

ARBEITSSITZUNG / WORKING SESSION / SEANCE DE TRAVAIL

I. ZÜCHTUNG / BREEDING / SELECTION

SELECTION D'UNE VARIETE DE COLZA SANS
ACIDE ERUCIQUE ET SANS GLUCOSINOLATES

J. Morice

Les recherches en vue d'améliorer, par la sélection, la qualité du colza ont débuté en France, à la Station d'Amélioration des Plantes de Versailles en 1966. A cette époque, il apparaissait que l'acide érucique pouvait être tenu pour responsable de la plus grande partie des effets physiopathologiques provoqués par l'huile de colza sur plusieurs espèces animales. Dès 1961, les chercheurs canadiens (STEFANSON, HOUGEN et DOWNEY, 1961) avaient isolé, dans la variété de colza de printemps fourrager LIHO, des plantes donnant une huile sans acide érucique. Cette découverte a été à l'origine des variétés canadiennes de colza de printemps de type CANBERA et a fourni un géniteur aux sélectionneurs européens. Nous avons effectué les premiers croisements avec ce géniteur en 1966. Les études génétiques nous ont conduit à entreprendre une sélection par rétrocroisements successifs.

Les travaux pour l'élimination des glucosinolates goitrigènes contenus normalement dans la graine de colza ont été abordées plus tard. Après quelques études préliminaires, les premiers croisements utilisant comme géniteur le colza polonais BRONOWSKI ont été réalisés en 1969 après que les analyses faites en Suède et au Canada eurent révélé que cette variété ne contenait que des traces de glucosinolates (DOWNEY, CRAIG et YOUNGS 1969). Pour ce programme, bien que le déterminisme génétique de la teneur en glucosinolates soit plus complexe que celui de l'acide érucique, nous avons été amenés à travailler aussi par rétrocroisements.

L'ensemble des recherches conduites dans le domaine de la qualité de l'huile et du tourteau a pris une place de plus en plus importante dans les programmes de sélection du colza. Cependant, les objectifs classiques (rendement, résistance aux maladies, résistance au froid, résistance à la verse, précocité ...) ont continué à faire l'objet, en France, des travaux importants aussi bien dans le secteur de la sélection privée que dans celui de la recherche officielle.

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel végétal

Le travail a porté essentiellement sur le colza d'hiver qui représente en France 90 pour cent des surfaces cultivées en Colza. Plusieurs lignées normales ont été croisées avec les géniteurs de qualité mais l'effort de sé-

lection a porté principalement sur les croisements faits avec la variété MAJOR que les résultats de l'expérimentation classent régulièrement en tête des variétés françaises de colza d'hiver (Tableau 1). Il s'agit d'une variété - lignée pure obtenue par sélection généalogique à partir d'un croisement OLEOR x (ALSACE x HAMBOURG) suivi d'autofécondations sous sachets jusqu'à la F7. Elle est assez précoce, de hauteur moyenne, résistante à la verse et résistante à la maladie causée par le Phoma lingam.

Tableau 1: Rendements moyens (en % du Témoin SAREPTA) des variétés MAJOR, TITUS, MARCUS, RAMSES dans les essais comparatifs de 1969 à 1973 - (Essais I. N. R. A. et C. E. T. I. O. M.)

Année	Nombre d'essais	MAJOR	RAMSES	MARCUS	TITUS	SAREPTA
1968-69	21	119,0	107,4	98,6	95,4	100 = 21,6 Qx/ha
1969-70	11	128,5	114,3	109,0	110,3	100 = 21,9 Qx/ha
1970-71	59	121,2	107,5	108,6	102,5	100 = 23,1 Qx/ha
1971-72	74	121,3	106,1	109,3	110,6	100 = 23,7 Qx/ha
1972-73	45	115,4	105,8			100 = 22,3 Qx/ha
Moyenne		121,2	108,2	106,4	104,7	

Le colza de type CANBRA employé comme géniteur sans acide érucique nous a été fourni par DOWNEY en 1965.

Possédant depuis quelques années la variété BRONOWSKI dans nos collections, nous en avons tiré par autofécondations plusieurs lignées assez différentes par la précocité et différents caractères morphologiques. Elles avaient toutes en commun une coloration fortement authocyanée des feuilles et tiges. L'analyse a montré qu'elles avaient aussi toutes des teneurs très faibles en glucosinolates. Cependant il apparaît certaines différences dans les teneurs en isothiocyanates et en thiooxazolidones et nous avons retenu comme géniteurs les lignées contenant les traces les plus faibles de ces composés soufrés.

1. 2. Méthodes d'analyses chimiques

1. 2. 1. Analyse des acides gras: la plupart des analyses

La plupart des analyses d'acides gras réalisées pour les études génétiques et pour la sélection sont des analyses portant sur un cotylédon (DOWNEY et HARVEY, 1963). Le cotylédon est prélevé sur des graines ayant subi une imbibition de quelques heures pour en faciliter la dissection.

L'extraction de l'huile et l'estérification en esters méthyliques d'acides gras se font actuellement selon la méthode rapide de THIES (1971).

