

POLYEMBRYONIE ET HAPLOÏDIE CHEZ *THEOBROMA CACAO*

P. DUBLIN

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

INTRODUCTION

Si l'on se réfère à la classification de CHEESMAN (1944), les cacaoyers cultivés se répartissent en trois grands groupes : les Criollo, les Forastero et les Trinitario, ces derniers étant constitués par toutes les formes hybrides issues d'un croisement entre Forastero et Criollo.

Dans la pratique courante de l'amélioration des cacaoyers en Afrique, on distingue généralement trois populations qui forment autant de pools géniques différents : les Forastero dits « Amelonado africains », les Trinitario et les Forastero récemment introduits sous le nom de « Haut-Amazoniens », désignés quelquefois sous le sigle UPA (Upper Amazon).

Les Amelonado africains appartiennent au groupe des Forastero et constituent l'essentiel des plantations de cacaoyers du Ghana, de la Côte d'Ivoire, et du Nigeria. Ils sont homogènes et auto-compatibles. Certains auteurs anglophones les considèrent d'ailleurs comme pratiquement homozygotes.

Les Trinitario ne sont bien représentés en Afrique qu'au Cameroun où, en mélange avec des Amelonado, ils constituent une part importante de la population cacaoyère de ce pays. Ils forment une population polymorphe, de grande diversité génétique, et dont certains individus sont auto-incompatibles.

Sous l'appellation de Haut-Amazoniens, on désigne plusieurs populations de cacaoyers appartenant au groupe des Forastero et issus de cabosses

récoltées par POUND, en 1937, dans différentes localités de l'Amazonie ; ils forment un groupe assez hétérogène dont l'introduction en Afrique est très récente (1944). Ces Haut-Amazoniens, qui sont auto-incompatibles, présentent pour l'amélioration des cacaoyers cultivés une importance primordiale. En effet, c'est au sein de ce groupe que l'on a découvert les gènes de résistance à plusieurs maladies des cacaoyers, ainsi que les « facteurs complémentaires » de vigueur des deux groupes précédents. Comparativement aux Amelonado et aux Trinitario, les Haut-Amazoniens se caractérisent par une vigueur et une précocité remarquables. A plus d'un titre, ils constituent une réserve génique de premier plan.

Chez les cacaoyers, la sélection végétative a été pratiquée principalement à l'intérieur du groupe Trinitario, elle a abouti à l'isolement de quelques clones de valeur, puis plafonna assez rapidement. Les caractéristiques morphogénétiques du cacaoyer, le prix de revient élevé des boutures rendent d'ailleurs difficile la vulgarisation d'une telle pratique dans le contexte d'une agriculture familiale restée encore trop empirique.

Les croisements effectués entre géniteurs Haut-Amazoniens et ceux des deux autres groupes lors des tentatives de transfert de gènes de résistance aux maladies ont montré que les combinaisons comprenant des géniteurs Haut-Amazoniens étaient toujours supérieures à toutes les autres. Dès lors,

l'amélioration des cacaoyers fut basée sur l'exploitation de l'hétérosis qui apparaît dès que le pool génique UPA est combiné avec l'un quelconque des deux autres pools. Les hybrides, appelés couramment « hybrides amazoniens », sont toujours caractérisés par une vigueur et une précocité exceptionnelles par rapport à tous les autres cultivars et les travaux de sélection, aussi bien en Amérique qu'en Afrique, visent tous à la généralisation de leur emploi.

« Il est certain, écrit à ce sujet BRAUDEAU (1969), que dans l'avenir les hybrides amazoniens seront appelés à prendre une part de plus en plus importante dans la production des cacaos de qualité courante. »

En Afrique, les hybrides amazoniens dont les performances, telles que la précocité et le rendement, sont toujours remarquables par rapport aux Amelonado locaux, présentent par contre l'inconvénient d'être hétérogènes. Cette hétérogénéité, qui se manifeste au niveau de tous les caractères utiles (production individuelle, groupement de la fructification, dimensions des fruits et graines, etc...), est la conséquence directe de l'hétérozygotie obligatoire des géniteurs Haut-Amazoniens en particulier.

L'obtention de géniteurs homozygotes possé-

dant plusieurs caractères désirables apparaît dès lors comme indispensable, aussi bien pour la recherche d'hybrides homogènes et vigoureux que pour une connaissance meilleure de la structure génétique des cacaoyers.

La sélection d'homozygotes par les méthodes classiques d'auto-fécondation ou de croisement frères-sœurs se heurte à deux difficultés : l'existence de barrière d'auto-incompatibilité, que l'on surmonte quelquefois partiellement, et la longueur du cycle de reproduction chez ces végétaux.

Enfin, l'importance des superficies qu'exigerait l'étude de plusieurs générations obtenues par auto-fécondation, quand bien même celle-ci fut-elle possible, ajoute encore aux inconvénients majeurs que pose l'emploi des méthodes classiques pour l'obtention d'homozygotes chez le cacaoyer.

Dans ces conditions, la recherche d'haploïdes qui seraient diploïdisés par la suite apparaît comme la meilleure voie pour l'obtention de géniteurs homozygotes chez le cacaoyer dans un délai acceptable.

L'emploi de monoploïdes diploïdisés permet, outre un raccourcissement du cycle de sélection, l'obtention directe d'homozygotes complets, étape absolument impossible à atteindre par la méthode classique.

L'HAPLOÏDIE : OBTENTION ET EMPLOI

Le premier cas d'haploïdie chez les Angiospermes a été découvert chez *Datura stramonium* par BERGNER en 1921 ; le deuxième cas fut signalé par CLAUSEN en 1924, chez *Nicotiana tabacum*. Depuis, des haploïdes ont été observés chez de nombreuses plantes et MAGOON et KHANNA (1963) ont signalé plus de 80 espèces chez lesquelles des haploïdes ont été recensés.

Dès la découverte des premiers cas d'haploïdie, les généticiens ont réalisé tout le profit qui pouvait être tiré de cette voie pour faire progresser l'amélioration et la connaissance génétique des plantes. La difficulté résidait alors dans l'obtention de ces haploïdes dont l'apparition avait toujours un caractère fortuit, dépendant de facteurs incontrôlés. Plusieurs travaux récents ont apporté, parallèlement à la mise au point de techniques d'induction de l'haploïdie, la démonstration de l'utilisation pratique de ceux-ci dans l'amélioration génétique des végétaux (CHASE, PELOQUIN, THEVENIN, POCHARD).

D'une façon générale, et pour une espèce donnée, est haploïde tout individu ayant un nombre de

chromosomes égal à la moitié du nombre chromosomique de l'espèce. Les haploïdes proviennent généralement du développement parthénogénétique, soit d'un gamète femelle, soit d'un gamète mâle.

Dans la classification de MAC CLINTOCK, on réserve le nom de monoploïdes aux haploïdes provenant de diploïdes vrais et celui de poly-haploïdes à ceux qui proviennent de plantes polyploïdes.

Les premiers haploïdes qui ont été découverts dans le monde végétal ont pour la plupart une origine spontanée (MORRISON, 1932, HARLAND, 1936) ; cependant, des haploïdes ont été observés à la suite de traitements effectués dans un but tout différent, c'est ainsi que LEVAN (1945) obtint des haploïdes de *Beta vulgaris* à la suite d'un traitement à la colchicine visant une polyploïdisation.

On connaît à l'heure actuelle plusieurs méthodes d'induction d'haploïdie qui ont été expérimentées avec des succès variables suivant les espèces ; ce sont : les pollinisations avec un pollen irradié ou un pollen avorté de la même espèce ; les hybrida-

tions avec un pollen d'une espèce éloignée ; les pollinisations différées ; les traitements d'ovaire ou de style avec un produit chimique ; la culture *in vitro* d'anthères ; la dissociation des embryons associés dans les graines polyembryonnées.

La pollinisation de fleurs émasculées de *Datura* avec un pollen traité aux rayons X est à l'origine de la découverte du premier cas d'haploïdie connu dans le monde végétal. Par la suite, plusieurs auteurs utilisant cette technique de pollinisation avec un pollen traité aux rayons X ou aux rayons γ ont obtenu des haploïdes chez de nombreux végétaux (STADLER, 1931, sur *Zea mays* ; KATAYAMA, 1934, sur *Triticum monococcum* ; GERASSINOVA, 1936, sur *Crepis tectorum* ; IVANOV, 1938, sur *Nicotiana* ; EHRENSBERGER, 1948, sur *Antirrhinum majus*...).

Dans ce même ordre d'idée, deux auteurs (NAKAMURA, 1933, sur *Oryza* et WEBBER, 1933, sur *Pharbitis nil*) ont obtenu des haploïdes par pollinisation avec un pollen avorté appartenant à la même espèce. Dans le second cas, le parent mâle était un chimère péricline fournissant un taux important de pollen avorté.

Cet emploi de pollen avorté dans les tentatives d'induction d'haploïdie est basé sur le même principe que l'utilisation de pollen irradié : le pollen est incapable d'assurer les processus de fécondation, mais capable de germer et de déclencher par la germination un stimulus hormonal qui provoque le développement parthénogénétique de l'oosphère.

Les tentatives récentes de traitement de pollen avec le bleu de toluidine faites par ALYASIRI (1966) chez *Lycopersicum esculentum*, de même que les essais de traitement de pollen au protoxyde d'azote effectués par MONTEZUNA (1967) chez *Solanum* s'inscrivent dans cette même voie de recherches qui consiste à détruire la gamétogenèse du pollen sans pour autant toucher à l'aptitude de celui-ci à former un tube pollinique capable de pénétrer dans l'ovaire et de déclencher l'évolution parthénogénétique de l'oosphère.

Quelques cas de développements parthénogénétiques ont été obtenus à la suite de l'action de température élevée ou basse chez certains végétaux (NORDENSKIOLD, 1939 sur *Oryza*, RANDOLPH, 1932 sur *Zea mays*, POVOLOCHIKO, 1937 sur *Nicotiana*).

Des tentatives d'induction d'haploïdie par injection dans les ovaires ou par badigeonnage du pistil à l'aide de produits chimiques ont été effectuées avec des succès variables ; ainsi DEANON a pu augmenter le taux d'haploïdie chez le maïs et la betterave par traitement des pistils à l'aide de l'hydrazide maléique.

