

Revue bibliographique sur l'hybridation interspécifique chez les trèfles

C. Mousset-Déclas

Le genre *Trifolium* est particulièrement vaste : environ 250 espèces réparties à travers les zones tempérées et subtropicales du globe. Environ 20 espèces présentent un intérêt agronomique, avec en premier lieu le trèfle blanc *Trifolium repens* L. et le trèfle violet *Trifolium pratense* L. La diversité du genre *Trifolium* est très importante aussi bien au point de vue morphologique que de la biologie florale, de l'écologie, etc. Même le caractère "3 folioles" qui devrait faire l'unité du genre est remplacé par un nombre supérieur (jusqu'à 7) chez certaines espèces (GILLET, 1985). Approximativement 1/3 des espèces sont pérennes et la moitié sont autofertiles, ces deux caractères étant très rarement associés chez une même espèce.

Le nombre chromosomique de base est $x = 8$, mais on trouve également des espèces à $x = 7, 6$ ou 5 . On dénombre environ 16% de polyploïdes dont le trèfle blanc ($2n = 4x = 32$) est un exemple. Signalons que le trèfle violet, dont il existe des variétés tétraploïdes très performantes, n'existe, à l'état spontané, que sous la forme diploïde. Trois centres de diversité sont répertoriés : l'Eurasie (150 à 160 espèces), l'Amérique (60 à 65 espèces) et l'Afrique (25 à 30 espèces). Le centre d'origine serait le pourtour méditerranéen. L'étude de ce genre *Trifolium* a été considéra-

MOTS CLÉS

Hybridation interspécifique, sélection variétale, trèfle blanc, trèfle violet.

KEY-WORDS

Interspecific hybridization, red clover, varietal selection, white clover.

AUTEUR

INRA, Station d'Amélioration des Plantes, BV 1540, F 21034 Dijon Cedex, France

blement avancée et synthétisée par un systématicien israélien : M. ZOHARY (ZOHARY et HELLER, 1984).

Une telle prolifération d'espèces semble ouvrir la porte à de nombreuses possibilités d'hybridations interspécifiques. La première pourrait être *Trifolium hybridum* que certains botanistes ont vu comme un hybride *T. repens* × *T. pratense*. On sait aujourd'hui que ces deux espèces appartiennent à deux sections différentes et aucun hybride n'a été identifié (CLEVELAND, 1985).

• Localisation des recherches

Les chercheurs ayant travaillé sur les hybridations interspécifiques chez les trèfles sont nombreux. Un des tout premiers fut le norvégien WEXELSEN (1928), mais ses croisements conventionnels ne lui ont pas permis d'obtenir des hybrides. Récemment, plusieurs équipes travaillant sur ce sujet ont publié des articles fort intéressants :

— en Europe : MAIZONNIER (France), MERKER (Suède), KAZIMIERSKI et al. (Pologne) ;

— aux Etats-Unis : TAYLOR et al., RUPERT, EVANS et GIBSON, et WILLIAMS et al. (Nouvelle-Zélande, puis Etats-Unis) ;

— au Japon : YAMADA et FUKUOKA.

Les principaux articles de ces auteurs sont référencés dans la bibliographie. Cette liste est loin d'être exhaustive et ne recouvre qu'une partie des équipes ayant publié sur les hybridations interspécifiques chez les trèfles.

• Pourquoi faire des hybridations interspécifiques chez les trèfles ?

Plusieurs réponses peuvent être apportées :

— *pour faire des études phylogéniques* : en effet, la facilité du croisement et l'étude de la méiose de l'hybride donnent des indications essentielles sur les distances génétiques entre espèces et sur la systématique ;

— *pour augmenter la pérennité* : la persistance est une caractéristique agronomique très recherchée pour les plantes fourragères pluri-annuelles. Elle peut être soit physiologique (plantes annuelles/pérennes), soit morphologique (plantes aux systèmes racinaires puissants, rhizomes, stolons, etc.), soit dépendante de la résistance aux parasites. On peut donc rechercher une ou plusieurs de ces caractéristiques chez une autre espèce à hybrider avec l'espèce cultivée. Exemple : on tente d'amé-

liorer la pérennité du trèfle violet en le croisant avec une espèce plus pérenne telle que le trèfle zigzag (*T. medium*) ou *T. sarosiense* ;

— pour améliorer la résistance aux maladies : par exemple, le trèfle blanc, très sensible aux viroses, a été hybridé avec le trèfle caucasien (*T. ambiguum*), plus résistant.