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse est effectuée sur deux

types d'appareils: AEROGRAPH 1200 et GIRDEL 75 à double colonne. Lorsque l'on souhaite une certaine précision des analyses, on utilise des colonnes en Inox de 3 mètres de long et de 1/8 de pouce de diamètre. Les phases stationnaires sont du B.D.S. ou du REOPLEX 400 à 12 % sur du Chromosorb W 60-80 Mesh. La température du four est de 195°, celles de l'injecteur et du détecteur respectivement de 260° et 240°. Les débits d'azote et d'hydrogène sont respectivement de 30 ml et de 20 ml par minute. L'intégration des pics est faite soit par triangulation, soit par intégrateur à disque, soit par un intégrateur électronique INFOTRONICS type CRS 104. Les enregistreurs sont de deux types: HONEYWELL ou SERVO RITER 11.

Pour les analyses rapides, destinées à trier simplement les graines sans acide érucique, on emploie des colonnes courtes (1 mètre de longueur) remplies de BDS à 8 %. Les températures sont plus élevées: four 210°, injecteur 280°; détecteur 260°. Dans ce cas, les pics ne sont pas calculés. La sélection se fait par simple examen des chromatogrammes.

1. 2. 2. Analyse des glucosinolates

L'analyse des glucosinolates sur graines porte sur des échantillons de 50 mg de tourteau déshuilé à l'éther de pétrole. La méthode employée a été adaptée de celle décrite par YOUNGS et WETTER (1967). L'hydrolyse et l'extraction des produits d'hydrolyse se font par la myrosinase à pH7 dans du dichlorométhane contenant 80 mg par litre d'un standard interne: le butyl-isothiocyanate.

Les isothiocyanates s'analysent par chromatographie en phase gazeuse, sur le même matériel que les acides gras avec des colonnes de 3 mètres remplies de BDS à 12 % sur du Chromosorb W. Les températures employées sont de 100° pour le four, 140° pour l'injecteur et pour le détecteur.

Les thiooxazolidones se dosent, après cyclisation dans l'éthanol pur par spectro-photométrie dans l'Ultra Violet (Densité optique à l'absorption maximum à 243 nanomètres corrigée d'après une ligne de base tracée entre les densités optiques à 280 et 200 nanomètres). Ces analyses se font avec un spectrophotomètre BECKMAN DB.GT. associé à un enregistreur BECKMAN.

Pour un tri des plantes avant la floraison, on est amené à effectuer des dosages de glucosinolates sur des organes verts et en particulier sur des boutons floraux. L'analyse se fait suivant une méthode indiquée par KRZYMANSKI. L'extraction est effectuée avec du méthanol bouillant à reflux. L'extrait sec obtenu après évaporation du méthanol est ensuite repris par de l'eau distillée et du dichlorométhane. Après centrifugation, la phase aqueuse est reprise, filtrée et est ensuite hydrolysée suivant une technique identique à celle employée pour les graines. Les dosages en spectrophotométrie et en chromatographie en phase gazeuse se font aussi de la même façon que pour les graines.

1.3. Méthodes d'accélération des générations

Les plantes de colza d'hiver conservées pour la sélection, après les analyses chimiques, sont cultivées en serre jusqu'au stade 6-8 feuilles. Elles sont alors vernalisées en chambres froides, à une température de 7-8°C, avec un éclairage de 12 heures, pendant 7 semaines. Elles sont ensuite placées en serre en jour long -(photopériode de 16 heures). De cette façon, il est possible de faire deux générations de sélection par an.

2. Sélection d'une variété sans acide érucique

2.1. Comportement génétique de la teneur en acide érucique

L'étude des descendance de plusieurs croisements entre lignées de colza normal et CANBRA a confirmé les résultats des travaux étrangers, et vérifié les hypothèses avancées pour les expliquer (HARVEY et DOWNEY, 1964; DORRELL et DOWNEY, 1964; LÖÖF et APPELQVIST, 1964; KRZYMANSKY et DOWNEY, 1969).

- la composition de l'huile de la graine, notamment le taux d'acide érucique, dépend du génotype de l'embryon et non de celui de la plante.
- deux gènes majeurs interviennent dans le déterminisme héréditaire de la teneur en acide érucique qui apparait proportionnelle au nombre d'allèles normaux présents dans le génotype.

Par exemple, l'analyse individuelle de 80 graines F₂ d'un croisement OLEOR x CANBRA (graines récoltées sur les plantes F₁) permet, malgré une fluctuation importante dans chaque catégorie, de faire cinq classes qui correspondent aux cinq groupes de génotypes possibles présentant de 0 à 4 allèles normaux (Tableau 2).

Tableau 2: Repartition des teneurs en acide érucique dans la F₂ d'un croisement OLEOR x CANBRA
(Hypothèse de deux gènes: OLEOR = E1E1E2E2, CANBRA = e1e1e2e2)

Teneur en acide érucique	Effectif observé	Nombre d'allèles normaux (E)	Effectif théorique
0 %	7	0 E	5
8 à 16 %	21	1 E	20
18 à 27 %	29	2 E	30
31 à 38 %	19	3 E	20
42 à 47 %	4	4 E	5

$\chi^2 = 1,13$ Probabilité : 0,50 - 0,90

Si l'on considère seulement l'acide érucique, tout se passe comme si l'on était en présence de deux gènes ne présentant pas de dominance, l'hétérozygote se trouvant environ au niveau de la moyenne des deux parents.