Chez beaucoup de végétaux, une nette augmentation de la production d'haploïdes fut observée à la suite de croisements éloignés. Dans ces croise-

ments interspécifiques ou intergénériques qui sont à l'origine de plus d'une trentaine de cas d'haploïdie signalés par MAGOON et KHANNA, certaines espèces se révèlent comme de puissants inducteurs de parthénogenèse (HOUGAS et PELOQUIN).

KIHARA (1940) obtint chez *Triticum monococcum* une augmentation très sensible de l'haploïdie à la suite d'une pollinisation différée ; les meilleurs résultats ayant été obtenus avec des pollinisations effectuées neuf jours après l'épanouissement des fleurs. SMITH (1946) devait confirmer les résultats de KIHARA sur ce même végétal : il fit passer le taux de monoploïdie de 0,1 % à 20 % par pollinisation différée jusqu'à douze jours après émas-culation.

L'idée de cultiver *in vitro* des anthères en vue d'obtenir des haploïdes fut émise pour la première fois en 1964 par KATAYAMA et NEI. Cette suggestion fut reprise par GUHA et MAHESHWARY sur *Datura innoxia* et, en 1966, ces auteurs furent les premiers à obtenir des haploïdes issus de cultures d'anthères. Depuis cette découverte de GUHA et MAHESHWARI divers laboratoires ont essayé d'appliquer cette technique à d'autres végétaux. NIRSCH et ses collaborateurs (1967, 1968, 1969) ont ainsi obtenu des haploïdes chez *Nicotiana*, NAKATA et TANAKA (1968) chez *Nicotiana tabacum* ; la même année, NIZEKI et OONO (1968) parviennent à régénérer des plantules d'haploïdes à partir de calcs provenant de cultures d'anthères de riz. Récemment, KAMEYA et HINATA (1970) ont pu régénérer des plantules haploïdes de *Brassica* à partir de cultures d'anthères. Enfin, le développement d'haploïdes d'asperges à partir de cultures d'anthères fut réalisé par PELLETIER et RACQUIN en 1971. A ce jour il existe une dizaine d'espèces végétales chez lesquelles il a été possible d'obtenir des haploïdes à partir de cultures d'anthères (PELLETIER, 1971).

KAPPERT, en 1933, fut le premier à obtenir des haploïdes à partir de graines polyembryonnées de *Linum usitatissimum*. Depuis cette découverte du premier cas d'haploïdie associée à la polyembryonie, de nombreux autres cas ont été observés chez plusieurs espèces végétales. Dans la revue bibliographique de MAGOON et KHANNA sur l'haploïdie, on relève plus de vingt-deux espèces appartenant aux genres *Linum*, *Oryza*, *Triticum*, *Solanum*, *Gossypium*... chez lesquelles des haploïdes ont été trouvés parmi les embryons associés des graines polyembryonnées. Pour expliquer l'origine de ces haploïdes liés aux diploïdes dans les cas de gémellité, plusieurs hypothèses ont été émises. Selon RAMIAH (1935) et HARLAND (1936), ces embryons associés dérivent de sacs embryonnaires différents dont un seul est fécondé ; le deuxième sac subit un développement parthénogénétique sous l'effet du stimulus créé par celui qui a été

fécondé. Pour d'autres auteurs (KAPPERT, COOPER, OVERTON) l'embryon haploïde proviendrait d'un développement parthénogénétique d'une synergide, parallèlement au développement du zygote en embryon diploïde; d'autres hypothèses faisant dériver l'haploïde d'un développement parthénogénétique de l'oosphère, tandis que le diploïde proviendrait d'une synergide fécondée, ont été aussi émises (KIYARA, YAMOTO, 1936). Dans quelques cas, l'utilisation d'un marqueur génétique a permis de déterminer de façon précise l'origine des haploïdes associés à la gémellité (MORGAN et RAPPLEYE, 1950, chez *Capsicum*).

Quelle que soit l'origine des haploïdes, on constate chez une même espèce qu'elle est liée à la polyembryonie, laquelle varie d'une origine à une autre et se comporte comme étant sous le contrôle de facteurs génétiques. De telles observations ont été faites par KAPPERT chez *Linum usitatissimum*, par MORGAN et RAPPLEYE, 1950, chez *Capsicum*.

En règle générale, les haploïdes proviennent d'une cellule réduite (oosphère ou synergide) du gamétophyte femelle et qui se développe sans qu'il y ait fusion avec le noyau mâle; ces haploïdes possèdent alors les caractéristiques essentielles du parent femelle; on connaît cependant quelques rares cas où l'haploïde ressemble plus au parent mâle qu'au parent femelle et résulte du développement d'un noyau mâle à l'intérieur d'un cytoplasme femelle après dégénérescence du noyau femelle. Ces haploïdes androgénétiques ont été découverts chez plusieurs espèces végétales: KOSTOFF (1929) dans un croisement de *N. tabacum* var. *macrophylla* ($2n = 72$) avec *N. langsdorffii* ($2n = 18$) obtint un haploïde Langsdorffii avec $n = 9$; de même KEHR (1951) obtint des haploïdes androgénétiques de *Nicotiana repanda*. Plusieurs auteurs (RANDOLPH, 1932, SEANEY, 1955, GERRUH, 1956, CHASE, 1963) obtinrent des haploïdes androgénétiques chez le maïs qui se révélèrent d'un grand intérêt pour la création de lignées fixées à cytoplasme mâle stérile.

La fréquence des haploïdes à l'état spontané est toujours très faible; MUNTZING a estimé que chez les embryons jumeaux de onze genres, le taux de monoploïdie était en moyenne de 5.10^{-3} ; le taux de polyembryonie étant lui-même estimé à 1.10^{-3} , le taux réel de monoploïdie devient alors égal à 5.10^{-6} . En fait ces taux de polyembryonie peuvent être beaucoup plus élevés; ainsi on a trouvé chez certaines lignées de *Triticum* jusqu'à 25 % de monoploïdes chez les embryons doubles.

De nombreux travaux (PELOQUIN, KIYARA, 1940, HARLAND, 1933, RAMIAH, STADLER, 1940) ont mis en évidence l'influence des facteurs génétiques sur le taux de monoploïdie au sein d'une même espèce. RANDOLPH, chez le maïs, a pu ainsi

constater que certains géniteurs mâles possédaient une réelle aptitude à induire des développements parthénogénétiques chez n'importe quelle plante femelle. Un choix judicieux de géniteurs permet donc d'augmenter considérablement le taux de monoploïdie.

A de rares exceptions près, l'haploïde représente une version réduite de la plante diploïde normale: on note chez celui-ci une croissance plus lente, une réduction générale de la vigueur des organes végétatifs et des cellules de taille réduite.

La densité stomatique, le nombre de chloroplastes des cellules de garde peuvent servir au repérage des haploïdes; le comptage de chromosomes reste cependant la seule méthode de diagnostic précis. Il est utile du point de vue pratique de pouvoir faire un repérage précoce des haploïdes, l'emploi de marqueurs génétiques (CHASE, PELOQUIN) est à cet effet très commode.

L'intérêt des haploïdes dans l'amélioration et l'étude génétique des plantes est indéniable et il y a tout lieu de penser qu'avec le développement des techniques permettant de les obtenir plus facilement, leur emploi se généralisera assez rapidement.

Il existe à l'heure actuelle de nombreux exemples concrets d'utilisation pratique de l'haploïdie en amélioration des plantes: MORRISON a isolé, à partir d'un haploïde de tomate, une lignée commerciale parfaitement homozygote: la « Suprême Marglobe ». HARLAND et BEASLEY ont isolé chez le cotonnier des haploïdes qui ont fourni des lignées dont l'homogénéité et les qualités des fibres étaient nettement supérieures à celles des lignées issues d'auto-fécondation. CHASE et GOODSSELL (1961) utilisant les haploïdes androgénétiques du maïs ont pu effectuer le transfert de certains génotypes sur un cytoplasme mâle stérile; ils ont obtenu ainsi directement les lignées mâles stériles de lignées déjà fixées. Une des démonstrations récentes les plus remarquables de l'emploi de l'haploïdie en amélioration des plantes est celle fournie par HOUHAS et PELOQUIN chez *Solanum tuberosum*: ce végétal auto-tétraploïde a une variabilité génétique qui s'exteriorise beaucoup plus lentement que chez le diploïde; son amélioration, du fait de cette hérédité tétrasomique, est plus compliquée. L'obtention de dihaploïde ($2n = 24$) chez *S. t.* a permis, outre une étude plus facile de sa variabilité génétique, la réalisation de croisements avec les espèces sauvages à 24 chromosomes et le transfert des gènes de résistance de ceux-ci chez l'espèce comestible. Selon MEYER et JUSTUS, les dihaploïdes du cotonnier, grâce à leur uniformité remarquable, pourront être utilisés comme constante génétique pour la mesure des variations dues aux facteurs externes et comme recombinants purs dans les croisements interspécifiques.

L'haploïde permet par doublement chromoso-

mique d'obtenir en une seule étape, aux mutations près, un individu parfaitement homozygote. Outre l'intérêt de cette étape unique, de ce raccourcissement considérable de cycle, il n'existe aucune méthode permettant d'atteindre un niveau comparable d'homozygotie aussi rapidement.

Par ailleurs, l'homozygotie totale ne présente aucun des inconvénients (dépression trop accentuée) que l'on aurait pu craindre a priori (CHASE, TOMPSON, NANDA, 1965, sur maïs, POCHARD sur *Capsicum*...).

Tous ces exemples montrent bien que l'utilisation des haploïdes en amélioration des plantes constitue déjà une réalité concrète d'un intérêt capital pour certaines espèces en particulier (THEVENIN sur *Asparagus*).

L'haploïde étant issu d'un gamète, il est du point de vue théorique beaucoup plus facile d'obtenir des gamètes favorables que des zygotes (réunion

de deux gamètes) groupant les mêmes qualités.

Le passage, en sélection, par la phase haploïde, présente encore l'avantage d'éliminer les gènes défavorables et létaux.

Du point de vue intérêt scientifique, les haploïdes ont été à l'origine des aneuploïdes qui ont donné à plusieurs auteurs la possibilité d'effectuer des études génétiques beaucoup plus approfondies chez certaines espèces (POCHARD sur *Capsicum*, SEARS sur *Triticum*...). L'étude des appariements chromosomiques lors des processus méiotiques de certains haploïdes fertiles a permis de préciser les degrés d'homologie des chromosomes et d'aider ainsi à la détermination de la structure génomique de l'espèce.

