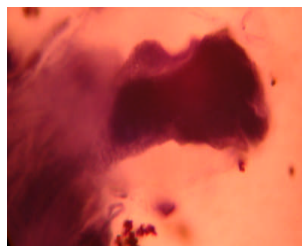
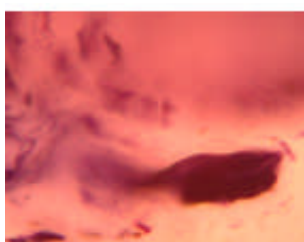
Ovule à l'intérieur de l'ovaire de *M. intertexta*



Ovule fécondé de *M. ciliaris*



Jeune embryon de *M. ciliaris*



Quelques stades de l'embryogénèse de *M. polymorpha*

Fig. 37 : Les différents stades de l'évolution d'un grain de pollen jusqu'à la formation de l'embryon chez *Medicago*

Analyse d'hybrides F₁ et F₂ intra- et/ou interspécifiques chez *Medicago polymorpha* L., *M. intertexta* (L.) Mil., *M. ciliaris* (L.) Kr., *M. arabica* (L.) Hud., *M. orbicularis* (L.) Bart. et *M. minima* (L.) Bart.: interprétation taxogénétique.

Mots-clés : *Medicago intertexta*, *M. ciliaris*, *M. polymorpha*, *M. minima*, *M. arabica*, *M. orbicularis*, hybridation intra- et interspécifique, taxonomie, flux de gènes

Résumé : En vue de préciser le rang taxonomique de quelques morphotypes de *M. polymorpha*, *M. intertexta*, *M. ciliaris* et *M. minima* de la région de Béjaïa, des croisements intra- et/ou interspécifiques ont été réalisés. Dans le croisement entre *M. polymorpha* à tache brune à la base des folioles et *M. polymorpha* à tache noire au centre des folioles, les hybrides F₁ ont montré une forte fertilité pollinique, les deux morphotypes sont donc des variétés. En F₂, il y a eu apparition du phénomène de nanisme (faiblesse hybride) qui, probablement, contribue à la limitation du flux de gènes entre ces deux morphotypes. Dans le croisement intraspécifique entre le morphotype *M. intertexta* sans tache et aux stipules normales et le morphotype *M. intertexta* à tache brune et aux stipules foliacées, la fertilité pollinique élevée des F₁ et le développement normal des hybrides F₂ ont permis d'interpréter ces deux morphotypes comme deux variétés de la même espèce *M. intertexta*. Par contre, le croisement entre le morphotype *M. minima* aux nervures principales vertes et celui aux nervures principales pourpres n'a donné aucun hybride confirmé. Cela serait dû soit à la technique d'hybridation non convenable soit à l'existence d'une barrière reproductive entre ces deux morphotypes.

Le déterminisme génétique des caractères étudiés a été analysé. La ségrégation des caractères "tache noire" (dominant) et "tache brune" est de 12:3:1 chez *M. polymorpha* où l'allèle codant pour le caractère "tache noire" exerce une épistasie dominante sur l'allèle codant pour le caractère "tache brune". Par contre la ségrégation est de 9:3:3:1 pour les caractères "présence de tache" et "type de stipules" chez *M. intertexta*.

Dans le croisement interspécifique entre *M. intertexta* et *M. ciliaris*, les hybrides ont été confirmés par plusieurs caractères dont le plus important est le nombre de graines fertiles fortement réduit chez les hybrides F₁ en comparaison avec leurs parents (en moyenne 2-3 contre 7-9 graines/gousse respectivement). La fertilité pollinique faible (35%) démontre que *M. intertexta* et *M. ciliaris* méritent le statut de sous-espèces plutôt que d'espèce. Les taux de fertilité faibles ont été confirmés par l'analyse de la méiose des F₁ qui a révélé l'apparition des chromosomes univalents en métaphase I. La proportion des hybrides 1 dans les cultures en champ (3%) est très significativement inférieure à celle dans les cultures au laboratoire (37%). Les hybrides F₁ entre *M. intertexta* et *M. ciliaris* seraient donc moins adaptés que leurs parents aux conditions difficiles. *M. intertexta* et *M. ciliaris* forment deux compartiments d'un même complexe d'espèces entre lesquels le flux de gènes est limité par l'écologie différente des deux taxa, la faiblesse et la semi-stérilité de leurs hybrides. Dans la nature, les croisements entre les deux taxa sont dus essentiellement à différentes espèces d'abeilles solitaires et de papillons diurnes.