Par contre, pour l'acide eicosénoïque, la situation paraît fortement différente. En effet, l'hétérozygote présente une teneur supérieure à celle du colza normal. Ceci a déjà été signalé et expliqué soit par une dominance de caractère teneur élevée en acide eicosénoïque (KONDRA et STEFANSSON, 1965) soit par une étape limitante dans l'allongement de la chaîne carbonée au niveau de la transformation de l'acide eicosénoïque en acide érucique (APPELQVIST 1969).

Dans le cas de la F₂ OLEOR x CANBRA, on peut calculer, pour les différents génotypes, les pourcentages moyens d'acide oléique (C 18 : 1), d'acide eicosénoïque (C 20 : 1) et d'acide érucique (C 22 : 1). Ceux-ci sont indiqués dans le tableau 3.

Tableau 3: Pourcentages moyens d'acide oléique, d'acide eicosénoïque et d'acide érucique dans les différents génotypes de la F₂ OLEOR x CANBRA

Nombre d'allèles normaux	C 18 : 1	C 20 : 1	C 22 : 1	C 18 : 1	C 18 : 1 +
				+C 20 : 1	C 20 : 1 +C 22 : 1
0 E	53,2	0	0	53,2	53,2
1 E	31,6	15,2	13,1	28,3	59,9
2 E	23,9	15,5	23,2	38,7	62,6
3 E	19,6	13,9	32,3	46,2	65,8
4 E	16,3	11,0	44,0	55,0	71,3

Dans les deux étapes d'allongement de la chaîne carbonée, les taux de transformation qui chiffrent l'efficacité des réactions de cette voie de biosynthèse sont donnés par le rapport:

$$\frac{C\ 20 : 1 + C\ 22 : 1}{C\ 18 : 1 + C\ 20 : 1 + C\ 22 : 1}$$

pour le passage de l'acide oléique à l'acide eicosénoïque et par le rapport

$\frac{C\ 22 : 1}{C\ 20 : 1 + C\ 22 : 1}$ pour le passage de l'acide eicosénoïque à l'acide érucique. Ces taux calculés pour la F₂ OLEOR x CANBRA figurent dans le tableau 4.

Cette présentation des résultats permet de tirer des conclusions plus précises que par le simple examen de la teneur en acide érucique:

Les deux coefficients calculés pour chaque génotype sont toujours pratiquement identiques. Les mutations affectant la biosynthèse des acides gras à longue chaîne qui ont été sélectionnées dans CANBRA interviennent vraisemblablement sur un enzyme commun aux deux

Tableau 4: Taux de transformation des acides gras monoinsaturés dans l'allongement de la chaîne carbonée (F₂ OLEOR x CANBRA)

Génotype	C 18 : 1 → C 20 : 1	C 20 : 1 → C 22 : 1	Moyenne
0 E	0	0	0
1 E	0,473	0,463	0,468
2 E	0,618	0,599	0,608
3 E	0,702	0,699	0,700
4 E	0,771	0,800	0,785

étapes de l'allongement de la chaîne carbonée.

- Il y a une dominance assez nette des allèles normaux au niveau de l'activité enzymatique puisque l'hétérozygote présente un taux de transformation de 0,608 alors que chez l'homozygote normal, il est de 0,785.

L'impression d'hérédité intermédiaire tirée des teneurs en acide érucique est due au fait que par cet acide gras on juge l'étape finale dans laquelle intervient le carré de l'activité enzymatique.

2.2. Méthode de sélection employée

Dans un croisement réalisé pour sélectionner une variété de colza d'hiver sans acide érucique, les deux partenaires jouent sur le plan génétique un rôle très différent. La lignée de colza d'hiver apporte un ensemble considérable de caractères physiologiques et agronomiques accumulés par plusieurs cycles de sélection. Le géniteur canadien est un colza de printemps qui, dans nos conditions, est sensible au froid, à la verse, au Phoma lingam. Il donne des rendements assez faibles et sa teneur en huile est basse. Il ne peut apporter que les deux gènes récessifs qui empêchent la formation des acides gras à longue chaîne.

La probabilité de retrouver par sélection généalogique, dans une lignée sans acide érucique issue du croisement, l'ensemble des caractéristiques intéressantes du colza d'hiver est pratiquement nulle. Il apparaît donc que la sélection à partir du croisement initial doit procéder par rétrocroisements par le colza d'hiver.

Le Tableau 5 présente le schéma de sélection employé. Après un croisement entre OLEOR et CANBRA et un premier recroisement par une lignée issue d'un croisement OLEOR x SAREPTA, la variété MAJOR a été employée comme parent récurrent. Ce programme a été conduit en serres en générations accélérées par rétrocroisements successifs sans alterner de générations de sélection.

