

N° d'ordre : 40645



# Mise en place de référentiels morphologiques du développement de la fleur et de la graine chez la chicorée (*Cichorium intybus* L., Asteraceae)

## THÈSE

soutenue publiquement le 8 novembre 2011

pour l'obtention du

**Doctorat de l'Université de Lille 1**

**Ingénierie des fonctions biologiques**

par

**Ildephonse HABARUGIRA**

### Composition du jury

<i>Président :</i>	Theo HENDRIKS, Professeur	SADV, Université de Lille 1
<i>Rapporteurs:</i>	Mondher EL JAZIRI, Professeur James TREGGAR, Directeur de Recherche IRD	Université Libre de Bruxelles IRD Montpellier
<i>Directeur:</i>	Caroline RAMBAUD, Maître de conférences	SADV, Université de Lille 1



## **Remerciements**

*Je tiens à remercier Jean-Louis Hilbert, pour m'avoir accueilli au sein l'UMR 1281 (Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux cultivés) au sein duquel ce travail a été effectué. De plus, les conseils qu'il m'a prodigués tout au long de mon parcours m'ont toujours apporté un stimulus très significatif.*

*Je remercie Caroline Rambaud, qui a accepté de diriger ma thèse. Sa disponibilité, sa patience et ses encouragements m'ont fait retrouver confiance et j'ai eu la chance de bénéficier de ses qualités humaines ainsi que sa riche expérience dans la recherche scientifique sans lesquelles ce travail n'aurait jamais abouti.*

*J'exprime également ma gratitude à Theo Hendriks pour l'encadrement scientifique, l'écoute de mes nombreuses questions et les corrections apportées au manuscrit. Je suis sincèrement reconnaissant pour les échanges constructifs et les longues heures de travail passées ensemble au laboratoire pour arriver à donner plus de consistance à ce travail.*

*Merci à Messieurs El Jaziri Mondher et James Tregear qui ont accepté d'être rapporteurs afin d'évaluer cette thèse.*

*Merci aux Ets Florimond-Desprez de qui les plantes mâles stériles ont été obtenues.*

*Merci aussi à Anne-Sophie Blervacq et Marie-Christine Quillet avec qui j'ai souvent discuté au sujet de certains aspects de mon travail notamment pendant la rédaction des publications et m'ont permis de voir les choses avec plus de recul scientifique.*

*Ma profonde gratitude est adressée à Monika Morchen et Pierre Saumitou-Laprade de qui je n'ai manqué de rien: leur humanisme sans limite ni mesure m'ont permis de progresser dans une ambiance familiale formidable et les seuls mots de ce paragraphe ne suffisent pas évidemment pour leur témoigner de ma reconnaissance.*

*Merci à tous les maîtres de conférences du laboratoire, pour leur soutien à l'une ou l'autre étape de cette thèse.*

*Un grand merci à tous les anciens et nouveaux thésards avec qui j'ai partagé la bonne ambiance de « la Salle des Etudiants ». Merci à Estelle, Aline, Jovana,*

*Meriem et Lucy qui m'y ont laissé et à Nadim et Guillaume qui y sont encore en attendant leur tour. Merci aussi à Mathieu, Aurélie, Philippe, Thierry, Nadja et Christelle pour tous ces petits moments de détente et d'encouragement qu'on a souvent partagés, surtout au-delà du lieu de travail.*

*Pour leur soutien et le partage, surtout lorsqu'il fallait « se changer les idées », je remercie Julienne, Marie-Madeleine et Gaston.*

*Enfin, ma profonde gratitude est adressée à mon épouse Providence et à mes deux fils Rémy et Alceste pour leur remarquable patience durant ces longues années. Ils ont su supporter mes va-et-vient sans se plaindre et, en cela j'ai puisé les forces qui m'ont fait persévérer jusqu'au bout....*

## SOMMAIRE

<b>Contenu</b>	<b>page</b>
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....	1
I. Développement des organes reproducteurs chez les Angiospermes.....	3
1. Le développement floral.....	4
1.1. Le modèle ABCDE du développement floral .....	4
1.2. Le développement floral chez les Asteraceae .....	6
2. Les stérilités mâles .....	11
2.1. Manifestation des stérilités mâles .....	12
2.2. Exploitation de la stérilité mâle dans l'amélioration végétale .....	14
3. Le développement du fruit et de la graine chez les Asteraceae .....	15
II. Présentation de la plante de chicorée .....	18
III. Objectifs de la thèse .....	20
CHAPITRE I - Effets des génomes nucléaires sur le développement des anthères chez des plantes de chicorée mâles stériles cytoplasmiques ( <i>Cichorium intybus</i> L.): analyses morphologiques .....	23
Effects of nuclear genomes on anther development in cytoplasmic male sterile chicories ( <i>Cichorium intybus</i> L.): morphological analysis .....	27
CHAPITRE II - Contribution à l'analyse de la stérilité mâle nucléaire chez la chicorée : analyse cytologique .....	61
1. Introduction .....	62
2. Résultats .....	62
3. Discussion .....	68
CHAPITRE III - Développement de l'akène et de la graine chez la chicorée à racine cultivée ( <i>Cichorium intybus</i> L., Asteraceae).....	71
Achene and seed development in cultivated root chicory ( <i>Cichorium intybus</i> L., Asteraceae) .....	74
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	109



# **INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**





## **I. Développement des organes reproducteurs chez les Angiospermes**

Pour assurer leur continuité et se multiplier, les plantes comme les autres êtres vivants se reproduisent à travers des mécanismes extrêmement complexes et diversifiés, particulièrement pour la reproduction sexuée. Chez les Angiospermes, la reproduction sexuée est assurée au sein de la fleur dont l'organisation morphologique est le résultat d'un programme très coordonné qui aboutit à une structure dans laquelle se fait le passage de la phase sporophytique à la phase gamétophytique. C'est aussi dans cette même structure que se fait la fécondation ainsi que le développement de l'embryon constituant le nouveau sporophyte. Des anomalies du développement floral peuvent constituer un bon terrain d'étude pour la compréhension des mécanismes de la reproduction sexuée mais elles peuvent aussi conduire à des phénotypes utiles dans le cadre de l'amélioration végétale (Meyerowitz et al. 1989). C'est par exemple le cas des plantes mâles stériles qui, à cause de leur incapacité de produire du pollen fonctionnel, peuvent être utilisées par les sélectionneurs pour accomplir l'allofécondation nécessaire pour la production des hybrides F1.

Pour que le passage de la fleur au fruit se réalise, plusieurs étapes sont nécessaires notamment le transfert et la germination du pollen, la fécondation et le développement de l'embryon jusqu'à sa maturation. A cause de leur importance dans le cycle reproductif de la plante et dans la pratique de la sélection végétale, le développement floral ainsi que celui du fruit, sont parmi les aspects qui attirent l'attention des biologistes du domaine végétal, particulièrement aujourd'hui où on dispose de plus en plus d'outils de la biologie moléculaire facilitant l'analyse de la structure et des événements associés à ces processus (Krizek & Fletcher, 2005).

Comme certains systèmes de classification actuels visent à établir les relations phylogénétiques entre les différents groupes sur base de données moléculaires, mais aussi sur des données morphologiques (Funk et al. 2009), l'étude du développement au point de vue morphologique présente ainsi un intérêt en particulier pour les familles dont certaines espèces ne sont pas encore bien étudiées. C'est le cas des Asteraceae pour lesquels, en raison de l'abondance et la diversité des espèces dans cette famille, beaucoup d'informations concernant les espèces restent encore à fournir.

## 1. Le développement floral

La fleur constitue le caractère central pour identifier les Angiospermes (Soltis et al. 2007). Son développement se réalise par un passage de l'état végétatif à l'état reproducteur qui conduit à l'apparition d'inflorescences puis de fleurs ou directement de fleurs selon le cas. Les premières étapes du développement floral aboutissent à l'installation des primordia des différents organes floraux à partir desquels se fait ensuite la différenciation conduisant à la formation des organes matures. Même si l'intérêt de l'homme pour l'étude de la fleur date du temps des anciens Grecs, les progrès les plus remarquables concernant les mécanismes du développement de la fleur sont essentiellement ceux acquis durant les dernières décennies, grâce à la biologie moléculaire qui offre les possibilités de mettre en évidence les gènes responsables des changements associés au développement floral (Coen & Meyerowitz, 1991).