Enfin, les haploïdes présentent pour l'étude des mutations un intérêt évident ; ils permettent en effet d'obtenir immédiatement la manifestation de toute mutation récessive... ce qui, sur le plan pratique, peut être d'une très grande utilité.

LA POLYEMBRYONIE CHEZ *THEOBROMA CACAO*

Tous les auteurs qui ont étudié le gamétophyte femelle et l'embryogenèse chez le cacaoyer ont signalé la présence de sacs embryonnaires multiples (CHEESMAN, 1927, COPE, 1967). L'examen des données fournies par COPE peut éclairer utilement le problème de l'origine des haploïdes que nous avons découverts chez ce végétal.

COPE, à la suite de l'examen de centaines de sacs embryonnaires, aptes à la fécondation, confirme les observations faites antérieurement par KUIJPER (1914) et CHEESMAN (1927), à savoir que la dégénérescence des antipodes chez le cacaoyer est très précoce et suit immédiatement leur formation. Chez le cacaoyer donc, l'existence d'embryons parthénogénétiques issus des antipodes ne peut être retenue.

Par ailleurs, 320 ovules à sac embryonnaire double ont été examinés par COPE après pollinisation avec un pollen compatible. Dans 92 cas, les deux sacs étaient fécondés ; dans 122 cas, un seul sac était fécondé ; pour les 106 autres cas, aucun des deux sacs n'avait été fécondé.

Ces sacs embryonnaires multiples dont le taux était de 4.10^{-3} provenaient tous, d'après COPE, de mégaspores différentes ayant évolué de façon indépendante.

OPEKE et JACOB (1965) à la suite d'observations anatomiques faites sur plusieurs cas de gémellité chez *T. cacao* ont conclu que ces polyembryons provenaient du clivage d'un même pro-embryon. Ces mêmes auteurs ont émis l'hypothèse que les plantules chétives qui accompagnaient certains

cas de gémellité pouvaient être d'origine haploïde. Les recherches que nous avons entreprises sur la polyembryonie chez *T. cacao* ont été inspirées des travaux de THEVENIN sur asperges et de POCHARD sur *Capsicum*. Elles avaient pour but unique de rechercher, parmi les plantules issues de graines polyembryonnées, celles qui étaient haploïdes et avaient par conséquent un nombre de chromosomes égal à 10.

Les recherches de graines polyembryonnées chez *T. cacao* ont été effectuées, séparément, à l'intérieur de chacun des trois groupes : Amelonado, Trinitario, Haut-Amazoniens ainsi que parmi les hybrides amazoniens. La graine de cacaoyer, quelle que soit son origine, présente une extrémité large et arrondie et une extrémité plus effilée. La racine, dont on peut apercevoir l'extrémité dès que la graine est débarrassée de son enveloppe, sort toujours du côté le plus large de la graine et est par conséquent facile à repérer.

Différentes techniques ont été utilisées pour un repérage aisé et rapide des graines polyembryonnées.

Le décapuchonnage de la racine par l'enlèvement de l'enveloppe de l'extrémité large de la graine apparaît comme le plus simple ; en fait, l'abondant mucilage qui entoure la graine, et tout particulièrement celle des Amazoniens, rend cette opération délicate, par suite des difficultés de prise qu'offre la graine fraîche, très glissante. Dans les essais d'enlèvement partiel ou total de l'enveloppe, le rendement par homme/jour ne dépassait guère 200 à 300 graines. Les graines débarras-

Fig. 1. — Polyembryonie chez *T. cacao*.
Prégermination et graines prégermées

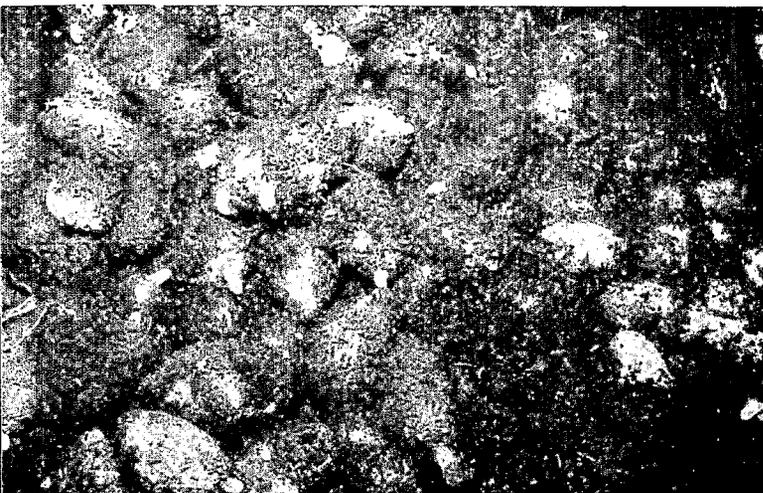


Fig. 2. — Polyembryonie chez *T. cacao*. La dissymétrie qui apparaît plus tard chez les plantules jumelles, se manifeste très tôt au niveau des racines, dès la sortie de celles-ci

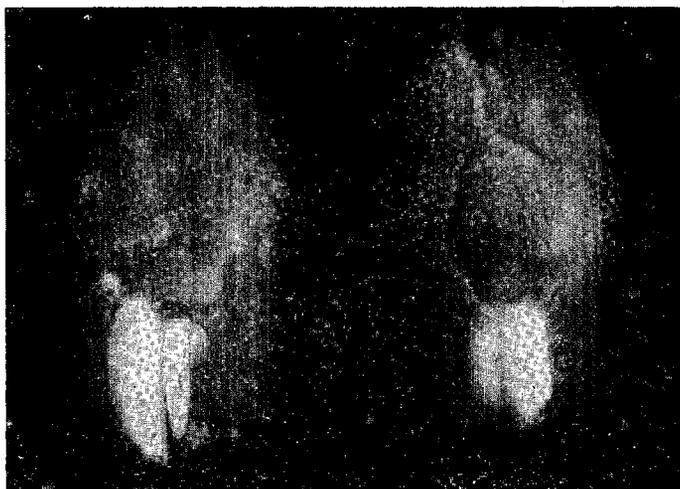
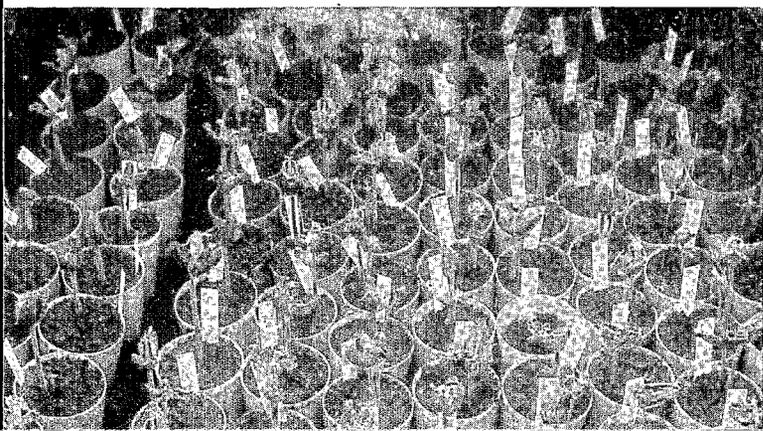


Fig. 3. — Polyembryonie chez *T. cacao*. Développement des polyembryons après semis des graines en pot en alkathène



sées de leurs enveloppes peuvent être examinées rapidement et celles qui portent deux racines sont faciles à repérer. Il est nécessaire, quelquefois, de pratiquer une légère entaille des cotylédons au niveau de la sortie de la racine pour s'assurer qu'il n'existe pas de second axe, resté en retrait.

Chez le cacaoyer, l'ablation de l'extrémité de la racine entraîne suivant l'importance du traumatisme des modifications morphogénétiques des systèmes racinaires, sans influencer pour autant sur le taux de germination, ni sur la survie des plantules (DYANAT-NEJAD, 1969). Nous avons alors pensé qu'un décapuchonnage, à l'aide d'un scalpel bien affilé, de l'extrémité arrondie de la graine, permettrait de repérer plus rapidement celles qui étaient polyembryonnées. Cette technique se révéla en effet d'un usage plus pratique que la précédente et permet un tri beaucoup plus rapide. Malheureusement, lors de la germination de ces graines polyembryonnées et « scalpées », le plus petit embryon, ne peut résister à ce choc opératoire, et meurt, faisant ainsi perdre tout le bénéfice de ce tri rapide.

Le procédé qui fut adopté de façon définitive pour avoir donné entière satisfaction est la prégermination ; son seul inconvénient par rapport aux procédés précédents est d'exiger des installations plus conséquentes. Les graines des cabosses nouvellement récoltées sont immédiatement après leur extraction enrobées dans de la sciure de bois, de façon à éviter la prise en masse et faciliter leur étalement. Ces graines enrobées sont alors étalées en couche de 3 à 4 cm sur des claies en bois, puis recouvertes par un sac humide. Les claies sont ensuite placées à l'ombre dans un hangar bien aéré. Dans de telles conditions, la germination a lieu rapidement et les racines bien visibles mesurent 5 à 10 cm de long au bout de six jours.

Ces graines prégermées, débarrassées de leur mucilage se manipulent très facilement et celles qui sont polyembryonnées sont vite repérées par leurs racines multiples. Dans ces conditions, un observateur bien entraîné est capable de trier 5 à 8.000 graines par jour.

Les graines prégermées à deux ou plusieurs racines sont débarrassées de leurs enveloppes et semées dans des pots en alkathène remplis de substrat léger à base de sciure de bois, qui sont ensuite mis en chambre humide (bac en ciment recouvert d'un châssis incliné) (fig. 1-2-3). La levée des graines a lieu 6 à 8 jours après le semis, on augmente alors l'aération en soulevant progressivement le châssis. Le développement des plantules se fait normalement et on peut procéder aux premières observations et démariages éventuels de certaines plantules dans les 10 à 15 jours qui suivent le semis.

TABLEAU I
Polyembryonie chez *T. cacao*
Tableau récapitulatif

Origines	Nombre de fèves à n embryons				Nombre total de fèves	Taux de polyembryonie
	1 E	2 E	3 E	4 E		
Amelonado	131.295	193	7	1	131.496	$1,52 \cdot 10^{-3}$
Trinitario	11.822	19	—	—	11.841	$1,60 \cdot 10^{-3}$
UPA	138.958	190	7	—	139.135	$1,39 \cdot 10^{-3}$
Hybrides amazoniens	191.609	304	15	—	191.928	$1,66 \cdot 10^{-3}$
Total	473.694	706	29	1	474.430	$1,55 \cdot 10^{-3}$

(E) Embryon.