Analysis of intra- and/or interspecific F₁ and F₂ hybrids in *Medicago polymorpha* L., *M. intertexta* (L.) Mil., *M. ciliaris* (L.) Kr., *M. arabica* (L.) Hud., *M. orbicularis* (L.) Bart. and *M. minima* (L.) Bart.: taxogenetic interpretation.

Keys words : *Medicago intertexta*, *M. ciliaris*, *M. polymorpha*, *M. minima*, *M. arabica*, *M. orbicularis*, intra- and interspecific hybridization, taxonomy, gene flow.

Summary: In order to specify the taxonomic rank of some morphotypes of *M. polymorpha*, *M. intertexta*, *M. ciliaris* and *M. minima* of Bejaïa area, intra- and/or interspecific crossings were carried out. In the intraspecific crossing between *M. polymorpha* with a brown patch on the base of its leaflets and *M. polymorpha* with black patch in the middle of its leaflets, the F₁ hybrids showed a high pollen fertility, the two morphotypes are thus varieties. In F₂, there was appearance of the phenomenon of dwarfness (hybrid weakness) which probably contributes to gene flow limitation between the two morphotypes. In the intraspecific crossing between the morphotype *M. intertexta* without a patch on its leaflets and with normal stipules and the morphotype *M. intertexta* with a brown patch on the middle of its leaflets and with leaflike stipules, the high pollen fertility of the F₁ hybrids and the normal development of the F₂ led to interpret these as two varieties of the same species *M. intertexta*. However, in *M. minima*, the crossing of the morphotype with green midribs and that with purple midribs did not give any confirmed hybrid. This would be due either to the unsuitability the hybridization technique used or the existence of a reproductive barrier between these two morphotypes.

The genetic determinism of the studied characters was also analysed. The segregation of the characters "black patch" (dominant) and "brown patch" is 12:3:1 in *M. polymorpha*, where the allele coding for the character "black patch" exerts a dominant epistasy on the allele coding for the character "brown patch". On the other hand, the segregation is 9:3:3:1 for the characters "presence of patch" and "type of stipules" in *M. intertexta*.

In the interspecific crossing between *M. intertexta* and *M. ciliaris*, the hybrids were confirmed by several characters of which the most important is the strongly reduced number of fertile seeds in F₁ hybrids in comparison to their parents (in average 2-3 versus 7-9 seeds/pod respectively). The weak pollen fertility (35%) implies that *M. intertexta* and *M. ciliaris* deserve the status of subspecies rather than species. The low fertility rates were confirmed by the analysis of the F₁ meioses which revealed the appearance of the univalent chromosomes in metaphase I. The proportion of F₁ hybrids in the field cultures (3%) was very significantly inferior to that observed in the laboratory (37%). The F₁ hybrids between *M. intertexta* and *M. ciliaris* would be less adapted than their parents to hard conditions. *M. intertexta* and *M. ciliaris* constitute two compartments of the same complex of species, between which the gene flow limitation is due to the different ecologies of the two taxa, the weakness and the semi-sterility of their hybrids. In nature, the crossings between the two taxa are assured by different species of solitary bees and diurnal butterflies.

تحليل الهجائن ج₁ ج₂ نفس الصنف و / أو بين الصنفين عند *Medicago polymorpha* (L.) *M. intertexta* (L.) ميلر *M. ciliaris* (L.) كروكر *M. arabica* (L.) هودسن و *M. orbicularis* (L.) برتال و *M. minima* (L.) برتال : تفسير حسب التصنيف الوراثي.