### 1.1. Le modèle ABCDE du développement floral

L'étude de mutants homéotiques (c.à.d mutants dans lesquels un type d'organe est remplacé par un autre) chez *Arabidopsis thaliana* a permis d'identifier trois classes de gènes (A, B et C) dont les mutants sont affectés dans l'identité des organes de deux verticilles adjacents selon le modèle qui fut appelé ABC (Coen & Meyerowitz, 1991). Dans ce modèle, il était proposé que l'expression des gènes de la classe A détermine l'identité des sépales, la combinaison AB détermine l'identité des pétales; BC celle des étamines et C seul, celle des carpelles (Fig 1). En élargissant les études sur d'autres espèces comme *Antirrhinum majus*, *Petunia hybrida* et *Oryza sativa*, ce modèle a été remplacé par le modèle ABCDE (Ferrario et al. 2004; Kater et al. 2006) en ajoutant une autre classe de gènes (classe D) déterminant les ovules (Colombo et al. 1995), puis la classe E dont les gènes interviennent en combinaison de ceux des classes A, B, C et D pour l'identité des organes floraux (Pelaz et al. 2000) (Fig 2). Les gènes de ces différentes classes codent des protéines dont la plupart sont des facteurs de transcription de la famille des protéines à domaine MADS (motif d'acides aminés dont l'appellation est dérivée des initiales des noms des quatre premières familles de ces protéines découvertes: *MCM1-ARG80-Agamous-Deficiens-SRF*) et dont l'expression est spécifique à des régions du méristème floral (Theissen, 2001 ; Ferrario et al. 2004; Kater et al. 2006) (Fig 2).

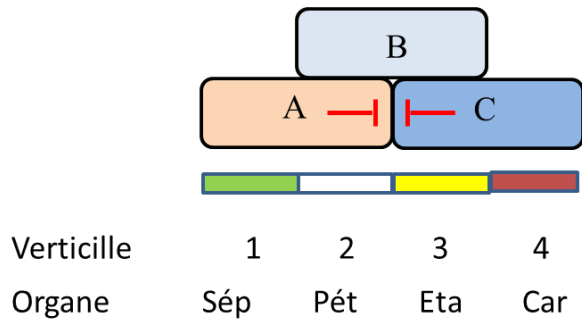


Fig 1 Le modèle classique ABC, établi chez *Arabidopsis*, d'après Coen & Meyerowitz (1991). Chacune des trois classes de gènes fonctionne dans deux verticilles adjacents : A dans le premier et le deuxième, B dans le deuxième et le troisième et C dans le troisième et le quatrième. A et C sont mutuellement antagonistes.

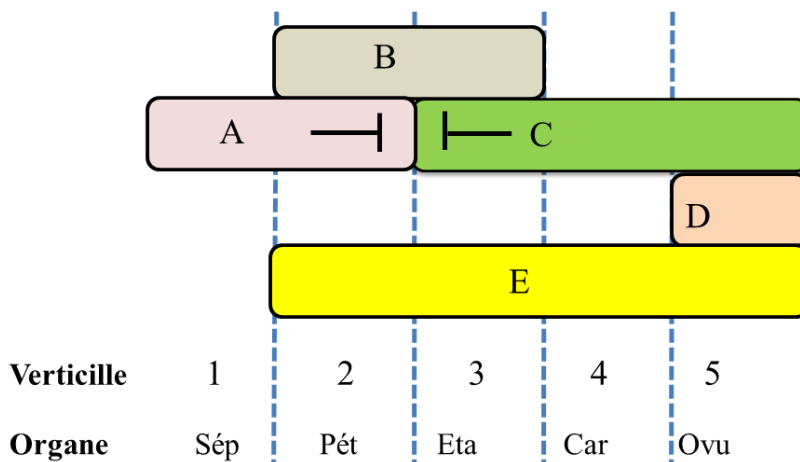


Fig 2 Le modèle ABCDE, d'après Ferrario (2004). Les lettres A, B, C, D, E représentent les 5 classes de gènes régulateurs dont les activités sont chevauchantes et qui sont responsables de l'identité des cinq types d'organes floraux. A pour les sépales, A, B, et E pour les pétales; B, C et E pour les étamines; C et E pour les carpelles; C, D et E pour les ovules. Dans ce modèle, l'ovule est considéré comme organe indépendant du carpelle.

Des modes d'interaction entre ces protéines ont été décrits ainsi qu'un autre modèle (modèle du « quartet ») qui postule que le développement d'un organe spécifique se réalise suite à la formation d'un complexe constitué de différentes protéines et qui interagit avec les gènes cibles en activant leur expression (Theissen & Saedler, 2001; Robles & Pelaz, 2005).

Même si les mécanismes contrôlant le développement floral sont en général conservés chez les Angiospermes et que par conséquent, des gènes homologues de ceux impliqués dans le développement des organes floraux chez *Arabidopsis thaliana* sont de plus en plus caractérisés et isolés chez d'autres plantes comme *Antirrhinum*, *Petunia* ou *Oryza*; il existe une certaine variation surtout par rapport aux familles considérées comme primitives où, par exemple les sépales et pétales sont remplacés par les tépales comme c'est le cas chez les Nymphaeaceae, Illiaceae, Lauraceae (Soltis et al. 2007), mais aussi chez les familles plus évoluées comme les Asteraceae dont la structure de l'inflorescence et des fleurs est distincte de celle des espèces modèles dont la fleur paraît plus simple (Kotilainen, 2000; Laitinen et al. 2006).

### ***1.2. Le développement floral chez les Asteraceae***

D'après Funk et al. (2009), les Asteraceae constituent la famille la plus grande des Angiospermes avec plus de 1600 genres et 24000 espèces distribués dans tous les habitats de la Terre sauf l'Antarctique, ce qui correspond à environ 10% de toutes les plantes à fleurs. Les Asteraceae, par la structure de leur inflorescence, présentent une adaptation remarquable à une pollinisation entomophile par le regroupement de plusieurs fleurs en un seul capitule permettant une pollinisation multiple après la visite d'un seul insecte. Cette vaste famille se caractérise notamment par une inflorescence en capitule entourée de bractées, un akène issu d'un ovaire infère et souvent surmonté d'un pappus (aigrette), ainsi que cinq anthères soudées autour du style et portant des appendices aux deux extrémités et s'ouvrant longitudinalement vers l'intérieur pour présenter efficacement le pollen aux poils balayeurs du style lors de son élongation à l'anthèse. Le capitule comprend plusieurs dizaines, voire même centaines de fleurs dont la morphologie, la sexualité, la symétrie et la pigmentation en anthocyanes varient selon les espèces (Bremer, 1994) et ce nombre élevé de paramètres variables fait que les Asteraceae présentent un intérêt considérable pour l'étude moléculaire de la régulation des processus développementaux. Selon les types d'organes reproducteurs portés par ses fleurs, le capitule peut être homogame (les fleurs sont de même type sexuel) ou hétérogame (dont les fleurs sont de type sexuel différent) (Fig 3 & 4).