La détermination, dans les conditions précédemment énoncées, du taux de polyembryonie chez *T. cacao* a été effectuée en décembre 1971 sur un échantillon de 475.000 graines, provenant des groupes : Amelonado, UPA, Trinitario, ainsi que des hybrides amazoniens. Par suite d'un matériel végétal insuffisant, seules 12.000 graines de Trinitario ont pu être examinées. Les données recueillies ont été portées dans le tableau I. On constate que le taux moyen de polyembryonie est de $1,55 \cdot 10^{-3}$ et diffère peu d'une origine à une autre.

Il est probable que, chez le cacaoyer, le taux de polyembryonie est variable suivant le génotype et sous contrôle de facteurs génétiques, comme cela a été constaté chez d'autres végétaux qui ont donné lieu à des études similaires.

Comparativement aux autres végétaux, dont les fréquences de polyembryonie ont été portées ci-dessous, le taux de polyembryonie chez le cacaoyer est très satisfaisant :

- Cotonnier : $0,02$ à $3 \cdot 10^{-3}$;
- Betterave : $0,5$ à $3 \cdot 10^{-3}$;
- Riz : $0,1$ à $3 \cdot 10^{-3}$;
- Tabac . . . : $0,4$ à $2,5 \cdot 10^{-3}$;
- Asperge . . : $2 \cdot 10^{-3}$.

D'autre part, la rapidité de la germination et la taille des graines qui facilite leur manipulation sont autant de facteurs qui démontrent que la polyembryonie est une méthode de recherche de mono-ploïdes parfaitement adaptable au cacaoyer.

Les plantules des graines polyembryonnées, même chez des cacaoyers d'origine aussi homogène que les Amelonado, présentent une très grande diversité dans leur développement et leur vitesse de croissance.

Comparativement aux plantules de même âge, issues de graines monoembryonnées, toutes conditions étant par ailleurs égales, les plantules des graines polyembryonnées se caractérisent par une

dispersion beaucoup plus importante et des dimensions en moyenne plus réduites (graphiques 1 et 2, p. 303).

Les décalages de développement qui existent entre plantules d'un même couple sont quelquefois considérables ; ces disproportions sont directement liées à l'inégale répartition des réserves cotylédonaire. Chez le cacaoyer, en effet, la taille des plantules pendant les premières semaines de développement est toujours fonction des dimensions de la graine d'origine (BARTLEY, 1966). Dans certains cas, alors que la plus grande des plantules mesure plus de 20 cm de haut et possède quatre feuilles, sa jumelle, à peine sortie de terre, est encore au stade de l'étalement des feuilles cotylédonaire ; celles-ci, rudimentaires sont totalement ou presque totalement dépourvues de réserve.

Le rapport des dimensions (hauteur en cm) des plantules jumelles d'un même couple et âgées d'un mois, varie entre 1 et 10 et quelquefois plus (fig. 4 à 9, p. 302-303).

Néanmoins, dans 80 % des cas, les plantules d'un même couple ont des dimensions assez proches, leur rapport variant de 1 à 1,5.

Les plantules chétives, même après un démariage précoce qui les sépare de leur concurrente plus vigoureuse, ont un développement ralenti ; certaines restent en latence quelquefois pendant plusieurs semaines et meurent sans avoir dépassé le stade de l'étalement des feuilles cotylédonaire ; d'autres, après un temps de latence plus ou moins long, émettent une première feuille, puis entrent de nouveau dans une phase de repos plus ou moins longue.

L'apport des solutions nutritives aide quelquefois le développement de ces plantules très chétives : dans les cas les plus favorables, celles-ci atteignent, au bout de trois mois, 2 à 5 cm de haut et ne possèdent que 3 à 4 feuilles.

De nombreux cas de coalescence de plantes jumelles ont été rencontrés ; ces coalescences s'étendent sur des longueurs très variables de la zone hypocotyle (fig. 10 et 11, p. 304).

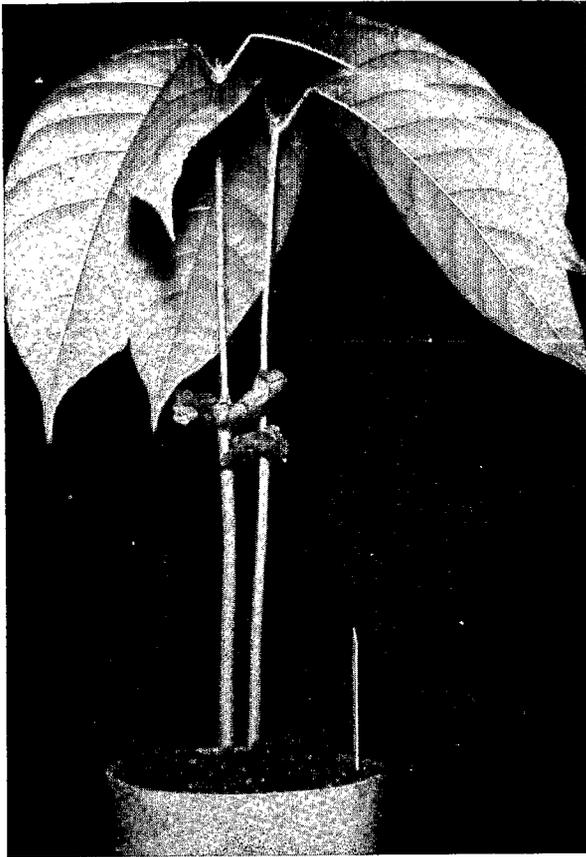


Fig. 4

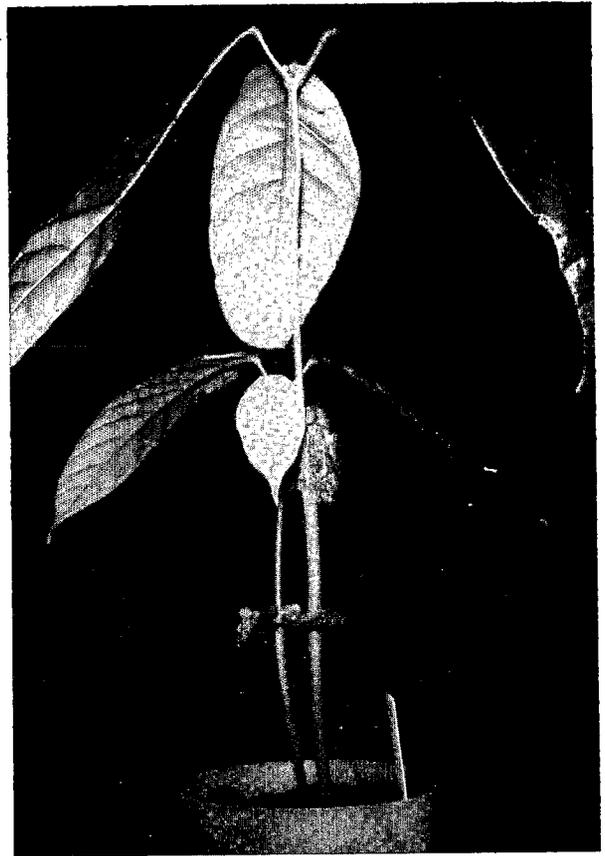


Fig. 5



Fig. 6

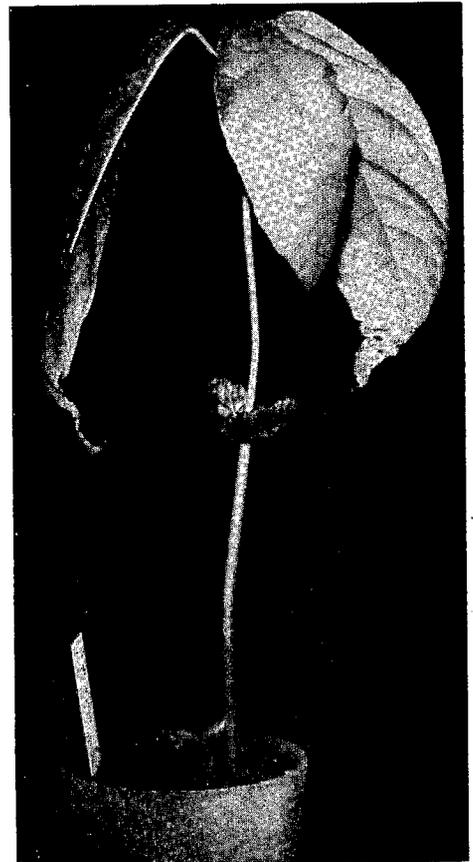
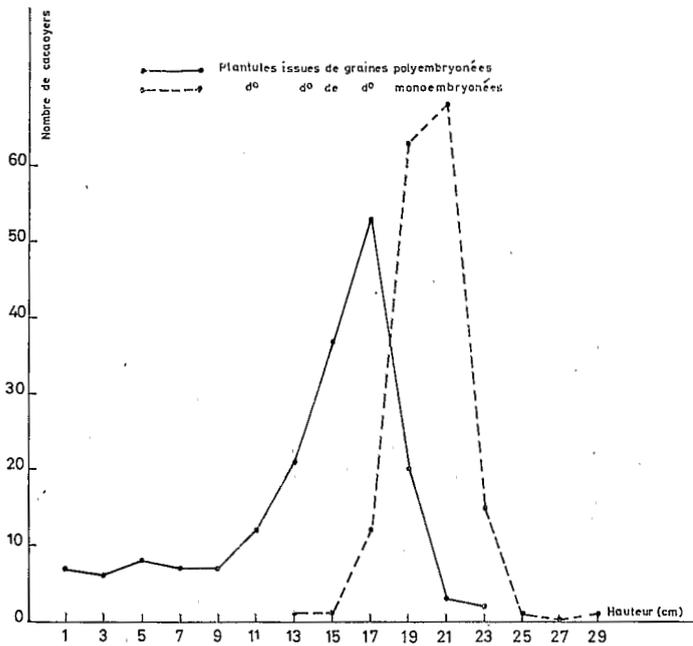
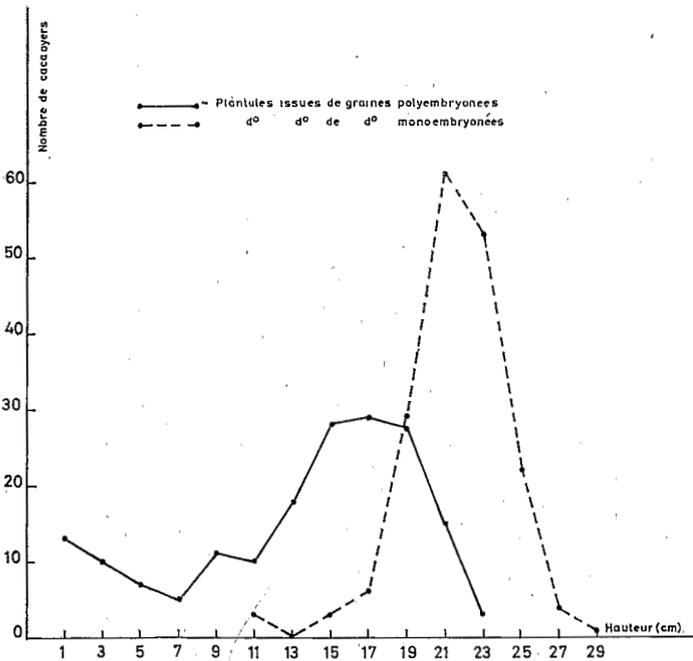