Après chaque rétrocroisement, une sélection des graines hétérozygotes

Tableau 5: Schéma de sélection de la variété PRIMOR

Types de plantes et générations	Gènes conditionnant la teneur en acide érucique	Moyenne des gènes conditionnant les autres caractéristiques des plantes
Colza canadien CANBRA	$e_1 e_1 e_2 e_2$ (0 % C 22 : 1)	100 % printemps canadien C
Colza d'hiver OLEOR	$E_1 E_1 E_2 E_2$ (45 à 50 % C 22 : 1)	100 % Hiver H
F ₁ CANBRA x OLEOR	$E_1 e_1 E_2 e_2$ (25 à 30 % C 22 : 1)	50 % C, 50 % H
1 ^{er} rétrocroisement R ₁ (C x O) x lignée d'hiver	$1/4 E_1 E_1 E_2 E_2$ (45 à 50 % C 22 : 1) $1/4 E_1 e_1 E_2 e_2$ (35 à 40 % C 22 : 1) $1/4 E_1 E_1 E_2 e_2$ (35 à 40 % C 22 : 1) $1/4 E_1 e_1 E_2 e_2$ (22 à 30 % C 22 : 1)	25 % C 75 % H
2 ^e rétrocroisement (R ₂) Plante $E_1 e_1 E_2 e_2$ du R ₁ x MAJOR	mêmes combinaisons que pour R ₁	12,5 M C 87,5 % H dont 50 % MAJOR (M)
3 ^e au 7 ^e rétrocroisement comme pour R ₃ Plante $E_1 e_1 E_2 e_2$ x MAJOR	mêmes combinaisons	Pour R ₇ : 0,4 % C 99,6 % H dont 97,4 % M
Autofécondation des plantes $E_1 e_1 E_2 e_2$ du R ₇	$1/16 e_1 e_1 e_2 e_2$ (0 % C 22 : 1) = PRIMOR	comme R ₇ : 97,4 % M

pour les deux gènes intervenant dans la synthèse de l'acide érucique est opérée par des analyses de cotylédons. Seules sont retenues les graines auxquelles les teneurs en acide érucique plus faibles permettent d'attribuer le génotype recherché ($E_1e_1E_2e_2$). Théoriquement, cette catégorie doit représenter le quart de l'effectif total. Mais pour les graines produites dans des conditions particulières, sous sachets en papier, la fluctuation des teneurs individuelles en acide érucique est assez importante. Les teneurs sont aussi dans l'ensemble un peu plus élevées que pour des graines ayant mûri dans des conditions normales. On ne retient que les graines qui se classent nettement dans le groupe aux teneurs les plus faibles (22 à 28 % d'acide érucique en général).

Les plantes provenant de cette sélection (une vingtaine à chaque génération) font l'objet à leur tour du rétrocroisement suivant et elles sont autofécondées.

Les autofécondations servent à vérifier que l'on a bien conservé les deux gènes intéressants du géniteur canadien, sous la forme hétérozygote, dans les plantes sélectionnées. Les graines provenant des autofécondations sont analysées individuellement et l'on doit y retrouver des graines sans acide érucique. Ce contrôle effectué systématiquement à toutes les générations de rétrocroisements a montré qu'une certaine rigueur dans la sélection des hétérozygotes, en évitant de prendre des graines douteuses, limite considérablement les risques d'erreur. Au cours de tout ce programme, on a trouvé très peu de plantes qui, dans leurs autofécondations, ne donnaient pas de graines sans acide érucique: 2 plantes sur 20 au maximum par génération. Le produit du rétrocroisement de telles plantes est évidemment éliminé.

L'étape finale de la sélection consiste à autoféconder les plantes hétérozygotes provenant du dernier rétrocroisement. Ces plantes ont alors retrouvé l'ensemble du génotype et des caractéristiques du parent récurrent. La sélection de graines sans acide érucique issues de ces autofécondations fournit la forme sans acide érucique de la variété récurrente.

Dans cette méthode, la sélection ne porte que sur la composition de l'huile. Il s'agit uniquement d'éviter de perdre les deux gènes de CANBRA en les maintenant au cours des générations à l'état hétérozygote.

Il n'y a aucune sélection pour les caractéristiques agronomiques. Il est donc possible de conduire tout le programme en conditions artificielles, sans avoir à s'appuyer sur le lourd travail d'expérimentation que nécessite la création de variétés par sélection généalogique.

2.3. Résultats obtenus

A la Conférence Internationale sur le Colza qui s'est tenue au Canada en 1970, une importance particulière avait été accordée aux problèmes nutri-

tionnels posés par les acides gras à longue chaîne de l'huile de colza, et l'on avait particulièrement insisté sur les conséquences au niveau du muscle cardiaque. Bien que tous les chercheurs ne soient pas entièrement d'accord sur la part de responsabilités qui, dans ces effets physiopathologiques, revient aux monoènes à longue chaîne, il a semblé alors nécessaire d'accélérer la sortie d'une variété sans acide érucique et sans acide eicosénoïque.

Par la technique de l'analyse de cotylédons, 200 plantes sans acide érucique ont été sélectionnées à partir de 3.500 graines provenant de l'autofécondation de plantes hétérozygotes issues des rétrocroisements par MAJOR. Une multiplication intensive des 4 Kg de graines récoltées sur ces plantes en 1971 a fourni 4 tonnes de semences de base en 1972 et 2.200 tonnes de semences certifiées en 1973.

Parallèlement à la multiplication, une expérimentation était mise en place. Elle permettait de vérifier que les caractéristiques agronomiques de la nouvelle variété étaient très voisines de celles de MAJOR (Tableau 6) et conduisait à son inscription au Catalogue français des variétés sous le nom de PRIMOR. Son rendement n'est pas significativement différent de celui de MAJOR. Sa teneur en huile est légèrement inférieure (environ 1,5 %).