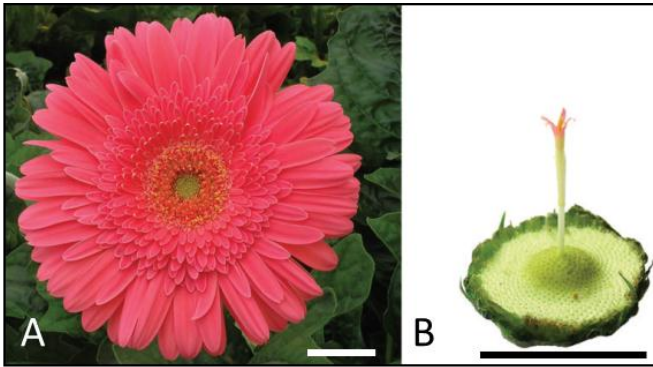


Fig 3 Capitule hétérogame de *Gerbera hybrida*. A: Les fleurs périphériques sont grandes, ligulées et femelles, les plus internes sont hermaphrodites, tubulées et moins apparentes, les intermédiaires sont femelles mais avec une ligule plus petite que celle des fleurs périphériques B: Une des fleurs internes isolée, montre une corolle tubulée et peut être considérée comme la fleur terminale. (Photo de Teeri et al. 2006). Bar 2cm

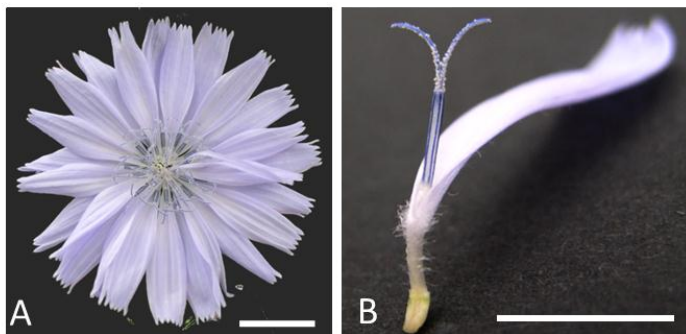


Fig 4 A Capitule homogame de *Cichorium intybus*. Toutes les fleurs sont hermaphrodites et ligulées B: Une des fleurs du capitule, portant en même temps l'androcée et le gynécée. Bar 1 cm

Par rapport à des familles moins vastes comme les Poaceae, les Fabaceae ou encore les Solanaceae, les Asteraceae comportent relativement moins d'espèces économiquement exploitées (Simpson, 2009) et, parmi celles-ci, on peut citer *Helianthus annuus* (tournesol), *Lactuca sativa* (laitue), *Cichorium intybus* et *C. endivia* (chicorées), *Cynara scolymus* (artichaut), *Scorzonera hispanica* (salsifis), *Chrysanthemum sp.* et *Gerbera hybrida*. La grande taille de cette famille fait que peu d'informations existent pour beaucoup d'espèces, mis à part quelques traits

morphologiques basiques et leur localisation, alors que leur biologie reproductive, leur variabilité génétique etc., ne sont pas encore bien étudiées (Heywood, 2009).

L'étude des aspects du développement floral et de la régulation de la différenciation des organes chez les Asteraceae n'a pas beaucoup attiré les chercheurs à part les études récemment engagées essentiellement sur *Gerbera hybrida* (Kotilainen, 2000 ; Teeri et al. 2006; Ruokolainen et al. 2010; Broholm et al. 2010). Pour justifier leur intérêt pour l'étude de cette espèce, les raisons présentées par ces auteurs sont notamment, l'architecture du capitule, l'existence et la disposition de trois catégories de fleurs dans une même inflorescence (Fig 3) ainsi que la possibilité de faire les transformations génétiques chez cette espèce.

A ce jour, les études menées sur *G. hybrida* montrent que certains mécanismes moléculaires sont conservés et d'autres sont dérivés et plus complexes, comparés au modèle simple de la fleur d'*Arabidopsis* (Kotilainen, 2000 ; Ruokolainen et al. 2010). Ainsi par exemple, le type et le nombre d'interactions entre les protéines impliquées dans la fonction B semblent plus complexes que chez *Arabidopsis* (Ruokolainen et al. 2010).

Chez les Asteraceae autres que le gerbera, les études disponibles relatives au développement floral se limitent essentiellement aux analyses morphologiques et cytochimiques montrant que les membres de cette grande famille partagent des caractéristiques communes mais aussi présentent une diversité remarquable entre les espèces. Par exemple, les plantes de la tribu des Cichorieae dont l'inflorescence présente la particularité par rapport au reste des Asteraceae, de porter des fleurs toutes bisexuées et ligulées (Harris, 1995), pourraient alors présenter une variation par rapport au modèle *Gerbera* concernant la mise en place des organes floraux.

### **1.2.1. Initiation des organes floraux chez les Asteraceae**

Harris (1995) a suivi par microscopie à balayage, l'ontogénie de l'inflorescence et des fleurs dans une centaine d'Asteraceae et a montré que l'initiation des ébauches se faisait généralement dans l'ordre corolle-étamines-gynécée, alors que le pappus apparaît de façon variable selon les espèces mais rarement en premier lieu. Selon le même auteur, l'initiation des organes est acropète chez les espèces homogames alors qu'une initiation strictement acropète n'est pas observée chez les espèces hétérogames et au sein d'un même verticille, les organes floraux sont généralement initiés simultanément. Cependant, cette étude s'est limitée à l'aspect externe des organes au cours de leur initiation sans aborder l'aspect histologique.

### 1.2.2. Différenciation des organes reproducteurs chez les Asteraceae

Durant le siècle dernier, beaucoup d'études portant sur le développement des Asteraceae ont été menées en particulier en rapport avec les aspects évolutifs (Small, 1917) et le développement des divers organes floraux le plus souvent à un niveau taxonomique supraspécifique (Small, 1917; Maheshwari, 1950; Davis, 1966; Misra, 1972; Sharma & Murty, 1978; Pullaiah, 1978, Pandey et al. 1983). Par ailleurs, beaucoup de travaux décrivant la sporogénèse et la gamétogénèse ou encore le développement de l'embryon chez certaines espèces d'Asteraceae existent, en particulier pour celles qui présentent un intérêt économique comme le tournesol (Newcomb, 1973 ; Gotelli, 2008), la laitue (Jones, 1974), la chicorée (Cichan & Palser, 1982 ; Cichan, 1983; Pacini & Keijzer, 1989; Varotto et al. 1996), le carthame (Yeung et al. 2011) ou un intérêt scientifique particulier comme l'apomixie pour *Hieracium* (Koltunow et al. 1998) et *Taraxacum* ou un usage médicinal pour *Calendula* (Ao, 2007) et *Opisthoppappus* (Jian et al. 2009). Cependant, selon l'objectif visé, ces études sont toujours orientées vers certains aspects particuliers du développement sans décrire tous les stades de développement.

#### 1.2.2.1. Développement des anthères et du gamétophyte mâle

Chez les Asteraceae, la différenciation des anthères se fait selon le type « dicotylédone » (Fig 5), d'après la classification de Davis (1966), car l'assise pariétale secondaire forme deux couches, la plus interne fonctionnant comme tapis et la plus externe donnant l'endothécium (également connu sous le nom d'assise mécanique, à cause du rôle de ses mouvements hygroscopiques lors de la déhiscence de l'anthère) et la couche moyenne. Ainsi, la paroi de l'anthère avant sa maturation comprend 4 couches qui sont de l'extérieur vers l'intérieur: l'épiderme, l'endothécium, la couche moyenne et le tapis. Ce dernier, souvent aussi appelé assise nourricière (Mascre & Thomas, 1930), est l'un des tissus qui attirent beaucoup d'attention pour l'étude du développement des anthères à cause de sa position par rapport au tissu sporogène et son implication dans le développement des microspores et des grains de pollen. En effet, il intervient dans plusieurs processus tels que la production des enzymes facilitant la libération des microspores par dégradation de la callose, la nutrition des microspores, la formation de l'exine, la synthèse et la libération de substances constituant la tryphine (Maheshwari, 1950; Pacini et al. 1985; Blackmore et al. 2007).