Fig. 7

Graphique 1. — *T. cacao* (Amelonado). Courbes de répartition des hauteurs de plantules âgées de 30 jours

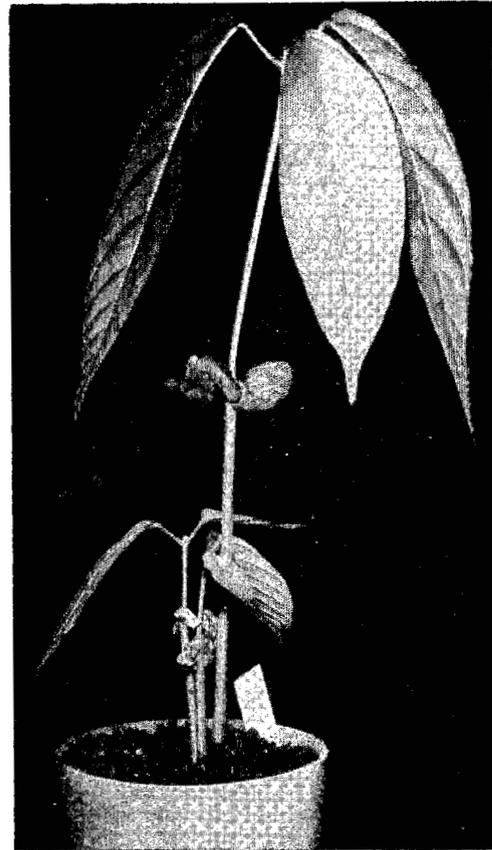


Graphique 2. — *T. cacao* (hybrides amazoniens). Courbes de répartition des hauteurs de plantules âgées de 30 jours



Ci-contre : Fig. 4, 5, 6 et 7. — Polyembryonie chez *T. cacao*. Les plantules jumelles d'un même couple sont rarement identiques ; entre elles il existe souvent une disproportion de taille qui, quelquefois, peut être très accentuée

Fig. 8 et 9. — Polyembryonie chez *T. cacao*. Triplets et quadruplets. Les écarts de dimensions entre plantules issues de graines à trois ou quatre embryons sont comparables à ceux que l'on rencontre chez les plantules jumelles issues de graines bi-embryonnées



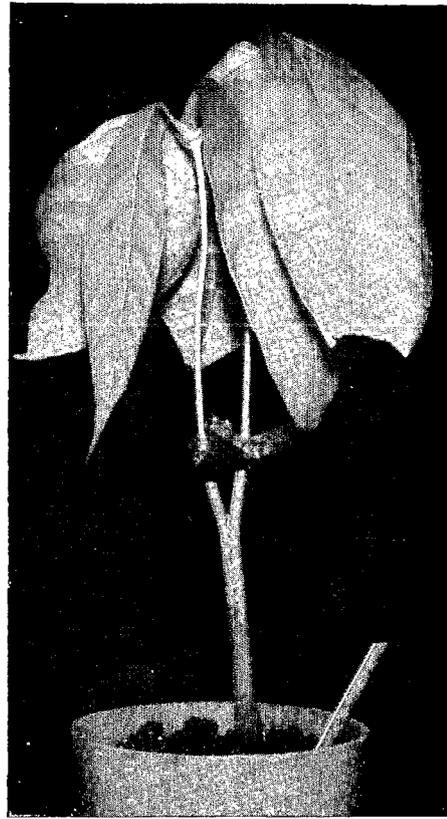
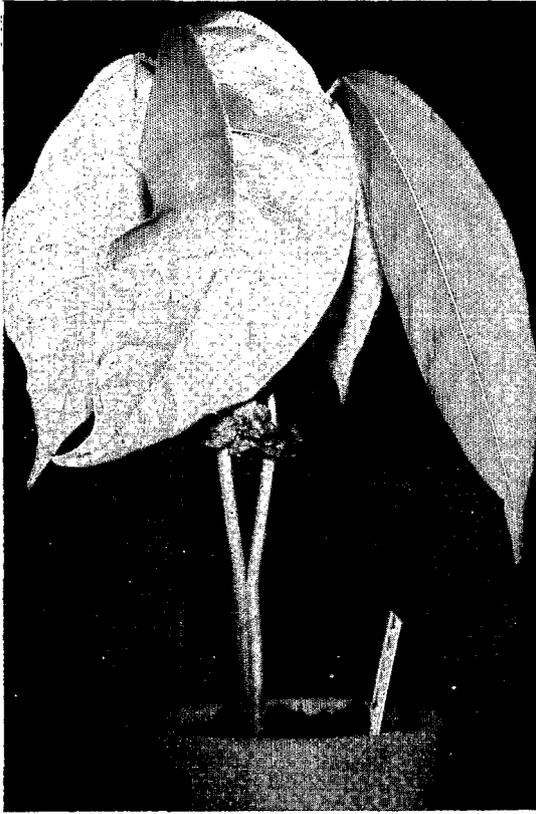
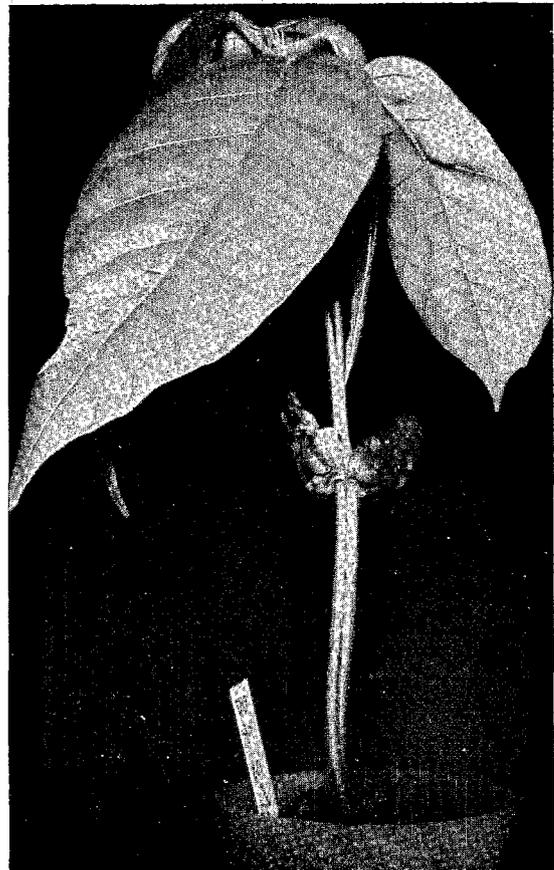


Fig. 10, 11 et 12. — Polyembryonie chez *T. cacao*. Les plantules jumelles sont en général nettement séparées. Les exemples de coalescence s'étendant sur tout ou partie de la zone hypocotylaire sont assez fréquents

OPEKE et JACOB considèrent que ces plantules jumelles proviennent du clivage incomplet d'un même embryon.

Les plantules jumelles que nous avons rencontrées chez le cacaoyer sont nettement différentes du point de vue génétique et ont une autre origine. En effet, le caractère « axil spot » dominant se manifeste par deux taches de coloration rouge situées aux deux extrémités du pétiole, l'une au niveau de l'insertion de celui-ci sur la tige, l'autre au point de son raccordement avec le limbe. Parmi les plantules jumelles d'un même couple, nous avons rencontré de nombreux cas où une seule des deux plantules était porteuse de ce marqueur génétique, témoignant ainsi de leur origine bi-embryonnée.



L'HAPLOÏDIE CHEZ *THEOBROMA CACAO*

Les recherches d'haploïdes de *T. cacao* ont été effectuées, en mai 1972, sur les plantules de graines polyembryonnées provenant principalement d'Amelonado et d'hybrides amazoniens, recueillies à Bingerville pendant la petite récolte intermédiaire qui, dans cette station de Côte d'Ivoire, a lieu entre avril et juillet.

743 graines polyembryonnées, recueillies après triage d'environ 480.000 graines ordinaires ont été examinées; leur répartition par origine est portée dans le tableau II.

On constate que parmi ces graines polyembryonnées: 95 % ont en moyenne deux embryons et 5 % plus de deux embryons; chez les hybrides amazoniens, 6 % des graines ont plus de deux embryons, tandis que seulement 4 % des graines polyembryonnées d'Amelonado ont plus de deux embryons.

C'est aussi parmi les graines polyembryonnées d'origine hybride que l'on rencontre le cas exceptionnel de graines à quatre embryons et plus.

D'une façon générale, on s'accorde à reconnaître que l'haploïde constitue presque toujours une version réduite de son homologue diploïde; la recherche des haploïdes en premier lieu parmi les plus chétives des plantules serait tout à fait naturelle.

La dissymétrie qui apparaîtra ultérieurement au niveau des plantules se manifeste dès la sortie des radicules. Un prélèvement de l'extrémité de la radicule devrait permettre de repérer les couples possédant au moins un embryon haploïde, suivant la technique élaborée par THEVENIN. Chez le cacaoyer, à ce stade, la pointe de la radicule est énorme et contient très peu de mitoses; par ailleurs, tout traumatisme de la radicule correspondant aux plantules chétives accentue encore les difficultés

de développement ultérieur de celles-ci, ou provoque leur mort.