Tableau 6: Rendements comparés (en q x/ha) de MAJOR et PRIMOR en essais comparatifs (I. N. R. A. et C. E. T. I. O. M.)

La variété PRIMOR représentera environ les trois quarts de la récolte française de colza d'hiver de 1974.

Années		MAJOR	PRIMOR
1972	4 essais	26,2	25,0
1973	12 essais	24,15	24,05

La composition de son huile montre que la disparition de l'acide érucique et de l'acide eicosénoïque n'a entraîné qu'une très légère augmentation de la teneur en acide linoléique (Tableau 7).

Tableau 7: Pourcentages des acides gras dans les huiles de PRIMOR et de MAJOR (Récolte 1972)

Acides gras	MAJOR	PRIMOR
C 16 : 0 Ac. palmitique	3,5	4,5
C 16 : 1 Ac. palmitoléique	0,4	0,6
C 18 : 0 Ac. stéarique	1,2	1,5
C 18 : 1 Ac. oléique	14,2	60,5
C 18 : 2 Ac. linoléique	13,8	21,5
C 18 : 3 Ac. linoléinique	9,1	10,3
C 20 : 1 Ac. eicosénoïque	10,9	0,9
C 22 : 1 Ac. érucique	46,9	0,2

3. Sélection d'une variété sans glucosinolates

3. 1. Comportement génétique de la teneur en glucosinolates

Les études génétiques effectuées sur la descendance de plusieurs croisements entre BRONOWSKI, variété polonaise ne contenant que des traces de glucosinolates, et plusieurs lignées de colza d'hiver et de printemps ont d'abord confirmé que la teneur en glucosinolates des graines dépendait du génotype de la plante, qui les porte et non pas comme pour l'acide érucique de génotype de l'embryon. Ceci apparaît nettement, par exemple, pour les graines provenant des croisements réciproques entre BRONOWSKI et une lignée de colza de printemps (P5-521). Le tableau 8 donne les résultats d'analyse exprimés en mg par g. de matière sèche pour les butényl et pentényl isothiocyanates (I. T. C.) et la vinyl-L-thiooxazolidone (V. T. O.).

Tableau 8:

	Butényl I. T. C.	Pentényl I. T. C.	Total I. T. C.	V. T. O.	Total I.T.C. + V. T. O.
BRONOWSKI	traces	traces	traces	0,93	0,93
P5-521	1,96	0,48	2,44	5,68	8,12
BRONOWSKI (femelle) x P5-521	traces	traces	traces	0,88	0,88
P5-521 (femelle) x BRONOWSKI	1,67	0,55	2,22	7,77	9,99
Plantes F ₁ P5-521 x BRONOWSKI	1,21	0,44	1,44	3,22	4,66

Les plantes F₁ donnent des graines, qui présentent des teneurs en I. T. C. et V. T. O. intermédiaires entre celles des parents (tableau 8): la teneur totale est de 4,66 mg par g. pour la F₁ et de 4,52 pour la moyenne des parents.

L'étude des F₂ de deux croisements, BRONOWSKI x P5-521 et BRONOWSKI x MAJOR fait apparaître la difficulté de faire des classes pour les teneurs en glucosinolates dans les distributions observées. Cependant, un petit groupe de plantes présentant, comme BRONOWSKI, des teneurs très faibles (inférieures à 1,25 mg par g. pour le total I. T. C. + V. T. O.) se détache assez nettement du reste de la distribution qui montre une variation continue (2,5 à 11,5 mg par g. pour la F₂ BRONOWSKI x P5-521 et 2,2 à 14,2 mg par g. pour la F₂ BRONOWSKI x MAJOR). Ce type de distribution ne signifie pas obligatoirement que l'on soit en présence d'un caractère à hérédité quantitative. La fluctuation des teneurs individuelles et les erreurs d'analyses, étant de même ordre que les différences entre génotypes, peuvent masquer les action géniques élémentaires.

Si l'on considère la proportion de plantes de type BRONOWSKI dans les F₂,

on en trouve 5 sur 242 plantes analysées pour le croisement par la lignée P5-521 et 6 sur 432 plantes pour le croisement par la variété MAJOR soit un total de 11 plantes à très faibles teneurs sur 674 plantes étudiées. Cette proportion peut s'expliquer par l'intervention de trois gènes majeurs dans le caractère présence ou absence de glucosinolates. Dans les génotypes permettant la synthèse des glucosinolates, il est possible qu'une hérédité quantitative vienne se surajouter à l'action de ces trois gènes.

Les conclusions que l'on peut tirer des études génétiques concordent dans l'ensemble avec celles de KONDRÁ et STEFANSSON (1970), KRZYMANSKI (1970) et LEIN (1972) et permettent d'établir une méthode de sélection dont le but est, comme pour l'acide érucique avec CANBERA, de transférer les gènes intéressants de BRONOWSKI dans le génotype de bonnes variétés de colza.

3.2. Méthode de sélection

3.2.1. Difficultés génétiques

La méthode de sélection la plus séduisante par sa rapidité et par son efficacité pour obtenir une variété sans glucosinolates et intéressante du point de vue agronomique est certainement, dans ce cas aussi, celle des rétrocroisements. En effet, on ne demande au géniteur BRONOWSKI que d'apporter le caractère "absence de glucosinolates".