• Quelles méthodes ont été employées ?

Plusieurs techniques ont permis de réaliser des hybrides interspécifiques ; citons, de la plus simple à la plus complexe :

— le croisement conventionnel, c'est-à-dire manuel, en laissant l'embryon sur la plante mère ;

— la culture d'ovule : dans ce cas l'ovule est prélevé sur la plante-mère et mis en culture sur un milieu stérile in vitro. Cette technique a été utilisée par YAMADA et FUKUOKA (1986) pour la réalisation de l'hybride *T. repens* × *T. ambiguum* ;

— la culture d'embryons : c'est sans doute la technique la plus utilisée car relativement simple. Il s'agit de prélever les ovaires 9 à 20 jours (selon le croisement) après la pollinisation manuelle. Après stérilisation, les ovules sont disséqués aseptiquement et l'embryon hybride est excisé et mis en culture sur un milieu stérile, le plus souvent gélifié. Après 7 à 14 jours, les embryons matures sont transférés sur un milieu induisant la germination. Cette technique a permis l'obtention de l'hybride *T. sarosiense* × *T. pratense* par l'équipe de TAYLOR (PHILLIPS et al., 1982) ;

— la culture d'embryons sur albumen nourricier : variante de la technique précédente. On prépare en plus de l'embryon hybride un ovule issu de croisement intraspécifique (côté maternel). On en extrait l'embryon et on le remplace par l'embryon hybride qui pourra ainsi être alimenté par l'albumen maternel normal. On peut également transférer l'albumen hybride dans l'ovule issu du croisement interspécifique. Cette technique a permis à WILLIAMS (WILLIAMS, 1978 ; WILLIAMS et DELAUTOUR, 1980 ; WILLIAMS et VERRY, 1981) d'obtenir des hybrides *T. ambiguum* × *T. repens* ;

— la fusion somatique de protoplastes n'a pas encore abouti à la production d'un hybride de trèfle. Les essais d'hybridation de *T. pratense* et *T. rubens* par cette méthode n'ont pas abouti (TAYLOR, 1985).

Lorsqu'une plantule est obtenue à la suite d'un croisement interspécifique, il faut prouver son hybridité. Cela se fait à partir de l'observation du nombre de chromosomes du caryogramme, de l'appariement méiotique et surtout des caractères morphologiques. On peut également utiliser des marqueurs biochimiques (isoenzymes par exemple) ou génomiques (étude des ADN ou ARN).

• Les résultats

Actuellement, 62 hybrides interspécifiques chez les trèfles ont été recensés (CLEVELAND, 1985). Il s'agit de tous les résultats publiés, croisements réciproques y compris, même si seule la formation de graines a été notée et si l'hybridité n'a pas été prouvée. Ces 62 hybrides concernent seulement 25 espèces, soit 10% du nombre total d'espèces de *Trifolium*. Ces espèces appartiennent principalement à 3 sections : *Amoria*, où se situent les espèces *T. repens*, *T. ambiguum* et *T. hybridum*; *Trifolium* avec *T. pratense*, *T. medium*, *T. alexandrinum* et *Trichocephalum* où l'on trouve *T. subterraneum*. Très peu d'hybrides intersections ont été obtenus.