Le prélèvement sur jeunes feuilles, par contre, écarte toutes les difficultés précédentes. Après prétraitement à l' α -bromonaphtalène et fixation au Carnoy, les jeunes feuilles ont été colorées à la pararosaniline suivant la technique de MAIZONNIER et les comptages de chromosomes ont été effectués en contraste de phase à l'aide d'un microscope Wild M. 20.

Ce dépistage de monoploïdes a donc été fait par comptage chromosomique sur jeunes feuilles de plantules provenant de 743 graines polyembryonnées d'origines diverses (tabl. II). Au total, vingt haploïdes ont été dénombrés, ce qui conduirait à un taux de monoploïdie de 2,70 % par rapport aux graines polyembryonnées. Le taux de polyembryonie étant de $1,5 \cdot 10^{-3}$, le taux réel de monoploïdie chez *T. cacao* est d'environ $4,1 \cdot 10^{-5}$. En réalité, il est assez délicat de considérer cette valeur comme correspondant au taux réel de monoploïdie chez le cacaoyer. En effet, parmi les plantules issues des graines polyembryonnées, plusieurs restent chétives et meurent bien avant tout contrôle chromosomique. Les chiffres précédents correspondent donc au taux de monoploïdie observable mais non réel. Les plantules chétives et présumées haploïdes qui meurent précocement sont probablement porteuses de gènes létaux ou subvitaux dont l'action ne se trouve plus équilibrée par leurs allèles homologues, du fait de leur état haploïde. Leur mort doit être acceptée comme le bénéfice d'une sélection naturelle, éliminant ainsi les gènes défavorables.

Chez le cacaoyer, les dimensions des plantules pendant les trois premiers mois de développement sont fonction des réserves cotylédonnaires, autre-

TABLEAU II

Polyembryonie et monoploïdie chez *T. cacao*

Origines	Nombre de fèves à n embryons			Total	Nombre de monoploïdes trouvés	% de monoploïdes	Taux de monoploïdie réelle calculé (1)
	2 E	3 E	4 E et plus				
Amelonado	356	14	1	371	12	3,23	$5,0 \cdot 10^{-5}$
Trinitario	15	1	—	16	—	—	—
UPA	26	—	—	26	1	3,84	$5,95 \cdot 10^{-5}$
Hybrides amazoniens	310	15	5	330	7	2,12	$3,28 \cdot 10^{-5}$
Total	707	30	6	743	20	2,69	$4,16 \cdot 10^{-5}$
%	95,1	4,0	0,9	100			

(E) Embryon.

(1) Pour un taux de polyembryonie moyen de $1,55 \cdot 10^{-3}$.

ment dit des dimensions de la graine d'origine. La répartition de ces réserves parmi les polyembryons est toujours très irrégulière, et les plantules qui héritent de fragments cotylédonaire trop infimes restent chétives avec de petites feuilles.

Le cacaoyer étant un végétal très hétérozygote, on note aussi, indépendamment de tout facteur nutritionnel, une très grande hétérogénéité chez les plantules; cette variabilité qui touche tous les caractères de la plantule (hauteur, fréquence des poussées végétatives, richesse en pigments anthocyaniques des jeunes feuilles, pubescence, dimensions et forme des feuilles) est d'origine génétique.

Les plantules haploïdes, issues de graines polyembryonnées manifestent, elles aussi, une grande variabilité qui tire son origine de l'inégale répartition des réserves cotylédonaire et de la variabilité génotypique des diploïdes dont elles sont issues. Contrairement à toute attente, ces plantules haploïdes ne se rencontrent pas obligatoirement parmi les plantules les plus chétives issues des polyembryons (fig. 4 à 9, p. 302-303).

En dépit de cette variabilité qui se manifeste au niveau de tous les caractères morphologiques, la plantule haploïde présente un certain nombre de traits particuliers qui font la spécificité de son phénotype.

Toutes autres conditions étant égales par ailleurs, la plantule haploïde a une croissance beaucoup plus lente que la plantule diploïde, les poussées végétatives sont en effet plus espacées et les émissions foliaires sont chaque fois réduites à une ou deux feuilles.

Les entre-nœuds courts peuvent donner un net aspect de rosette à la jeune plantule vue de haut. Les feuilles petites ont également un pétiole court et qui forme avec la tige un angle toujours très fermé; chez le diploïde, cet angle d'insertion des pétioles est généralement ouvert.

C'est tout particulièrement l'aspect gaufré des limbes qui est spécifique de l'haploïde chez *T. cacao*. Ce gaufrage très irrégulier est constitué par une série de renforcements et de plis répartis le long des nervures principale et secondaires de la feuille (fig. 13 et 14).

Ce gaufrage particulier, toujours nettement visible au cours des premiers stades, peut être plus ou moins accentué d'une plantule à une autre. Au



Fig. 13 et 14. — Monoploïdie chez *T. cacao*. Plantules haploïdes de *T. cacao* (cultivar Amelonado) âgées de trois mois. A noter le gaufrage caractéristique mais variable des jeunes feuilles

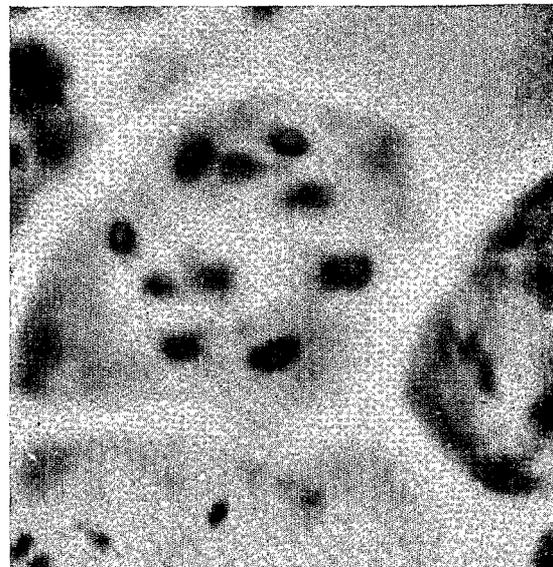


Fig. 15. — Métaphase de mitose chez un haploïde de *T. cacao* avec $n = 10$, photographiée en contraste de phase

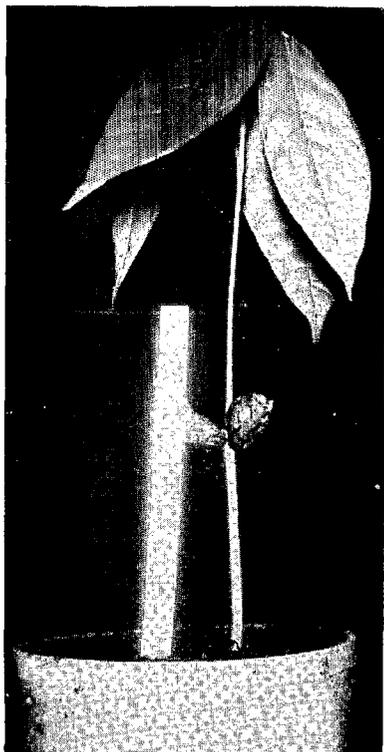


Fig. 16 et 17. — Plantule diploïde de *T. cacao* (Cultivar Amelonado) âgée de 20 jours

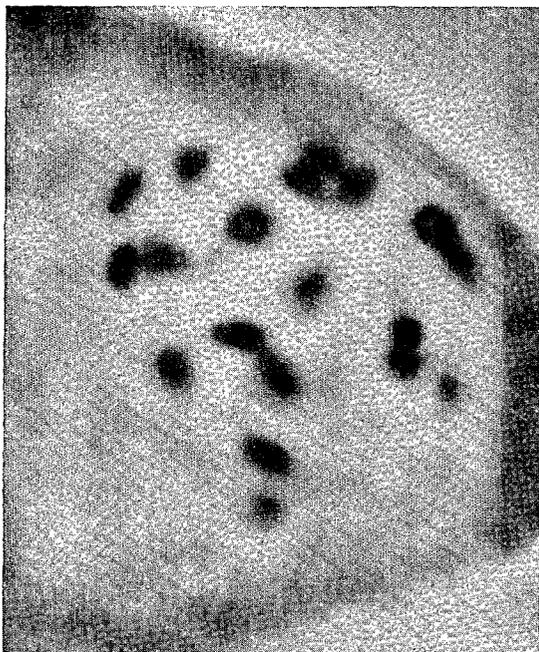


Fig. 18. — Métaphase de mitose chez un diploïde de *T. cacao* avec $2n = 20$ photographiée en contraste de phase

Les clichés sont de P. Dublin

cours des poussées végétatives, on assiste à une réduction progressive de ce gaufrage qui ne disparaît jamais complètement (au stade actuel de nos observations : plantules haploïdes de quatre mois).

La coloration des feuilles des plantules haploïdes est aussi nettement différente de celle des plantules diploïdes, indépendamment de tout facteur d'éclairage. La feuille de la plantule haploïde est en effet d'un vert tendre irrégulier, avec par endroit de minuscules zones plus pâles. Le contour de la feuille est lui aussi toujours irrégulier.

Il semblerait que la pigmentation anthocyanique des jeunes feuilles de la plantule haploïde soit moins accentuée que celle de la plantule diploïde ; ce caractère étant chez les diploïdes très variable et si fortement influencé par le génotype et les éclairages, qu'il est délicat de se prononcer sur sa valeur au stade de nos observations.

Au point de vue anatomique, les cellules somatiques de l'haploïde sont de dimensions nettement plus petites que celles des diploïdes. C'est là un caractère frappant et qui apparaît de façon très nette dans les figures métaphasiques de mitose.

CONCLUSION ET DISCUSSION

Malgré les progrès récents accomplis dans le domaine de l'induction des haploïdes, leur apparition chez de nombreuses espèces conserve encore un caractère fortuit et leur utilisation dans l'amélioration des plantes serait beaucoup plus répandue s'il était plus aisé de les déceler au sein d'un échantillon de plantes.

Abstraction faite de la culture *in vitro* d'anthères dont, a priori, l'application devrait pouvoir être généralisée, il existe, parmi les autres procédés d'induction de l'haploïdie, une méthode plus particulièrement adaptée aux caractéristiques de chaque espèce.

La méthode de dissociation des polyembryons, qui est à l'origine des haploïdes découverts chez un grand nombre d'espèces, se révèle comme parfaitement adaptée aux caractères spécifiques de *T. cacao*.