Mais la situation est plus complexe que pour l'acide érucique:

- il y a au moins trois gènes en jeu;
- il est difficile de distinguer les génotypes et notamment le génotype hétérozygote que l'on doit retenir à chaque génération de rétrocroisement;
- on ne peut sélectionner d'après la teneur de l'embryon; la connaissance du phénotype de la plante repose sur l'analyse des graines qu'elle produit.

On peut donc envisager pour des raisons de sécurité, de conduire la sélection en faisant alterner les générations de rétrocroisements et les générations de sélection de plantes sans glucosinolates. Mais on allonge ainsi considérablement le temps nécessaire à l'obtention de la variété recherchée. Nous avons donc tenté d'opérer la sélection par rétrocroisements successifs en utilisant notamment comme parent récurrent la variété MAJOR.

3.2.2. Sélection des plantes hétérozygotes

Parmi les plantes provenant d'un rétrocroisement par une lignée possédant les allèles normaux, il faut sélectionner comme géniteurs du rétrocroise-

ment suivant celles qui sont hétérozygotes pour tous les gènes en cause dans le déterminisme des glucosinolates. Si l'on admet l'hypothèse de trois gènes, seuls nous intéressent les génotypes $G_1g_1 G_2g_2 G_3g_3$.

L'analyse des graines récoltées sur les plantes provenant de rétrocroisements montre une variation continue des teneurs en glucosinolates (4 à 15 mg par g. pour le total I. T. C. + V. T. O. dans les rétrocroisements avec MAJOR). On peut admettre que les hétérozygotes se retrouvent parmi les plantes qui ont les teneurs les plus faibles. En effet, les plantes F_1 des croisements BRONOWSKI x MAJOR ont des teneurs individuelles qui varient entre 4 et 6 mg par g. Pratiquement, la sélection est effectuée d'après les résultats des analyses des graines des premières siliques formées sur la plante. L'échantillon est pris sur la tige principale dans des siliques prélevés cinq semaines après la floraison. A cet âge, les graines qui contiennent 20 à 25 pour cent de matière sèche ont pratiquement atteint un teneur en glucosinolates par rapport à la matière sèche voisine de celles des graines mures. Les plantes qui présentent les teneurs les plus faibles, c'est-à-dire de l'ordre de celles des plantes F_1 (BRONOWSKI x MAJOR) utilisées comme témoins dans cette sélection, sont retenues pour être croisées par le parent récurrent MAJOR. Elles sont rabattues; on coupe les ramifications déjà fleuries pour provoquer le démarrage des ramifications inférieures sur lesquelles on procède aux hybridations.

Pour éviter d'avoir à réaliser de très nombreuses analyses en un temps réduit, nous avons recherché un critère de sélection plus précoce que l'analyse des premières graines.

L'étude des organes végétatifs, tiges, feuilles et mêmes racines, n'a pas donné de résultats intéressants. Les faibles teneurs en glucosinolates de ces organes jointes à certaines difficultés analytiques font qu'il n'y a pas de corrélation avec la teneur des graines.

Par contre, les boutons floraux présentent des teneurs en glucosinolates assez élevées et très voisines de celles des graines. Les analyses portent sur 500 mg de matière sèche (à 17 - 20 pour cent de matière sèche) et permettent de faire une présélection par élimination des plantes nettement plus riches en glucosinolates que les témoins hétérozygotes F_1 .

3.2.3. Vérification de l'hétérozygotie des plantes sélectionnées

Malgré cette sélection de plantes en plusieurs étapes, boutons floraux et graines immatures âgées de cinq semaines suivies d'une vérification par analyse des graines mûres, il est très possible pour un tel caractère que des erreurs se produisent dans l'appréciation du génotype par les teneurs.

Ces erreurs sont de deux types:

- des plantes hétérozygotes pour les trois gènes ($G_1g_1 G_2g_2 G_3g_3$) présentant pour des raisons diverses (fluctuation, gènes modifia-

teurs, erreurs d'analyse) des teneurs plus élevées sont rejetées.

- des plantes classées dans les plus faibles teneurs ne sont pas hétérozygotes pour les trois gènes mais pour les mêmes raisons que précédemment, il s'agit de plantes hétérozygotes pour seulement deux gènes qui se trouvent déplacés vers les faibles teneurs.

Ce deuxième risque d'erreur est beaucoup plus dangereux puisqu'il risque de conduire à une perte de gènes donc à l'impossibilité de sélectionner par la suite des plantes sans glucosinolates.

Les plantes supposées hétérozygotes font l'objet en plus du recroisement par MAJOR d'un croisement par BRONOWSKI ("test cross").

Dans les descendance de ce "test cross" on doit retrouver, si les plantes sélectionnées étaient réellement hétérozygotes, une certaine proportion de plantes dépourvues de glucosinolates (1 sur 8 si l'on a trois gènes).

Du fait de la dominance du caractère "Printemps" sur le caractère "Hiver", et de la précocité de floraison de la F_1 , les plantes provenant du "test cross" fleurissent et forment leurs graines avant celles qui proviennent du rétrocroisement par une variété de colza d'hiver. Ceci permet d'éliminer assez rapidement, avant leur floraison, les familles de rétrocroisements provenant de plantes douteuses.