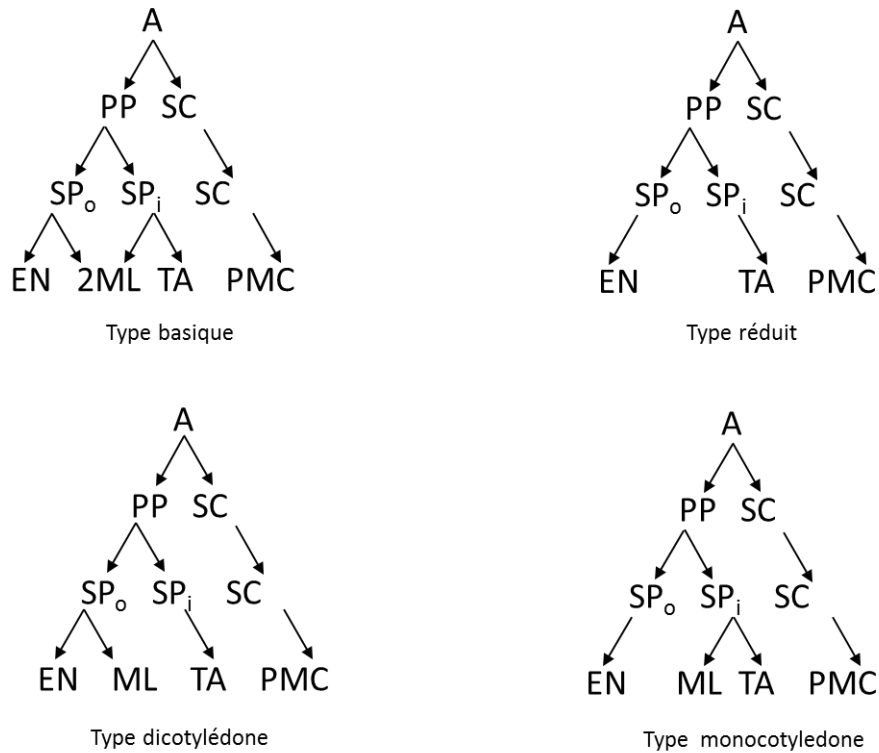


Fig 5 Classification des parois de l’anthère d’après Davis (1966). Les quatre types de parois de l’anthère sont classés selon le comportement des cellules de la couche pariétale. La différenciation des couches de la paroi de l’anthère se fait à partir des cellules archésporiales (A) qui forment d’abord une couche pariétale primaire (PP) et les cellules sporogènes (SC). La couche pariétale primaire se divise en deux couches pariétales secondaires dont l’externe (SPo) et l’interne (SPi). Alors que l’endothécium (EN) est toujours formé à partir de la couche pariétale secondaire externe, la couche moyenne (ML) peut avoir une origine différente. Le tapis (TA) provient toujours de la couche pariétale secondaire interne. Les cellules sporogènes se différencient en cellules mères du grain de pollen (PMC).

Un tapis dont les cellules restent en place en formant une couche autour du sac pollinique après la dégradation de la callose est qualifié de pariétal (ou glandulaire) alors que celui dont les cellules envahissent le sac pollinique sous forme de structures amiboïdes est un tapis invasif (ou plasmodial) (Bhandari, 1984; Pacini et al. 1989). Le premier est connu dans 192 familles dont 90% sont Dicotylédones et le second est plus rare et se retrouve dans 32 familles dont 21 sont Monocotylédones (Davis, 1966; Bhandari, 1984). Même si le type plasmodial est rare parmi les dicotylédones, il est observé chez toutes les espèces de la grande famille des Asteraceae mais avec beaucoup de variations structurales selon les espèces (Pullaiah, 1984; Lersten & Curtis, 1990).



Le développement du grain de pollen n'a pas encore été étudié chez bon nombre d'espèces d'Asteraceae et les informations disponibles pour quelques espèces montrent que dans cette famille, il est le plus complexe de tout le règne végétal en particulier concernant les mécanismes de la mise en place de sa paroi (Varotto et al. 1996; Blackmore et al. 2007).

Au moment de l'anthèse, les grains de pollen des Asteraceae, comme ceux des Brassicaceae et Poaceae sont tricellulaires, ce qui est favorable à une fécondation rapide et ce caractère est considéré comme avancé au point de vue phylogénétique (Heslop-Harrison, 1987).

#### 1.2.2.2. Développement des ovules et du gamétophyte femelle

Dans une fleur chez les Asteraceae, il y a un seul ovule, unitégumenté, tenuinucellé et anatrope formé à la base d'un ovaire uniloculaire et bicarpellaire (Funk et al. 2009). Le développement du gamétophyte femelle est initié avec l'élargissement de l'une des 4 mégaspores de la tétrade suivi de trois divisions mitotiques conduisant à un sac embryonnaire monosporique de type *Polygonum* pour la plupart des espèces d'Asteraceae (Davis, 1966). Peu d'exceptions à ce type de sac embryonnaire ont été observées chez certaines espèces et correspondent notamment au sac embryonnaire tétrasporique de type *Drusa* chez *Tussilago farfara* (Liu 2001b), de type *Adoxa* chez *Ligularia przewalskii* (Liu 2001a), de type *Oenothera* chez *Dendranthema nankingense* (Teng et al. 2008) ou de type *Chrysanthemum* chez *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Maheshwari, 1950).

## 2. Les stérilités mâles

La stérilité mâle est décrite comme l'incapacité d'une plante de produire des anthères fonctionnelles, du pollen ou des gamètes mâles. Les premières observations de la stérilité mâle furent décrites par Kölreuter, en 1763, chez des hybrides interspécifiques de *Nicotiana*, *Dianthus*, *Verbascum*, *Mirabilis* et *Datura*.

L'existence de la stérilité mâle dans la nature fut ensuite confirmée par Darwin (1877), en observant les populations végétales et en constatant la coexistence au sein d'une même espèce, de plantes hermaphrodites avec des plantes femelles (mâle stériles). Il l'appela « gynodioécie » et lui attribua un rôle important dans l'adaptation et l'évolution des plantes. Dans un tel système de

reproduction, les populations mâles stériles se maintiennent à travers des croisements avec les hermaphrodites qui sont les seuls à produire du pollen fonctionnel. La gynodioécie a été observée dans beaucoup d'espèces d'Angiospermes et constitue ainsi le deuxième système reproductif le plus utilisé par les plantes après l'hermaphrodisme qui concerne environ 90% des Angiospermes (Ainsworth, 2000).

Selon la nature du déterminant génétique impliqué, on peut distinguer la stérilité mâle nucléaire (smn) dont la transmission obéit aux lois de l'hérédité mendélienne et la stérilité mâle cytoplasmique (smc) transmise par voie maternelle grâce à des gènes mitochondriaux.

## ***2.1. Manifestation des stérilités mâles***

La stérilité mâle se présente sous diverses formes et affecte le développement de la fleur à plusieurs degrés, allant de l'absence totale des organes reproducteurs mâles à la production normale des grains de pollen mais ces derniers ne pouvant pas être libérés, suite à l'indéhiscence des anthères. Dans le cas où la plante mâle stérile porte des anthères (cas le plus fréquent), le développement peut être affecté au niveau de la formation du tissu sporogène, la microsporogénèse, la microgamétogénèse ou la déhiscence des anthères (Kaul, 1988).

### **2.1.1. La stérilité mâle nucléaire**

Dans les populations naturelles, des plantes présentant une stérilité mâle nucléaire peuvent apparaître spontanément mais de telles plantes peuvent aussi être produites artificiellement, suite à un traitement par des produits chimiques ou des rayons ionisants (Li et al. 2004) ou par transgénèse ciblant les gènes préférentiellement exprimés dans le tapis (Mariani et al. 1990; Zhan et al. 1996). Les mutations à l'origine de cette stérilité mâle peuvent affecter divers aspects tels que les gènes impliqués dans la méiose (Glover et al. 1998), dans la dégradation de la callose (Regan & Moffat, 1990), le métabolisme des hormones (Moffat & Sommerville, 1988, Fei et al. 2004), la biosynthèse des métabolites secondaires (Van der Meer et al. 1992).

La stérilité mâle nucléaire est dans la plupart des cas gouvernée par un seul gène et les allèles qui en sont responsables sont généralement récessifs (Li et al. 2004). La lignée mâle stérile est maintenue par croisement avec une lignée hétérozygote, ce qui donnera des lignées mâles

stériles et des lignées mâles fertiles dans les proportions 1 : 1, mais le clonage peut aussi être un bon moyen de multiplier les individus mâles stériles chez certaines espèces (Desprez, 1993).