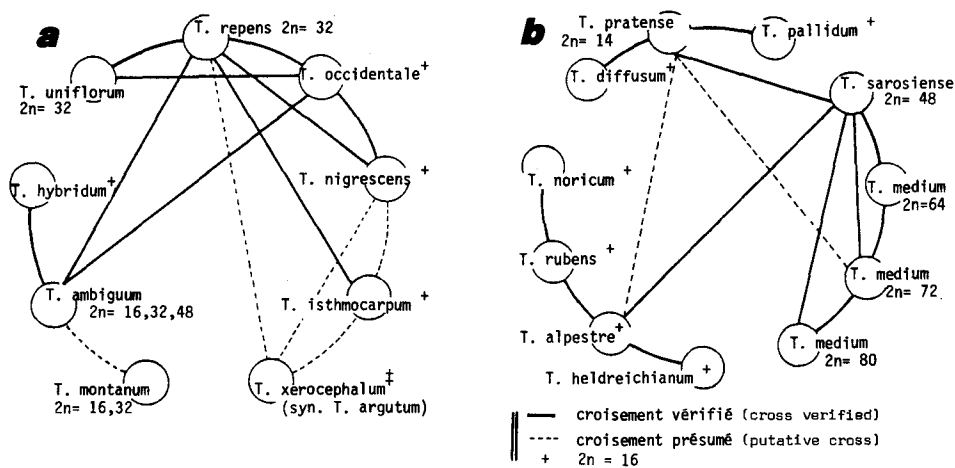


FIGURE 1 : Croisements réalisés entre espèces a) du groupe du trèfle blanc, *T. repens*, b) du groupe du trèfle violet, *T. pratense* (d'après CLEVELAND, 1985)

FIGURE 1 : Crosses performed between species belonging to a) the white clover group, *T. repens*, b) the red clover group, *T. pratense* (after CLEVELAND, 1985).

La figure 1a présente les hybridations qui ont été réalisées parmi le groupe du trèfle blanc *T. repens* (section *Amoria*). Ce groupe possède 3 espèces polyploïdes dont *T. repens*. La distance entre les espèces est basée sur les facilités de croisement et la méiose des hybrides. Il serait possible que *T. repens* soit issu de la polyploïdisation de *T. occidentale*. Plusieurs hybrides *T. ambiguum* × *T. repens* ont été obtenus par différentes équipes dont certains sont très vigoureux, partiellement fertiles, et ont pu être autofécondés et rétrocroisés par *T. repens* afin d'essayer d'améliorer les caractéristiques agronomiques de l'hybride. Il semble que la résistance aux viroses ait été transmise aux hybrides (WILLIAMS, 1987). Ce programme de sélection est poursuivi à l'Université du Kentucky par les équipes de TAYLOR et WILLIAMS.

La figure 1b présente selon les mêmes principes le groupe du trèfle violet *T. pratense* (section *Trifolium*). Le trèfle violet, considéré comme une légumineuse fourragère pérenne, se rattache en fait au groupe des annuelles. En effet, le nombre de base $x = 7$ qu'il présente est plutôt caractéristique des espèces annuelles et, d'autre part, les deux espèces qui apparaissent les plus proches du trèfle violet sont annuelles. Cependant, les autres espèces de ce groupe sont pérennes, voire très pérennes comme *T. sarosiense* et *T. medium*. Des hybrides *T. sarosiense* \times *T. pratense* et *T. medium* \times *T. pratense* ont été obtenus par culture d'embryons (PHILLIPS et al., 1982) mais aucun n'est fertile. C'est cependant une première étape pour tenter d'améliorer la pérennité du trèfle violet, étape que MAIZONNIER (1972) n'avait pas réussie par croisement conventionnel.

• Les difficultés actuelles

Les problèmes non résolus par les techniques actuelles sont nombreux. Voici leur liste chronologique depuis la fécondation :

— *absence de fécondation* : si les espèces sont très incompatibles, le pollen peut ne pas germer sur le stigmate ou bien être arrêté dans sa croissance, ou encore ne pas féconder l'oosphère ;

— *avortement très précoce* : l'embryon hybride va dégénérer très rapidement, en quelques jours. Pour que la culture d'embryons réussisse, il faut que celui-ci ait atteint au moins le stade "cœur" (7-10 jours après la fécondation selon le croisement). C'est une étape critique de la maturation de l'embryon où le développement des deux cotylédons lui donne une forme de cœur. En effet, plus l'embryon est âgé lors de sa mise en culture, plus il a de chance de continuer sa maturation normalement. A un stade plus précoce, l'embryon excisé dégénère ou se développe en cal. Dans ce dernier cas, il faudra réussir à faire régénérer le cal avec les conséquences néfastes que cela peut entraîner (variation somatique). Signalons que le sens du croisement est très important (le plus souvent) ;