En 1974 par exemple, dans le produit du troisième rétrocroisement par MAJOR, une descendance sur quatre a été éliminée parce qu'on n'a pas retrouvé de plantes sans glucosinolates dans le "test cross". Pour les trois autres, au contraire, on a pu vérifier que les géniteurs employés étaient réellement hétérozygotes.

L'ensemble des opérations de sélection à chaque génération de rétrocroisement est schématisé dans le tableau 9.

3.3. Etat actuel de la sélection - Perspectives

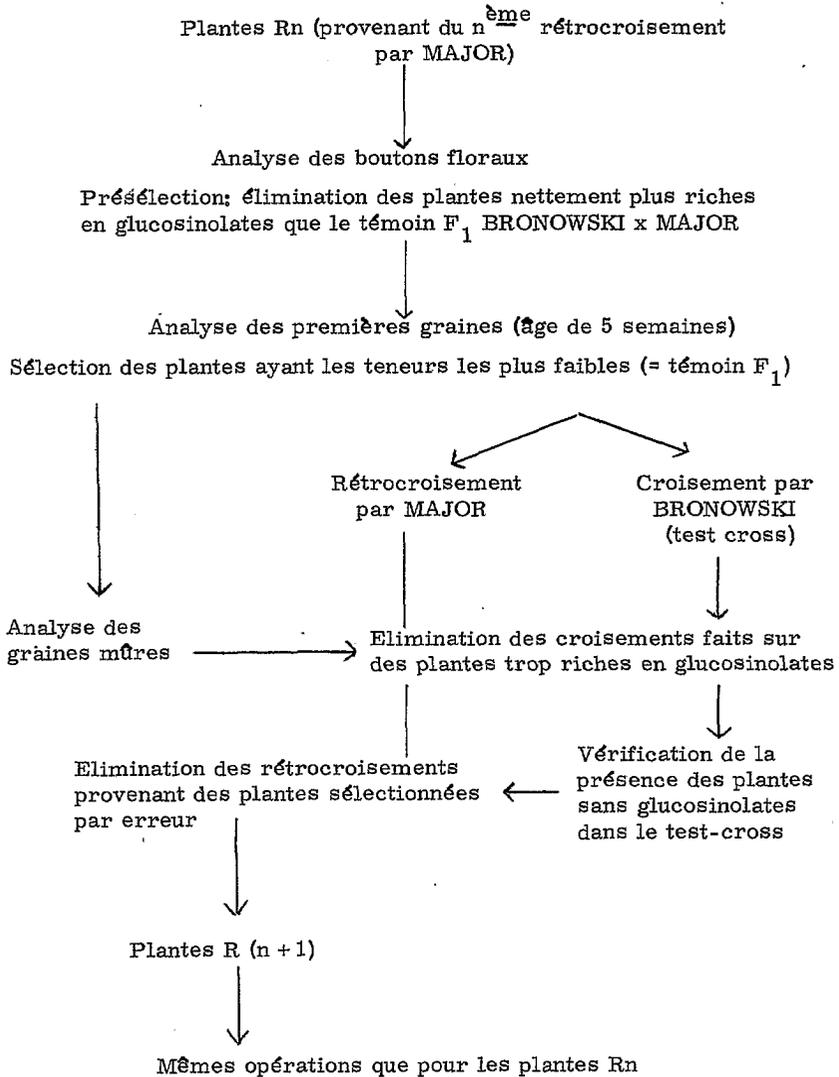
Le programme de sélection est actuellement au quatrième rétrocroisement par MAJOR et l'étude des "test cross" nous révèle que nous avons bien conservé à l'état hétérozygote les gènes de BRONOWSKI.

Pour les deux derniers rétrocroisements, on utilisera aussi PRIMOR comme parent récurrent.

Il sera possible de sélectionner des génotypes variés pour les gènes de qualité de l'huile (acide érucique) et du tourteau (glucosinolates) dans le même contexte génétique pour les autres caractéristiques:

- une forme normale, MAJOR;
- une forme sans acide érucique, PRIMOR;
- une forme sans glucosinolates à partir des rétrocroisements par MAJOR;

Tableau 9: Schéma des opérations de sélection pour les glucosinolates à chaque génération de rétrocroisements



- une forme sans glucosinolates à partir des rétrocroisements par PRIMOR.

CONCLUSIONS:

Par l'utilisation de mutations naturelles modifiant profondément la biosynthèse des acides gras et celle des glucosinolates, la sélection a pu apporter une solution à certains problèmes nutritionnels posés par l'huile et le tourteau de colza.

Il rest encore à intervenir sur la teneur en acide linoléique. La variabilité naturelle trouvée dans l'espèce n'est pas suffisante pour abaisser sensiblement cette teneur et la présence d'acide linoléique dans la graine de colza serait inévitable dans la mesure où cet acide gras entre dans la composition des membranes des chloroplastes (THIES, 1971). Cependant, des recherches faisant intervenir des traitements mutagènes ont montré qu'il était possible de diminuer de moitié la teneur en acide linoléique (RAKOW, 1973) en conservant une viabilité normale des graines.