الكلمات الرئيسية : *M. polymorpha* - *M. intertexta* - *M. ciliaris* - *M. minima* - *M. arabica* - *M. orbicularis* - تصלב داخل نفس الصنف - تصלב بين الأصناف - التصنيف - الانتقال المورثات

ملخص : لتحديد رتبة تصنيف بعض الطابع الشكلية *M. Minima*, *M. ciliaris*, *M. intertexta*, *M. polymorpha* لمنطقة بجاية أجريت تصالبات داخل نفس الصنف و/أو بين الأصناف. عند التصالب بين *M. Polymorpha* ذات اللطخة البنية على قاعدة الأوراق و *M. polymorpha* ذات اللطخة السوداء في منتصف الأوراق ، أظهرت هجائن الجيل ج₁ خصوبة طليعية عالية، اذن الطابعان الشكليان يمثلان تشكيلين من نفس الصنف. في ج₂ ظهرت أفراد بحترية (ضعف الهجين) التي من المحتمل أن تؤدي إلى جعل عملية تبادل المورثات محدودا بين هذين الطابعين الشكليين. عند التصالب بين الطابعين الشكليين *M. intertexta* دون لطخة و ذات أذنان عادية مع *M. intertexta* ذات لطخة بنية و ذات أذنان طويلة، الخصوبة الطليعية العالية و التطور العادي لأفراد ج₂ مكنتنا من القول أن هذان الطابعين الشكليين يمثلان تشكيلين من نفس الصنف *M. intertexta*. على العكس عند التصالب بين *M. minima* ذات عروق خضراء (عادية) و *M. minima* ذات عروق أرجوانية لم نتحصل على أي هجين مؤكد، هذا يعود إلى تقنية التصالب غير المناسبة أو لوجود حاجز تناسلي بين هذين الطابعين الشكليين لـ *M. minima*. بعد التحليل لانتقال العوامل الوراثية للصفات المدروسة، لوحظ انتقال الصفات "اللطخة السوداء" (الساندة) و "الطخة بنية" يكون بنسبة 12:3:1 عند *M. polymorpha*، حيث الصنف المشفر لصفة لطخة سوداء يمارس سيادة (épistasie) على الصنف المشفر للصفة "الطخة بنية". بينما انتقال الصفات يكون بنسبة 9:3:3:1 بالنسبة للصفة وجود اللطخة السوداء و كذلك نوع الأذنان لـ *M. intertexta*.

عند التصالب بين الصنفين *M. intertexta* و *M. ciliaris*، الهجائن المتحصل عليها أكدت بعدة صفات الأهم منها هو عدد الحبوب الخصبية المتناقصة بكثير مقارنة مع الأبوين (بمعدل 2-3 مقابل 7-9 حبوب/ثمرة على الترتيب). الخصوبة الطليعية الضعيفة (35%) تبين أن *M. intertexta* و *M. ciliaris* يستحقان أن يرتبا ضمن مرتبة دون الصنف بدل من الصنف، نسب الخصوبة الضعيفة للهجائن تم تأكيدها بعد تحليل الانقسام الخلوي المنصف لأفراد ج₁ التي أوضحت ظهور صبغيات أحادية الوظيفة في المرحلة الثانية. نسبة الهجائن ج₁ المزروعة في الحقل (3%) منخفضة جدا بالنسبة للهجائن المزروعة في المختبر (37%). الهجائن ج₁ بين *M. intertexta* و *M. ciliaris* تكون أقل تأقما من الأبوين في الظروف الصعبة، *M. intertexta* و *M. ciliaris* تشكلان خانتين من نفس المركب الصنفي حيث يكون انتقال المورثات بينهما محدودا نتيجة البنية المختلفة للصنفين، الضعف و العمق النصفي لهجائتهما. في الطبيعة، التصالب بين المورثتين يعود أساسا إلى مختلف أصناف النحل المنفردة و الفراشات النهارية.