— *échec des phases in vitro* : les différentes étapes depuis la collecte de l'ovule jusqu'à la reprise de l'hybride in vivo sont nombreuses et délicates. En effet, chaque type d'hybride nécessite une formule de milieu nutritif particulière, qui n'est souvent pas la moyenne des milieux nécessaires aux deux espèces parentales. Il faut donc longuement tâtonner avant de trouver chacun des milieux nécessaires ainsi que les conditions d'environnement les plus adéquates (gélifiant, température, photopériode, etc.) ;

— *non-floraison de l'hybride* : l'hybride obtenu peut être si peu vigoureux qu'il refuse de fleurir ou meurt après sa sortie du tube ;

— *stérilité de l'hybride* : c'est le cas le plus courant ; l'examen du pollen montre l'absence totale de pollen fertile. Il en est souvent de même de la fertilité femelle ;

— *échec du doublement chromosomique* : pour résoudre le problème précédent, on cherche à doubler le stock chromosomique de l'hybride pour créer un amphidiploïde, théoriquement plus fertile. Cette étape, en apparence simple, se révèle souvent très délicate car seul un traitement à la colchicine (toxique) peut être appliqué sur la plante adulte ;

— *échec du rétrocroisement* : lorsqu'on obtient, enfin, un hybride interspécifique fertile, ses caractéristiques agronomiques sont généralement peu favorables à sa sélection tel quel, et il faut le récroiser par l'espèce parentale cultivée. Cette étape n'est pas toujours facile et, surtout, la faible homologie entre les chromosomes des deux espèces va entraîner une ségrégation des caractères des deux parents due à l'absence de recombinaisons méiotiques.

• L'hypothèse de la balance numérique de l'endosperme

Cette hypothèse, décrite par PARROTT et SMITH (1986), permet, dans le cas des trèfles, de prédire la possibilité d'hybridation des espèces. Celle-ci ne pourra avoir lieu que si les balances numériques de l'endosperme (BNE) des deux espèces parentales sont égales. D'autre part, l'endosperme sera viable et pourra alimenter l'embryon si on obtient un rapport de 2 BNE femelles pour une BNE mâle.

Ceci permet d'expliquer par exemple pourquoi *T. pratense* ($2x = 14$) ne se croise avec *T. pallidum* ($2x = 16$) qu'avec la combinaison $4x \times 2x$.

• Comment vaincre la stérilité de l'hybride ?

L'hybride interspécifique est très souvent totalement stérile, d'autant plus que ses parents sont peu apparentés. Or, dans le genre *Trifolium*, même des espèces apparemment proches comme *T. pratense* et *T. diffusum* donnent des hybrides F1 stériles.

Pour résoudre ce problème qui bloque toutes possibilités de croisements ultérieurs, il y a plusieurs solutions :

— *le doublement du stock chromosomique* : comme il n'y a pas de fécondation et de formation de graines, on utilise généralement la colchicine. Le traitement in vivo est souvent très difficile, voire impossible. En effet, l'hybride peu vigoureux possède peu de méristèmes actifs et ceux-ci sont très bien protégés chez les trèfles. Cependant, le doublement in vitro par culture de méristèmes sur milieu gélosé contenant de la colchicine donne de bien meilleurs résultats (ANDERSON et al., en préparation)

et permet en même temps de multiplier l'hybride et de le conserver. D'autre part, on peut doubler les parents avant l'hybridation. Néanmoins cette autopolyploïdisation artificielle entraîne le plus souvent une faiblesse du polyploïde et des anomalies de la méiose rendant l'hybridation d'autant plus difficile. Ces techniques peuvent permettre d'obtenir un amphidiploïde partiellement fertile ;

— *le traitement mutagène durant la méiose* : la stérilité de l'hybride est généralement due à un défaut d'appariement des chromosomes à la méiose. Les génomes différents des deux parents forment peu de couples homologues, d'où formation d'univalent, de pont, etc., qui aboutissent à des gamètes stériles. On peut supposer qu'un traitement mutagène provoquant des translocations pourrait favoriser les appariements entre chromosomes parentaux ;

— *les croisements entre espèces proches* : cette méthode pourrait permettre indirectement de résoudre le problème de la stérilité de l'hybride. En effet, si les deux espèces parentales sont génétiquement proches, l'hybride F1 a plus de chance d'être partiellement fertile ou tout au moins l'amphidiploïde. Par croisement de deux hybrides F1, on peut réunir les génomes de deux espèces plus éloignées. Cette technique des "espèces ponts" est malheureusement souvent très longue et aléatoire ;