### **2.1.2. La stérilité mâle cytoplasmique**

Elle est plus fréquente que la stérilité mâle nucléaire dans les populations naturelles où elle est considérée comme la cause principale de la gynodioécie (Budar & Pelletier, 2001) et dans la majorité des cas elle est spontanée, suite à des croisements intra-spécifiques ou interspécifiques. Suite à des rétrocroisements successifs avec un parent mâle, un remplacement total du noyau du parent femelle par celui du parent mâle peut faire apparaître une smc liée soit à une incompatibilité nucléo-cytoplasmique c.à.d résultant d'une mauvaise coopération entre les génomes cytoplasmique et nucléaire, ou à l'élimination d'un gène de restauration préexistant dans le noyau du parent femelle ou encore à un événement de recombinaison du génome mitochondrial (Laver et al. 1991 ; Köhler et al. 1991). Des mécanismes de recombinaison qui engendrent la smc peuvent aussi être obtenus par fusion de protoplastes (Rambaud et al. 1993). Lorsqu'elle a lieu, la recombinaison peut générer des gènes mitochondriaux supplémentaires conduisant à la création fortuite de phases ouvertes de lecture qui utilisent des signaux d'expression des gènes préexistants et codent ainsi des protéines généralement de faible poids moléculaire et à localisation membranaires (Pelletier & Budar, 2007).

Les implications physiologiques de telles protéines au sein de la plante et en particulier leur effet exact sur le processus de la méiose et le développement des grains de pollen ne sont pas encore bien connues. Plusieurs hypothèses ont été avancées notamment : une baisse de la production d'ATP chez deux lignées alloplasmiques de *B. napus* (Teixeira et al. 2005) ou dans des lignées mâles stériles de tabac (Bergman et al. 2000), une mort cellulaire programmée précoce des cellules du tapis chez le riz (Ku et al. 2003), l'interaction avec un composé spécifique des anthères à un certain stade du développement comme c'est le cas de la protéine URF13 chez le maïs ayant le cytoplasme T (Newton & Walbot, 1985; Op den Camp & Kuhlemeier, 1997; Liu et al. 2001).

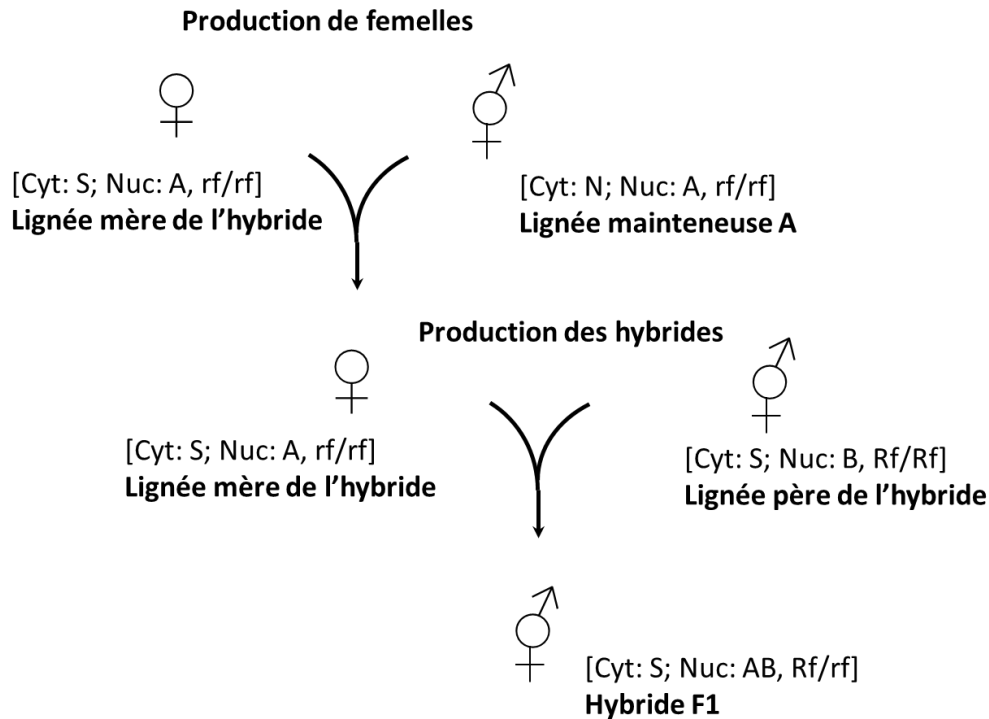


Fig 6 Illustration de l'utilisation de la stérilité mâle nucléo-cytoplasmique pour la production de semences hybrides basée sur les différences dans l'hérédité des gènes cytoplasmiques et nucléaires (d'après Pelletier & Budar, 2007). Les plantes femelles sont produites en pollinisant les femelles par des hermaphrodites portant un génotype nucléaire identique, mais avec un cytoplasme non inducteur de stérilité. Les semences hybrides sont produites par croisement avec les hermaphrodites voisins. Si ces pollinisateurs sont homozygotes pour les allèles des gènes restaurateurs, tous les hybrides retrouvent la fertilité mâle. Les génotypes des plantes sont indiqués entre les crochets. Génotype du cytoplasme (Cyt) : S, cytoplasme inducteur de stérilité ; N, non inducteur de stérilité. Génotype nucléaire (Nuc) : A, lignée A ; B, lignée B ; AB, hybride F1 entre A et B ; rf/rf, génotype mainteneur de stérilité; Rf/Rf ou Rf/rf, génotype restaurateur de fertilité, respectivement homozygote ou hétérozygote pour les allèles de restauration de la fertilité.

## ***2.2. Exploitation de la stérilité mâle dans l'amélioration végétale***

Les systèmes de stérilité mâle ont joué un rôle important dans l'amélioration de la production chez beaucoup de plantes cultivées à travers l'exploitation de la vigueur hybride (Saxena et al. 2010). Dans la pratique, pour une production des hybrides F1 à grande échelle, il est plus coûteux de recourir à la smn puisque le maintien des parents femelles se fait par l'intermédiaire du parent femelle hétérozygote ou bien par clonage des individus stériles mâles

alors que pour la smc, la multiplication des plantes mâles stériles se fait par pollinisation de la lignée mâle stérile par une lignée dite mainteneuse permettant d'avoir directement une descendance mâle stérile (Pelletier & Budar, 2007). L'exploitation de la smc dans la production des hybrides a particulièrement donné des résultats considérables pour la production de variétés hybrides de maïs, aux USA, à partir des années 1930 et de riz, en Chine à partir des années 1970 où les rendements se sont significativement améliorés (Budar & Pelletier, 2001). Cependant, chez le maïs une sensibilité à deux toxines pathogènes fongiques (*Bipolaris maydis* et *Phylosticta maydis*) a rendu inexploitable la CMS-T (pour Cytoplasmic Male Sterility, Texas-cytoplasm) dans les années 1970, en causant des pertes énormes de la production du maïs (Forde et al. 1980). Chez le tournesol, il existe de nombreuses sources de smc mais c'est la smc-PET1 obtenue par un croisement interspécifique entre *Helianthus petiolaris* et *H. annuus* (Leclercq, 1969), qui est exploitée dans la production de graines hybrides commerciales (Friedt, 1992).

Pour les plantes dont la partie économiquement exploitée est végétative (ex. la pomme de terre, la betterave, le chou, la chicorée), l'absence de l'autofécondation n'affecte pas le rendement de la récolte chez l'hybride et elle pourrait même être avantageuse à cause de la réduction des dépenses d'énergie dans les organes floraux mâles (Hanson & Bentolila, 2004). Si au contraire la plante est essentiellement cultivée pour la production de graines (ex. le sorgho, le maïs, le tournesol), il faut, en plus d'une lignée mâle stérile stable, des lignées mainteneuses de stérilité et des lignées restauratrices portant un ou plusieurs gènes de restauration de la fertilité (Fig 6). Ainsi dans un système de smc où la restauration de la fertilité et le maintien de la stérilité ont été maîtrisés, il devient aisé de produire des plantes mâles fertiles dès la première génération tout en gardant la lignée mâle stérile. Cependant, dans beaucoup de situations, la diversité des systèmes de restauration et le nombre de gènes impliqués rend difficile l'exploitation de la smc dans la production des semences hybrides (Schnable & Wise, 1998).

### **3. Le développement du fruit et de la graine chez les Asteraceae**

Par la double fécondation chez les Angiospermes, l'un des noyaux spermatiques fusionne avec le noyau de la cellule centrale pour former le noyau primaire de l'albumen alors que l'autre fusionne avec celui de l'oosphère pour donner le zygote.