Le taux de monoploïdie du cacaoyer, $4,1 \cdot 10^{-5}$, est pratiquement identique à celui trouvé par THEVENIN chez l'*Asparagus* dont l'amélioration actuelle est basée sur l'utilisation d'haploïdes issus de la polyembryonie.

Dans le cadre général de l'utilisation de l'haploïdie en amélioration des plantes, et tout particulièrement chez un végétal aussi hétérozygote que le cacaoyer, il est indispensable de disposer au départ d'un grand nombre d'haploïdes qui permettent un choix parmi les dihaploïdes.

Lors de la sélection faite au niveau de ces dihaploïdes, un parent homozygote aura d'autant plus de chance d'être choisi qu'il sera porteur de gènes favorables et par conséquent issu d'un haploïde porteur de ces mêmes gènes. Les recherches d'haploïdes devraient être effectuées parmi la population gamétique issue d'individus reconnus pour leurs bonnes performances agronomiques.

Dans le cas du cacaoyer, ces recherches devraient donc être effectuées parmi les gamètes issus des parents ayant fourni les meilleurs hybrides amazoniens. La polyembryonie en tant que procédé de recherche d'haploïdes chez un géniteur cacaoyer non clonal, représenté par un individu, apparaît comme peu utilisable étant donné que la production d'un cacaoyer dépasse rarement 50 cabosses, soit 2.000 graines.

En dépit de cet aspect limitatif, l'obtention dans un premier temps d'haploïdes en nombre même restreint constitue pour le cacaoyer une étape d'un grand intérêt du point de vue méthodologique.

La découverte d'haploïdes chez le cacaoyer revêt, pour ce végétal, une importance primordiale. En premier lieu, elle apporte la démonstration de l'existence de monoploïdie chez cette espèce, condition première à toute hypothèse de travail basée sur son utilisation pratique ; en second lieu, elle permet d'ores et déjà l'étude des nombreux problèmes (diploïdisation, dépression consécutive à l'état d'homozygotie) situés en aval et indissolublement liés à toute perspective d'emploi de l'haploïdie dans l'amélioration de cette plante.

Les connaissances désormais acquises sur le phénotype haploïde devraient permettre un repérage plus facile de celui-ci, lors des tentatives d'utilisation des autres procédés, tels que les hybridations avec un pollen éloigné ou avec un pollen traité par un moyen physique ou chimique.

La découverte d'haploïdie chez *T. cacao* fournit aussi un exemple supplémentaire parmi les rares cas d'haploïdie connus chez les végétaux arborescents.

BIBLIOGRAPHIE

- ANUBHAVA NARAIN, SINGH (P.), 1968. — Haploid meiosis and its bearing on the constitution of the castor oil plant. *J. Hered.*, vol. 59, n° 5, p. 287-288.
- BERNARD (S.), 1971. — Développement d'embryons haploïdes à partir d'anthères cultivées *in vitro*. Étude cytologique comparée chez le tabac et le pétunia. *Rev. Cytol. et Biol. vég.*, 34, p. 185-188.
- BESSE (J.), 1969. — L'amélioration du cacaoyer en Côte d'Ivoire. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. 8, n° 4, oct.-déc., p. 245-263.
- BLANCHET (J. Y.), 1966. — Haploïdie et sélection des plantes. Conférence ASF, 49 p.
- BINGHAM (E. T.), 1971. — Isolation of haploids of tetraploid alfalfa. *Crop Science*, vol. 11, p. 133-135.
- BOUHARMONT (J.), 1960. — Recherches cytologiques sur la fructification et l'incompatibilité chez *Theobroma cacao*. Public. INEAC, Série Scient., n° 89.
- BOURGIN (J. P.), NITSCH (J. P.), 1967. — Obtention de *Nicotiana* haploïdes à partir d'étamines cultivées *in vitro*. *Ann. Physiol. vég.*, 9, (4), p. 377-382.
- BRAUDEAU (J.), 1969. — Le cacaoyer. Maisonneuve et Larose, Paris, 304 p.
- CHASE (S. S.), 1969. — Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.). *The botanical Review*, 35, p. 117-167.
- CHEESMAN (F. F.), 1927. — Fertilization and embryogeny in *Theobroma cacao*. *An. of Bot.*, XLIM, CLXI, p. 107-126.

- COOPER (D. C.), 1943. — Haploid-Diploid twin embryos in *Lilium* and *Nicotiana*. *Amer. J. of Bot.*, vol. 30, p. 408-413.
- COPE (F. W.), 1967. — Multiple embryo-sacs in *Theobroma cacao*. *An. Report on Cocoa Research, Trinidad*, p. 33-35.
- CORNU (A.), MAIZONNIER (D.), 1970. — Origine et comportement méiotique d'un pétunia haploïde. *C. R. Acad. Sc. Paris*, t. 270, p. 311-313, (12 janv.).
- DEVREUX (M.), 1971. — Plantes haploïdes et lignées isogéniques de *Nicotiana tabacum* obtenues par cultures d'anthers et de tiges *in vitro*. *Caryologia*, vol. 24, n° 1, p. 141-148.
- DRYANOVSKA (O. A.), 1970. — Gynogenesis, induced by gamma rays in *Nicotiana tabacum* L. *Compte rendu de l'Académie Bulgare des Sciences*, tome 23, n° 2, p. 217-220.
- DUBLIN (P.), 1971. — Culture *in vitro* d'anthers de *T. cacao*. *Fac. Sci. Orsay*, rap. de stage.
- DUBLIN (P.), 1972. — Sur la recherche et l'utilisation des haploïdes dans l'amélioration et l'étude génétique des plantes stimulantes en Côte d'Ivoire. Comité Technique de l'IFCC, mai 1972, Côte d'Ivoire.
- ENDRIZZI (J. E.), 1966. — Use of haploids in *Gossypium barbadense* L. as a source of aneuploid. *Current Science*, vol. 35, n° 2, p. 34-35.
- GLENDINNING (D. R.), 1960. — Selfing of self incompatible cocoa. *Nature*, Jul. 9, vol. 187, p. 170.
- GUHA (S.), 1966. — Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura*, *in vitro*. *Nature*, oct. 1, n° 5057, p. 97-98.
- GUHA (S.), IYER (R.), 1970. — Totipotency of gametic cells and the production of haploids in rice. *Current Science*, vol. 39, n° 8, p. 174-176.
- GUHA (S.), MAHESHWARI (S. C.), 1964. — *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, vol. 31, n° 4957, p. 497.
- GUHA (S.), MAHESHWARI (S. C.), 1967. — Development of embryos from pollen grains of *Datura*, *in vitro*. *Phytomorphology*, vol. 17, n° 1-4, p. 454-461.
- HESSE (D. C.), 1971. — Monoploid peaches, *Prunus persica* B. description and meiotic analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, vol. 96, (3), p. 326-330.
- KAMEYA (T.), HINATA (K.), 1970. — Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*. *Japan J. Breeding*, vol. 20, n° 2, p. 82-87.
- KATAYAMA (Y.), 1969. — Studies on the haploidy in relation to plant breeding. IV. Parthenogenetic development induced by alien pollen. *Seiken Zihô*, 21, p. 31-35.
- KATAYAMA (Y.), 1960. — Studies on the haploidy in relation to plant breeding. Some experiments on the artificial induction of parthenogenetic development. *Memoirs of the Faculty of Agriculture, University of Miyazaki*, vol. 2, p. 89-99.
- KATAYAMA (Y.), TANAKA (M.), 1969. — Studies on the haploidy in relation to plant breeding. Further proposal of haploid method in plant breeding. *Seiken Zihô*, 21, p. 37-49.
- KATSUO KIYOSHI, 1969. — Etude sur la culture d'anthers de thé. *Ikushugaku Tasshi*, 19, suppl. 1, p. 88-99-100.
- KIHARA (H.), 1940. — Delayed pollination in *T. monococcum*. *The botanical Magazine*, vol. LIV, n° 641, 20 mai, p. 123 et 185.
- KIMBER (G.), RILEY (R.), 1963. — Haploid angiosperms. *Bot. Review*, oct.-déc., p. 480-531.
- KIRILLOVA (G.), 1966. — The phenomenon of haploidy in angiosperms. *Genetika*, vol. 2, n° 2, p. 137-147.
- KONAR (R. N.), NATARAJA (K.), 1965. — Production of embryos from the anthers of *Ranunculus sceleratus* L. *Phytomorphology*, sept., p. 245-248.
- MAGOON (M. L.), KHANNA (K. R.), 1963. — Haploïdes. *Caryologia*, vol. 16, n° 1, p. 191-235.
- MAIZONNIER (D.), 1971. — Utilisation de plantes haploïdes pour l'analyse du caryogramme de *Petunia hybrida* Hort. *Ann. Amélior. Plantes*, 21, (3), p. 257-264.
- MAIZONNIER (D.), 1968. — Utilisation du froid comme agent préfixateur pour les comptages chromosomiques sur apex radiculaires de trèfle violet autotétraploïdes. *Ann. Amélior. Plantes*, 18, (1), p. 81-84.
- MONTEZUMA DE CARVALHO (J.), 1967. — The effect of N₂O on pollen tube mitosis in styles and its potential significance for inducing haploidy in potato. *Euphytica*, 16, 190-198, p. 190-191.
- NAKATA (K.), TANAKA (M.), 1968. — Etude sur la différenciation de jeunes pousses de tabac à partir du pollen développé par culture d'anthers. *Japan J. Genetics*, vol. 43, n° 1, p. 65-71.
- MASATOSHINEI, 1963. — The efficiency of haploid method of plant breeding. *Heredity*, 18, p. 95-100.
- NITSCH (J. P.), 1967. — Réalisation expérimentale de « l'androgénèse » chez divers *Nicotiana*. *C. R. Soc. biol.*, n° 2, p. 369-372.
- NITSCH (J. P.), 1969. — Production de *Nicotiana* diploïdes à partir de cals haploïdes cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, t. 269, p. 1275-1278.
- NITSCH (J. P.), 1969. — Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology*, déc., p. 389-404.
- NIZEKI (H.), 1968. — Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc. Japan Acad.*, 44, p. 554-557; fig., tabl., réf.
- OPEKE (L. K.), JACOB (V. J.), 1965. — Polyembryony and pleiotyly in *Theobroma cacao* L. *Nig. Agric. Journ.*, 2, p. 52-53.
- PANTULU (J. V.), MANGA (V.), 1969. — Meiosis in a haploid pearl millet. *Current Science*, vol. 38, n° 6, p. 143-144.
- PELLETIER, 1971. — Obtention de plantes haploïdes par culture d'anthers. Séminaire INRA, Avignon, 7, oct.
- PELOQUIN (S. J.), HOUGAS (R. W.), 1964. — Inheritance of incompatibility in hybrids between *Solanum tuberosum* haploid and diploid species. *Euphytica*, 13, p. 173-172.
- POCHARD (E.), 1970. — Description des trisomiques du piment (*Capsicum annum* L.) obtenus dans la descendance d'une plante haploïde. *Ann. Amélior. Plantes*, 20, (2), p. 233-256.
- POCHARD (E.), DUMAS DE VAULX (R.), 1971. — La monoploïdie chez le piment (*Capsicum annum* L.). Réalisation pratique d'un cycle de sélection accéléré par passage à l'état monoploïde en troisième génération. *Pflanzenzüchtg*, 65, p. 23-96.
- POCHARD (E.), 1969. — Utilisation de l'haploïdie en amélioration des plantes. Application à une plante autogame : le piment (*Capsicum annum* L.). *Le Sélectionneur Français*, juin, p. 25-36.
- SAPRE (A. B.), 1970. — Embryological studies in a haploid rice. *Science et Culture*, vol. 36, n° 4, p. 225-226.
- SIMMONDS (N. W.), 1954. — Chromosome behaviour in some tropical plants. *Heredity*, 8, p. 139-146.
- SUNDERLAND (N.), 1969. — Cultivation of haploid plants from tobacco pollen. *Nature*, vol. 224, 20, p. 1227-1229.
- THEVENIN, 1968. — Les problèmes d'amélioration chez *Asparagus officinalis* L. (1). II. Haploïdie et amélioration. *Ann. Amélior. Plantes*, 18, (4), p. 327-365.
- YAKOVLEV (M. S.), 1968. — Polyembryony in higher plants and principles of its classification. *Phytomorphology*, 17, 5, p. 278-282.