— *la multiplication des hybridations* : en effet, les résultats sur la viabilité et la stérilité des mêmes hybrides interspécifiques varient souvent d'un auteur à l'autre. Cela s'explique par la variabilité qui existe chez les espèces parentales qui forment alors des combinaisons génomiques plus ou moins viables (TAYLOR et al., 1981). On a donc tout intérêt à réaliser des croisements entre plusieurs génotypes pour chaque espèce parentale. Par exemple, sur les trois hybrides *T. ambiguum* × *T. repens* obtenus par WILLIAMS (WILLIAMS et VERRY, 1981), deux étaient totalement stériles et un partiellement fertile (23 %).

• Conclusion

Si le genre *Trifolium* est vaste, réunissant de nombreuses espèces d'intérêt agronomique, il apparaît cependant que les hybridations interspécifiques sont très difficiles dans l'ensemble. Malgré les nombreuses possibilités, il n'y a encore aucune retombée variétale de ces travaux aujourd'hui.

Mais avec les progrès continus des techniques *in vitro*, on peut raisonnablement espérer obtenir pour demain des espèces cultivées présentant des caractères de pérennité ou de résistance aux maladies provenant d'autres espèces. Le travail réalisé par plusieurs équipes sur les hybrides *T. ambiguum* × *T. repens* montre la voie.

Accepté pour publication, le 1^{er} février 1990

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANDERSON J.A., MOUSSET-DECLAS C., TAYLOR N.L., WILLIAMS E.G. : An in vitro chromosome doubling method for clovers (*Trifolium* spp.), en préparation.
- CLEVELAND R.W. (1985) : "Reproductive cycle and cytogenetics", *Clover Science and Technology*, N.L. Taylor (ed). Agronomy, 25, 7-70, Madison, Wisconsin, Etats-Unis.
- GIBSON P.G., BEINHART G. (1969) : "Hybridization of *Trifolium occidentale* with two other species of clover", *J. Hered.*, 60, 93-96.
- GILLETT J.M. (1985) : "Taxonomy and morphology", *In Clover Science and Technology*, N.L. Taylor (ed.), Agronomy, 25, 7-70, Madison, Wisconsin, Etats-Unis.
- KAZIMIERSKA E.M., KAZIMIERSKI T. (1985) : "Crossing of species in the genus *Trifolium* L.. I. *T. repens* L. × *T. montanum* L.. Fertilization and development of the embryo and endosperm", *Genetica Polonica*, 26 (3), 327-339.
- MAIZONNIER D. (1972) : "Obtention d'hybrides entre quatre espèces pérennes du genre *Trifolium*", *Ann. Amélior. Plantes*, 22 (4), 375-387.
- MERKER A. (1984) : "Hybrids between *Trifolium medium* and *Trifolium pratense*", *Hereditas*, 101, 267-268.
- PARROTT W.A., SMITH R.R. (1986) : "Evidence for the existence of endosperm balance number in the true clovers (*Trifolium* spp.)", *Can J. Genet. Cytol.*, 28, 581-586.
- PHILLIPS G.C., COLLINS G.B., TAYLOR N.L. (1982) : "Interspecific hybridization of red clover (*Trifolium pratense* L.) with *T. sarosiense* Hazsl. using in vitro embryo rescue", *Theor. Appl. Genet.*, 62, 17-24.
- QUESENBERRY K.H., TAYLOR N.L. (1976) : "Interspecific hybridization in *Trifolium* L., sect. *Trifolium* Zoh. I. Diploid hybrids among *T. alpestre* L., *T. rubens* L., *T. heldreichianum* Hausskn., and *T. noricum* Wulf.", *Crop Science*, 16, 382-386.
- QUESENBERRY K.H., TAYLOR N.L. (1977) : "Interspecific hybridization in *Trifolium* L. sect. *Trifolium* Zoh. II. Fertile polyploid hybrids between *T. medium* and *T. sarosiense* Hazsl.", *Crop Science*, 17, 141-145.
- QUESENBERRY K.H., TAYLOR N.L. (1978) : "Interspecific hybridization in *Trifolium* L. section *Trifolium* Zoh. III. Partially fertile hybrids of *T. sarosiense* Hazsl. × 4x *T. alpestre* L.", *Crop Science*, 18, 551-556.
- RUPERT E.A., EVANS P.T. (1980) : "Embryo development after interspecific cross-pollinations among species of *Trifolium*, section *Lotoidea*", *Am. Soc. Agron. Abstr.*, 68.
- TAYLOR N.L. (1985) : "Creating and utilizing variation in grasses and legumes via intra- and interspecific hybridization", *Eucarpia, report meeting of the fodder crops section*, Svalöv, Suède, 16-19 sept 1985, 85-93.
- TAYLOR N.L., COLLINS G.B., CORNELIUS P.L., PITCOCK J. (1981) : "Differential interspecific compatibilities among genotypes of *Trifolium sarosiense* and *T. pratense*", *Proc. XIV Int. Grassland Congress*, Lexington, Kentucky, Etats-Unis, 15-24 juin, 165-168.
- WEXELSEN H. (1928) : "Chromosome numbers and morphology in *Trifolium*", *Univ. Calif. Publ. Agric. Sci.*, 2, 355-376.