La classification des types d'embryon utilisée par Johansen (1950) reconnaît six types d'embryons chez les angiospermes (« Asterad », « Solanad », « Onograd », « Chenopodiad », « Caryophyllad » et « Piperad »), en se référant à la contribution des deux cellules obtenues par la première division du zygote dans la construction de l'embryon. Excepté pour le type « Piperad », chez lequel la première division du zygote est longitudinale, dans tous les autres cas, elle est transversale.

Chez les Asteraceae, le développement de l'embryon se fait selon le type « Asterad » (Maheshwari, 1963) selon lequel la cellule basale issue de la division du zygote contribue significativement à la formation de l'embryon, en même temps que la cellule apicale. Pour les autres types, la contribution des deux cellules issues de la première division du zygote se présente comme suit :

- le type Solanad: les cellules dérivées de la cellule basale ne participent pas à la constitution de l'embryon propre (cas des Solanaceae);
- le type Onograd: la cellule basale donne les initiales du cortex et de la coiffe racinaire (cas des Brassicaceae);
- le type Chenopodiad: la cellule basale contribue à la formation de l'hypocotyle (cas des Amaranthaceae);
- le type Caryophyllad: la cellule basale ne contribue pas à la formation de l'embryon mais subit souvent une augmentation considérable du volume (cas des Caryophyllaceae);
- le type Piperad: après la première division du zygote qui est longitudinale, toutes les cellules obtenues participent à la formation de l'embryon (cas des Piperaceae).

Comme le noyau diploïde du zygote, le noyau triploïde issu de la fusion d'un des gamètes mâles avec le noyau primaire de l'albumen se divise pour constituer la partie végétative du sac embryonnaire. Les noyaux ou les cellules issues des mitoses successives de ce noyau constituent l'albumen qui normalement est responsable de la croissance et de la germination de l'embryon (Vijayaraghavan & Prabkar, 1984).

D'après la classification de Maheshwari (1950), selon qu'une paroi se forme ou non après la première division du noyau de l'albumen, ce dernier peut être qualifié de nucléaire ou de cellulaire, mais il existe un type intermédiaire : l'albumen hélobial.

## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

- L'albumen nucléaire: les noyaux restent libres pendant un nombre de divisions qui varie selon les espèces avant d'entrer dans une phase de cellularisation;
- L'albumen cellulaire: les premières divisions du noyau de l'albumen sont directement suivies de la formation des parois cellulaires;
- L'albumen hélobial: si la première division du noyau de l'albumen aboutit à une partition du sac embryonnaire en deux chambres inégales dont la micropylaire est plus grande que la chalazale; des divisions libres se font dans la chambre micropylaire puis la cellularisation a lieu, alors que la chambre chalazale reste généralement coenocytique.

Chez certaines familles, parmi les Angiospermes, des embryons peuvent se former à partir des cellules autres que le zygote. Ce mode de reproduction asexuée, assuré grâce à un ou plusieurs embryons formés à partir des tissus maternels sans intervention de la fécondation et appelé « apomixie », s'observe d'une manière fréquente chez les Asteraceae, les Poaceae et les Rosaceae (Noyes, 2007). Ce phénomène constitue le mode naturel de reproduction prédominant chez certaines Asteraceae comme, par exemple, chez les genres *Taraxacum* (pissenlit) (Van Dijk, 1999) et *Hieracium* (Koltunow et al. 1998; Tucker et al. 2003).

Chez les Angiospermes, le développement de l'embryon se fait en parallèle avec celui du fruit qui assure un environnement propice pour la maturation et la dispersion de la graine (Gillapsy et al. 1993). A sa maturité, le fruit des Asteraceae (akène) est généralement sclérifié, et englobe un embryon droit entouré par une couche mince d'albumen (Funk et al. 2009). Néanmoins, il a été observé notamment chez les Asteraceae cultivées, dans un même capitule, des akènes ne contenant pas d'embryon, ou bien contenant un embryon mais sans albumen ou vice-versa, comme c'est le cas chez la chicorée (Pecaut, 1962; Cichan et Palser, 1982; Cichan, 1983) ou le tournesol (Gillapsy et al. 1993; Hernandez, 2008). De tels événements peuvent avoir différentes origines comme l'absence de la pollinisation ou de la fécondation, ou alors les interactions entre l'embryon, le sac embryonnaire et les autres tissus maternels (Gillapsy et al. 1993; Chaudhury et al. 2001). Bien que ce genre d'interactions ne soit pas encore bien clarifié, des études orientées vers la compréhension de leur contrôle génétique ont déjà identifié certains gènes concernés par ces processus notamment chez *Arabidopsis* (Luo et al. 2000) ou chez le maïs (Matthew et al. 2001). Ce genre d'étude est d'un grand intérêt, en particulier pour les espèces

cultivées, chez lesquelles la production de graines est essentielle pour la sélection, mais il peut aussi servir dans un cadre purement fondamental.

## II. Présentation de la plante de chicorée

La chicorée est une plante herbacée appartenant à la famille des Asteraceae, sous-famille des Cichorioideae, tribu des Cichorieae (Kilian et al. 2009). Le genre *Cichorium* comporte six espèces: *C. intybus*, *C. endivia*, *C. spinosum*, *C. bottae*, *C. calvum* et *C. pumilum*. Seules les trois premières sont retrouvées en Europe et sont les seules chicorées pouvant être cultivées alors que les trois autres sont sauvages et se retrouvent en Europe et en Asie (Kiers, 2000).

L'espèce *C. intybus* est une plante diploïde ( $2n=18$ ), naturellement allogame à cause d'un système d'incompatibilité sporophytique (Eenink, 1981; Varotto et al. 1996). La fécondation croisée est également favorisée par une morphologie florale défavorable à une autofécondation précoce en l'absence de pollinisateurs (Pécaut, 1962; Desprez et al. 1994) ainsi que l'existence d'un phénomène de compétition pollinique dans lequel la vitesse de croissance des tubes allopolliniques est plus rapide que celle des tubes autopolliniques (Bannerot, 1967).

Le cycle de vie de *C. intybus* cultivée est bisannuel (Fig 7). La chicorée est cultivée à cause de son importance économique variée et peut être divisée en quatre cultigrupes selon le mode de culture et les différentes utilisations des parties de la plante (Cadalen et al, 2010). On distingue actuellement :

- La chicorée « industrielle » ou « chicorée à racine » cultivée principalement dans le Nord-Ouest de l'Europe (Nord de France, Belgique, Hollande), l'Inde, l'Afrique du Sud et le Chili. Sa racine est utilisée pour la production d'un succédané de café ou pour l'extraction de l'inuline et des fructanes (Kaur & Gupta, 2002; Meyer & Stasse-Wolthuis, 2009) reconnus comme prébiotiques utilisés dans l'industrie alimentaire (Kaur & Gupta, 2002) ou pour le traitement préventif de certaines maladies chez l'homme, comme le diabète, certaines maladies cardio-vasculaires ou encore le cancer (Pool-Zoobel, 2006, Wang & Cui, 2011).