DUBLIN (P.). — **Polyembryonie et haploïdie chez *Theobroma cacao***. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XVI, n° 4, oct.-déc. 1972, p. 295-311, fig., tabl., ph., réf.

L'étude des croisements entre génotypes des trois groupes de cacaoyers présents en Afrique (Amelonado, Trinitario, Haut-Amazoniens) montre que les meilleures combinaisons sont celles qui comportent un géniteur Haut-Amazonien. C'est au sein de ce groupe de cacaoyers (toujours auto-incompatibles) que l'on a découvert les gènes de résistance à plusieurs maladies des cacaoyers ainsi que les « facteurs complémentaires » de vigueur des deux autres groupes.

Les hybrides amazoniens présentent malheureusement une grande hétérogénéité, conséquence de l'hétérozygotie des géniteurs Haut-Amazoniens.

L'auteur a donc recherché des haploïdes qui, diploïdisés par la suite, permettraient d'obtenir des géniteurs homozygotes dans un délai acceptable. La méthode de dissociation des polyembryons s'est révélée adaptable au cacaoyer.

La recherche d'haploïdes de *Theobroma cacao* a été effectuée en mai 1972, sur plantules de graines polyembryonnées, provenant principalement d'Amelonado et d'hybrides amazoniens, recueillies à Bingerville (Côte d'Ivoire) pendant la petite récolte intermédiaire (avril-juillet) et semées après prégermination. Après prétraitement à l' α -bromonaphtalène et fixation au Carnoy, les jeunes feuilles des plantules ont été colorées à la pararosaniline suivant la technique de Maizonnier et les comptages de chromosomes ont été effectués en contraste de phase.

Le taux d'haploïdie spontanée chez *T. c.* est de $4,1 \times 10^{-5}$. Les plantules haploïdes sont chétives, caractérisées par un limbe foliaire vert tendre gaufré, dont les cellules somatiques sont nettement plus petites que celles des diploïdes.

Cette découverte d'haploïdes démontre l'existence de monoploïdie chez *T. c.*, permet l'étude de nombreux problèmes liés à l'emploi de l'haploïdie dans l'amélioration de tout végétal et constitue un exemple supplémentaire parmi les rares cas d'haploïdie connus chez les végétaux arborescents.

DUBLIN (P.). — **Polyembryonie und Haploidie bei *Theobroma cacao***. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XVI, n° 4, oct.-déc. 1972, p. 295-311, fig., tabl., ph., réf.

Das Studium der Kreuzungen zwischen Genotypen der drei in Afrika anzutreffenden Kakaobäumen (Amelonado, Trinitario, Ober-Amazonier) zeigt dass die Kombinationen die einen Ober-Amazonier Erzeuger aufweisen, die besten sind. Innerhalb dieser Gruppen von (stets unvereinbaren) Kakaobäumen findet man die Gene der Resistenz gegen mehrere Krankheiten der Kakaobäume sowie die « sich ergänzenden Krafftaktoren » der zwei anderen Gruppen.

Die Amazonierhybriden weisen leider eine grosse Heterogenität, Folge der Heterozygotie der Ober-Amazonier auf.

DUBLIN (P.). — **Polyembryony and haploidy in *Theobroma cacao***. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XVI, n° 4, oct.-déc. 1972, p. 295-311, fig., tabl., ph., réf.

The study of crossings between the genotypes of the three groups of cacao-trees in Africa (Amelonado, Trinitario, Upper Amazon) shows that the best combinations are those which comprise an Upper Amazon parent. It is within this group of cacao-trees (always self-incompatible) that the genes for resistance to several cacao-tree diseases as well as the « complementary factors » related to vigour of the two other groups, were discovered.

The amazonian hybrids unfortunately show a high heterogeneity which results from the heterozygous nature of the Upper Amazon parents.

The author has therefore looked for haploids which, when rendered diploid subsequently might make it possible to obtain homozygous parents within an acceptable time. The method of polyembryo dissociation turned out to be adaptable to the cacao-tree.

The search for *Theobroma cacao* haploids was carried out in May 1972 on polyembryo seed plantlets originating mainly from Amelonado and amazonian hybrids, collected at Bingerville (Ivory Coast) during the small intermediate crop (April-July) and sown after pregermination. After pretreatment with alpha-bromonaphthalene and fixing with Carnoy, the young plantlet leaves were stained with pararosaniline according to Maizonnier's technique and the chromosome counts were carried out by phase contrast.

The spontaneous haploid ratio in *T. c.* was 4.1×10^{-5} . The haploid plantlets were stunted and were characterized by a crimped tender green foliar limb the somatic cells of which were definitely smaller than those of the diploid ones.

This discovery of haploids proves the existence of monoploidy in *T. c.*, makes it possible to study the numerous problems connected with the use of haploidy in the improvement of any plant and constitutes an additional example among the rare cases of haploidy known in tree-like plants.

DUBLIN (P.). — **Poliembriónia y haploidía en *Theobroma cacao***. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XVI, n° 4, oct.-déc. 1972, p. 295-311, fig., tabl., ph., réf.

El estudio de los cruzamientos entre genótipos de los tres tipos de cacao presentes en África (Amelonado, Trinitario, Altoamazónico) muestra que las mejores combinaciones son las que comportan un genitor Altoamazónico. Dentro de este grupo de cacao (siempre autoincompatibles) se descubrieron los genes de resistencia a varias enfermedades de los cacao y los « factores complementarios » de vigor de los otros dos grupos.

Los híbridos Amazónicos tienen desgraciadamente una gran heterogeneidad que es una consecuencia de la heterocigocía de los genitores Altoamazónicos.

Der Autor sucht daher nach Hapliden die, später diploidisiert, erlauben, homozygote Erzeuger in einer annehmbaren Frist zu erzielen. Die Methode der Dissoziation der Polyembryone erwies sich als geeignet für Kakaobohnen.

Die Suche nach Hapliden von *Theobroma cacao* wurde im Mai 1972 an Keimlingen von polyembryonierten Samen vorgenommen, die im wesentlichen von Amelonado und Amazonierhybriden herrührten, in Bingerville (Elfenbeinküste) während der kleinen Zwischenernte (April-Juli) geerntet und nach Vorkeimung gesät wurden. Nach Vorbereitung mit α -Bromonaphtalin und Fixierung mit Carnoy wurden die jungen Blätter der Keimlinge mit Pararosanilin gemäss der Technik von Maizonnier gefärbt und die Chromosomenzählung bei Phasenkontrast vorgenommen.

Der Grad spontaner Haploidie bei *T. c.* beträgt $4,1 \times 10^{-5}$. Die haploiden Keimlinge sind kümmerlich und durch eine hellgrüne gaufrigte Blattspreite gekennzeichnet, deren somatische Zellen deutlich kleiner sind als die der Diploiden.

Diese Entdeckung von Hapliden beweist das Bestehen von Monoploidie bei *T. c.*, erlaubt die Prüfung von Problemen, die mit der Verwendung der Haploidie bei der Verbesserung jeder Pflanze verknüpft sind und bildet ein weiteres Beispiel unter den seltenen Fällen von Haploidie bei Baumpflanzen.

Por eso el autor buscó unos haploides que, después de diploizados, diesen genitores homocigotos en un plazo aceptable. El método de disociación de los poliembryones se reveló adaptable al cacao.

Se efectuó en mayo de 1972 la investigación de haploides de *Theobroma cacao* en plantitas de simientes poliembriadas, procedentes principalmente en Bingerville (Costa de Marfil) durante la pequeña recolección intermediaria (abril-julio) y sembradas después de su pregerminación. Después de un pretratamiento con α -bromonaftaleno y de una fijación con Carnoy, las jóvenes hojas de las plantitas se coloraron con pararosanilina según la técnica de Maizonnier y se computaron los cromosomas en contraste de fase.

El grado de haploidía espontánea en *T. c.* es de $4,1 \times 10^{-5}$. Las plantitas haploides son endebles, con una lámina foliar verde claro rizada cuyas células somáticas son distintamente más pequeñas que las de los haploides.

El haberse descubierto dichos haploides revela la existencia de una monoploidía en *T. c.*, vuelve posible el estudio de numerosos problemas que plantea el uso de la haploidía para mejorar los vegetales de todos tipos, además de ser uno de los pocos casos de haploidía que se conoce entre los vegetales arborescentes.