En ce qui concerne l'acide linoléique, nous avons entrepris une prospection puis une sélection chez les deux espèces navettes (*Brassica campestris*) et chou (*Brassica oleracea*), et le travail en est actuellement à la fabrication de colzas par croisements interspécifiques entre des choux et des navettes contenant 2 à 3 pour cent d'acide linoléique dans leur huile.

La sélection de colza à teneur très faible en acide érucique ne semble pas avoir apporté une solution définitive à tous les effets physiopathologiques attribués à l'huile de colza. Certains nutritionnistes constatent encore, chez certains animaux, des lésions du myocarde avec les huiles des variétés nouvelles. Pour améliorer encore la qualité nutritionnelle de l'huile de colza, le généticien peut se trouver en face de nouveaux objectifs: élimination des faibles quantités de monoènes à longue chaîne qui subsistent encore dans des variétés comme PRIMOR ou action sur certains éléments, pas encore identifiés, de l'insaponifiable.

De même, l'élimination des glucosinolates qui doit se traduire par un effet bénéfique au niveau de la thyroïde ne suffira sans doute pas à donner au tourteau de colza une aussi bonne efficacité, sur la croissance des animaux, que le tourteau de soja par exemple. Dans ce domaine, des études de biochimie et de nutrition pourront aussi définir de nouveaux objectifs qui concerneront peut être certaines fractions glucidiques.

Ainsi, au fur et à mesure que les recherches progressent dans le domaine de la nutrition, elles précisent les défauts reprochés à l'huile et au tourteau de colza et mettent en cause des constituants variés de la graine. Les généticiens se trouvent confrontés avec des problèmes nouveaux auxquels ils s'efforcent de trouver une solution dans la variabilité génétique de l'espèce ou dans celle des espèces voisines. L'expérience de l'acide éru-

cique et des glucosinolates a montré que l'on pouvait, par sélection, agir sur la composition normale de la plante, sans affecter sensiblement la viabilité, la vigueur, la productivité. Mais cette action a obligatoirement des limites et il ne sera certainement pas possible d'éliminer systématiquement tous les constituants de la graine qui, pour des raisons diverses, semblent indésirables aux nutritionnistes.

BIBLIOGRAPHIE

1. APPELQVIST, L. A. (1969): Lipids in Cruciferae IV Fatty acid patterns in single seeds and seed populations of various Cruciferae and in different tissues of Brassica napus L. *Hereditas* 61, 9-44.
2. DORREL, D. G. et R. K. DOWNEY (1964): The inheritance of erucic acid content in rape seed (*Brassica campestris*). *Can. J. Plant Sci.* 44, 499-504.
3. DOWNEY, R. K. et B. L. HARVEY (1963): Methods of breeding for oil quality in rape. *Can. J. Plant Sci.* 43, 271-275.
4. HARVEY, B. L. et R. K. DOWNEY (1964): The inheritance of erucic acid content in rapeseed (*Brassica napus*). *Can. J. Plant Sci.* 44, 104-111.
5. KONDRÁ, Z. P. et B. R. STEFANSSON (1965): Inheritance of erucic and eicosenoic acid content of rapeseed oil (*Brassica napus*). *Can. J. Genet. Cyt.* 7, 105-110.
6. KONDRÁ, Z. P. et B. R. STEFANSSON (1970): Inheritance of major glucosinolates of rapeseed (*Brassica napus*) meal. *Can. J. Plant. Sci.* 50, 643-647.
7. KRZYMANSKI, J. et R. K. DOWNEY (1969): Inheritance of fatty acid composition in winter forms of rapeseed (*Brassica napus*) seeds. *Hodowl. Roslin Aklim. Nas.* 14, 97-133.
8. KRZYMANSKI, J. (1970): Inheritance of thioglucoside content by rapeseed. *C.R. Journées Intern. Colza*, 212-218.
9. LEIN, D. A. (1972): Genetische und physiologische Untersuchungen zur Bildung von Glucosinolaten in Rapssamen. *Z. Pflanzenzüchtung* 67, 243-256.
10. LÖÖF, B. et L. A. APPELQVIST (1964): Breeding work in rape, turnip rape and white mustard in connection with research on the composition of the fatty acids in their seed. *Z. Pflanzenzüchtung* 52, 113-126.
11. RAKOW, G. (1973): Selektion auf Linol und Linolensäuregehalt in Rapssamen nach mutagener Behandlung. *Z. Pflanzenzüchtung* 69, 62-82.

12. STEFANSSON, B. R. , F. W. HOUGEN et R. K. DOWNEY (1961):
Note on the isolation of rape plants with seed oil free
from erucic acid. Can. J. Plant. Sci. 41, 218-219.
13. THIES, W. (1971): Der Einfluß der Chloroplasten auf die Bildung von
ungesättigten Fettsäuren in reifenden Rapssamen.
Fette, Seifen, Anstrichmittel 73, 710-715.
14. THIES, W. (1971): Schnelle und einfache Analysen der Fettsäurezu-
sammensetzung in einzelnen Raps-Kotyledonen I.
Z. Pflanzenzüchtung 65, 181-202.
15. YOUNGS, C. G. et L. R. WETTER (1967): Microdetermination of the
major individual mustard oils in rapeseed.
J. Amer. Oil Chem. Soc. 44, 551-554.