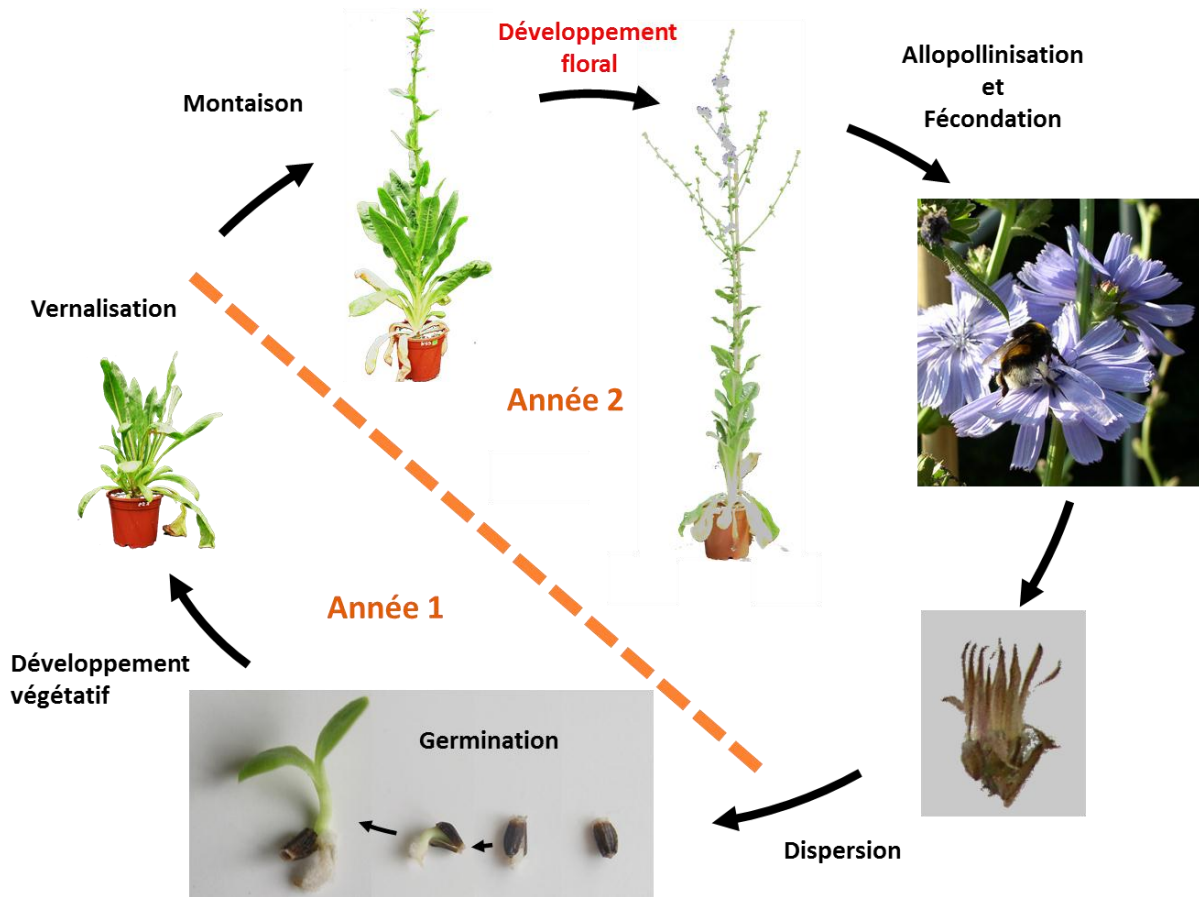


Fig 7 Cycle de vie chez *Cichorium intybus* cultivée

- La chicorée « Witloof » cultivée dans la même zone en Europe que la précédente et dont les racines produisent des bourgeons étiolés en conditions artificielles de forçage en obscurité; ces bourgeons sont commercialisés sous le nom d'endives mais aussi plus proprement appelés chicons en Belgique et dans le Nord de la France.

- La chicorée « à feuilles » utilisée comme légume frais ou cuit. Elle comporte les variétés à feuilles vertes comme la variété « Pain de sucre », la variété « catalogne » ou les variétés à feuilles rouges ou panachées dont les «Radicchio» cultivées en Italie (Lucchin et al. 2008).

- La chicorée « à fourrage » dérivée de la chicorée sauvage et utilisée depuis les années 1970 pour augmenter la disponibilité de l'herbe dans les pâturages pérennes

destinés au bétail. La chicorée fourragère est présente à travers le monde (Nouvelle Zélande, Australie, Amérique et Europe) (Li & Kemp, 2005; Wang & Cui, 2011).

Depuis 1985, des travaux de recherche ont été faits sur *C. intybus* au sein du laboratoire SADV (Stress Abiotiques et Différenciation de Végétaux Cultivés) pour étudier l'embryogenèse somatique (Dubois, 1991; Blervacq et al. 1995; Legrand, 2006; Legrand et al. 2007; Lucau-Danila et al., 2010), la stérilité mâle cytoplasmique (Rambaud et al. 1993; Rambaud et al. 1997; Dubreucq et al. 1999), la stérilité mâle nucléaire (Quillet et al, 2011 en prép.), ainsi que l'autoincompatibilité (Gonthier, 2011).

L'embryogenèse somatique étant considérée comme un bon modèle expérimental pour étudier la différenciation au cours du développement embryonnaire, les analyses moléculaires ont pu proposer des gènes candidats dont certains sont des homologues de ceux exprimés au cours de l'embryogenèse zygotique chez *Arabidopsis thaliana* (Legrand et al. 2007; Clabaut, 2009; Lucau-Danila et al. 2010).

Dans l'étude de la stérilité mâle cytoplasmique, des chicorées mâles stériles ont été obtenues, par fusion des protoplastes de chicorée et de tournesol porteurs d'un cytoplasme contenant l'*orf* 522 (open reading frame 522) responsable de la smc chez le tournesol (Rambaud et al. 1993). Curieusement, les analyses moléculaires des plantes issues de cette fusion ont révélé la non-implication du gène chimérique responsable de la smc chez le tournesol dans la smc obtenue dans la chicorée (Dubreucq et al. 1999), mais la vraie cause de cette smc n'a pas encore été identifiée au niveau moléculaire.

Concernant la stérilité mâle nucléaire, une caractérisation de l'unique mâle stérilité nucléaire (nommée « Edith », Desprez, 1993) qui a été jusqu'à ce jour observée chez *C. intybus* est en cours, pour pouvoir identifier la mutation qui est à l'origine de cette stérilité.

### **III. Objectifs de la thèse**

Le développement floral est l'un des aspects les plus fascinants des processus développementaux qui se passent dans la plante, de même que celui du fruit dont les parois jouent un rôle protecteur et disséminateur de la graine. Les études embryologiques chez les Angiospermes ont beaucoup contribué à la compréhension de la diversité structurale en rapport avec les micro- et mégagaméto-genèse, le développement des micro- et mégagamétophytes, la

fécondation, le développement de l'embryon et des téguments (Tobe, 1989). Les informations relatives à ces caractères ont été utilisées pour la classification des Angiospermes (Dahlgren, 1975; Cronquist, 1988) avant d'être combinées aux caractères moléculaires utilisés dans les classifications les plus récentes comme celle du groupe « Angiosperm Phylogeny Group » (APG II et III). Malgré ce virage vers la classification exploitant les nouvelles techniques moléculaires plus rapides, les aspects morphologiques de l'embryologie végétale gardent encore une certaine valeur, surtout pour comparer globalement les grands taxons des Angiospermes (Funk et al, 2009).

D'autre part, les études visant la compréhension des mécanismes qui régissent le développement des organes exigent pour être bien faites, qu'on dispose de marqueurs caractéristiques des différents stades tels que les marqueurs morphologiques, ceux-ci servant de préalable pour les programmes d'étude de l'expression spatio-temporelle des gènes impliqués dans le développement. De plus, pour mieux comprendre les déviations pouvant survenir pendant le développement et conduisant à des phénotypes morphologiquement altérés suite à des mutations de gènes impliqués dans le développement, la connaissance exacte du déroulement normal du développement est un préalable incontournable. Ainsi, chez *Cichorium intybus* L. (Asteraceae), des phénotypes présentant un développement altéré au niveau des anthères existent, certains présentant la stérilité mâle nucléaire et d'autres, la stérilité mâle cytoplasmique. Ceux-ci constituent un matériel important pour la création des hybrides F1, mais leur exploitation dans un tel programme exige souvent qu'on connaisse la nature exacte de leurs altérations développementales.

Comme préalable à l'étude moléculaire visant à expliquer les changements qui ont lieu dans ces plantes, une base d'informations sur le développement normal de la fleur est nécessaire, d'autant plus qu'elle pourrait aussi servir dans d'autres aspects notamment ceux relatifs à la culture des anthères ou celle des ovules chez cette espèce (Levieil, 1987; Varotto et al. 2000). En effet, le prélèvement des explants pour ce genre de technique de culture ne peut se faire qu'à des stades précis pour aboutir à de bons résultats. A titre d'exemple, Varotto et al. (2000) n'ont pu obtenir des plantules par culture *in vitro* de sacs embryonnaires que si ces derniers étaient prélevés juste après la pollinisation.