- WILLIAMS E. (1978) : "A hybrid between *Trifolium repens* and *T. ambiguum* obtained with the aid of embryo culture", *New Zealand J. of Botany*, 16, 499-506.
- WILLIAMS E.G. (1987) : "Interspecific hybridization in pasture legumes", *Plant Breeding Reviews*, 5, 237-305.
- WILLIAMS E., DELAUTOUR G. (1980) : "The use of embryo culture with transplanted nurse endosperm for the production of interspecific hybrids in pasture legumes", *Bot. Gaz.*, 141, 252-257.
- WILLIAMS E., VERRY I.M. (1981) : "A partially fertile hybrid between *Trifolium repens* and *T. ambiguum*", *New Zealand J. of Botany*, 19, 1-7.
- WILLIAMS E.G., VERRY I.M., WILLIAMS W.M. (1982) : "Use of embryo culture in interspecific hybridization", *In Plant Improvement and Somatic Cell Genetics*, Vasil I.K., Scowcroft W.R., Frey K.J. (eds), Academic Press, New York, 119-128.
- YAMADA T., FUKUOKA H. (1986) : "Production of interspecific hybrids between *Trifolium ambiguum* M. Bieb and *T. repens* L. by ovule culture", *Japan J. Breed.*, 36 (3), 233-239.
- ZOHARY M., HELLER D. (1984) : *The genus Trifolium*, The Israel Academy of Sciences and Humanities, Jérusalem, Israël, 606 p.

RÉSUMÉ

Le genre *Trifolium* regroupe environ 250 espèces dont une vingtaine présente un intérêt agronomique, en particulier le trèfle blanc (*T. repens*) et le trèfle violet (*T. pratense*). Beaucoup d'équipes ont cherché à réaliser des hybrides entre espèces de trèfles soit pour introduire dans une espèce cultivée des caractères présents dans une autre espèce, soit pour faire des études phylogéniques.

Actuellement, 62 hybrides de trèfles sont recensés concernant 10% des espèces de *Trifolium* ; généralement des techniques de culture in vitro, telles que le sauvetage d'embryon, ont été utilisées mais très souvent l'hybride est stérile. Différentes méthodes peuvent résoudre cette difficulté notamment la création d'un amphidiploïde. Cependant aucune retombée de ces travaux ne se retrouve aujourd'hui dans une variété cultivée, bien que les nombreuses recherches entreprises sur les hybrides *T. ambiguum* × *T. repens* soient prometteuses.

SUMMARY

Bibliographic review on interspecific hybridization in clovers

Trifolium is a genus including some 250 species. About 20 of them have been considered agriculturally significant, specially white clover (*T. repens*) and red clover (*T. pratense*). Many research teams have made attempts of hybridization between clover species, to introduce interesting traits from wild species to cultivated species. Approximately 60 hybrids have been made with 10% of the *Trifolium* species. Usually, in vitro technique such as embryo rescue are used but hybrids are generally sterile. Different methods can overcome this difficulty, particularly the use of an amphidiploid. Presently, no fallout of these works can be found in a cultivar, However, the numerous works of research on the *T. ambiguum* × *T. repens* hybrids seem to be promising.