Par rapport au développement de l'akène, certains génotypes de chicorée sauvage ont un développement rapide par rapport à ceux des génotypes utilisés dans notre laboratoire (Carano, 1915; Cichan & Palser, 1982; Cichan, 1983). Il est alors intéressant d'établir le calendrier des événements de l'akène dans la chicorée cultivée pour enfin déterminer laquelle des étapes de développement est affectée et cause un tel retard. Aussi, cette étude peut être utile pour continuer les recherches entamées sur l'embryogenèse somatique chez la chicorée et pour lesquelles certains gènes candidats attendent une validation de leur expression (Legrand, 2006; Legrand et al. 2007; Clabaut, 2009; Lucau-Danila et al. 2010).

Pour ces différentes raisons, sur base d'observations macroscopiques et microscopiques, une caractérisation morphologique détaillée du développement de la fleur, de l'akène et de la graine chez la chicorée, a été envisagée. Plus spécifiquement, cette étude avait pour objectifs de:

- Etablir un référentiel pour le développement floral en décrivant les événements marquants observés de l'initiation florale jusqu'à l'anthèse;
- Décrire cytologiquement, les deux stérilités mâles: la smn « Edith » et la smc « 524 » obtenue par fusion de protoplastes de chicorée et de tournesol (Rambaud et al. 1993), en identifiant les stades auxquels les altérations du développement surviennent et en analysant leur impact sur le développement des anthères;
- Décrire les différentes morphologies florales associées au cytoplasme 524 et analyser les effets des interactions nucléo-cytoplasmiques sur la morphologie florale chez les individus dans lesquels ce cytoplasme a été introduit;
- Mettre en place le calendrier détaillé des événements qui ont lieu lors du développement de l'embryon dans les génotypes qui ont antérieurement servi pour les études d'embryogenèse somatique, pour asseoir une base exploitable lors des études moléculaires ultérieures.

**CHAPITRE I - Effets des génomes nucléaires sur le développement des anthères chez des plantes de chicorée mâles stériles cytoplasmiques (*Cichorium intybus* L.): analyses morphologiques**



## CHAPITRE I

Chez la chicorée, beaucoup d'études se sont intéressées au développement (Carano, 1915; Cichan & Palser, 1982 ; Levieil, 1987; Pacini & Keijzer, 1989; Varotto et al. 1996; Chehregani et al. 2011), mais aucune n'a abordé de manière intégrée et détaillée, toutes les étapes du développement au niveau des organes reproducteurs mâles et femelles. L'importance d'une telle étude au niveau fondamental réside en ce qu'elle peut constituer une base de référence pour les études comparées de morphologie florale des plantes de cette espèce chez lesquelles le phénotype est altéré mais aussi pour l'analyse de l'expression des gènes impliqués dans le développement.

En raison de l'allogamie non stricte de la chicorée, la production d'hybrides F1 a été pratiquée par les sélectionneurs de la chicorée en ayant recours au système de compétition pollinique (Eenink, 1981; Bannerot, 1967). Comme les résultats de cette méthode dépendent beaucoup de paramètres comme les conditions météorologiques, la présence d'insectes, la quantité de pollen ou la synchronisation des lignées parentales, le taux d'hybridité des lots de semences n'atteignait pas 100%. Parmi les alternatives, face à ce problème, l'utilisation d'une lignée disposant d'une stérilité mâle nucléaire de type récessif ("Edith") a permis d'exploiter l'hétérosis, mais ce système exige malheureusement des coûts, notamment pour le clonage du parent mâle stérile (Desprez, 1993).

Dans le souci de mettre en place un système fiable et moins coûteux pour la production des hybrides F1 chez la chicorée, la création de lignées présentant la stérilité mâle cytoplasmique, en utilisant la fusion des protoplastes de tournesol mâle stérile (*Helianthus annuus* L. Mirasol) porteur de la smc PET1 et les protoplastes de chicorée industrielle fertile (*Cichorium intybus* L. var. Pévèle) a donné un outil idéal pouvant servir pour la production des hybrides chez la chicorée (Rambaud et al. 1993). Cette méthode a permis de régénérer des plantes de chicorées à cytoplasme mâle stérile dont les trois qui ont été sélectionnées pour leur vigueur sont « 411 », « 523 » et « 524 ». Des analyses moléculaires préliminaires ont permis de déterminer la nature cytoplasmique de leur stérilité mâle et ont révélé qu'il y avait des réarrangements dans l'ADN mitochondrial (Rambaud et al. 1997).

Par ailleurs, les analyses sur le tournesol portant la smc PET1 avaient antérieurement montré que cette stérilité était associée à un fragment d'ADN mitochondrial contenant une nouvelle séquence, l'*orf522* et ce fragment était retrouvé dans les plantes de tournesol restaurées (Laver et al. 1991; Köhler et al. 1991).

Ce même fragment a été retrouvé dans les cytoplasmes 411 et 523 mais est absent dans le cytoplasme 524. Cependant, les études moléculaires qui ont été entreprises n'ont pas permis de montrer l'expression de l'*orf522* chez 411 et on pense que les smc chez la chicorée sont différentes de celles du tournesol (Dubreucq et al. 1999). Ces mêmes auteurs ont mis en évidence que lorsque les trois cytoplasmes 411, 523 et 524 ont été introduits dans des contextes nucléaires divers, différents types de morphologies florales ont été observées, allant de l'absence d'anthères à une restauration complète de la fertilité. De cette étude, des génotypes du cultigroupe de chicorée à feuille (Jupiter ou pain de sucre) ou du cultigroupe « witloof » (lignée AXQ, AXB, ALG, BLH et Rub) ont été utilisées. L'utilisation d'un autre génotype de chicorée à cycle court appelée CC, certainement d'origine sauvage, a permis de maintenir de façon stable le phénotype mâle stérile 524 dans les différents cytoplasmes.

Nous nous sommes alors intéressés à l'analyse cytologique de ces différents phénotypes floraux, en vue de mettre en évidence les changements morphologiques attribuables à la smc et à l'influence des donneurs de pollen sur le cytoplasme mâle stérile. Même si la restauration de la fertilité n'est pas indispensable pour l'amélioration de la production chez la chicorée où les parties exploitées économiquement sont végétatives, l'intérêt pour des croisements pouvant apporter la restauration de la fertilité aiderait à mieux comprendre au niveau fondamental, le rôle joué par les gènes de restauration dans les interactions nucléo-cytoplasmiques mises en jeu dans ce système de stérilité mâle et de ce fait, mieux comprendre le mécanisme de stérilité mâle cytoplasmique.

Les travaux relatifs à cette analyse sont repris sous forme d'une publication qui va être soumise à la revue *Sexual Plant Reproduction*.



## Effects of nuclear genomes on anther development in cytoplasmic male sterile chicories (*Cichorium intybus* L.): morphological analysis

Ildephonse Habarugira, Theo Hendriks, Marie-Christine Quillet, Caroline Rambaud

*Université Lille Nord de France, Université Lille1, UMR INRA 1281 Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux Cultivés, IFR 147, Bâtiment SN2, F-59650 Villeneuve d'Ascq Cedex, France*

Corresponding author: Caroline Rambaud

Phone : +33320434019

E-mail: caroline.rambaud@univ-lille1.fr

### Abstract

The *Cichorium intybus* flower development in fertile, cytoplasmic male sterile (CMS 524) and various phenotypes carrying the 524 male sterile cytoplasm was investigated macroscopically and by light microscopy. The development was similar in the fertile and in male sterile floret up to meiosis, and then it was affected in anther wall structure and pollen grain development in male sterile. In the male sterile plants, the tapetum intrusion after meiosis was less remarkable, the microspores started to abort at vacuolate stage, the connective tissue collapsed, endothecium failed to expand normally and did not undergo cell wall lignification, which prevented anther opening since the septum and stomium were not disrupted. Crosses undertaken in order to introduce the CMS 524 into two different nuclear backgrounds gave rise to morphologically diversified progenies due to different nuclear-mitochondrial interactions. Macroscopic and cytological investigations showed that pollen-donor plants belonging to Jupiter population had potential capacity to restore fertility while the CC line could be considered as a sterility maintainer.

**Key words:** Anther development, Asteraceae, *Cichorium intybus* L., cytoplasmic male sterility, endothecium, fertility restoration, pollen grain, tapetum

## Introduction

Cytoplasmic Male Sterility (CMS) which is usually defined as a maternally inherited deficiency in producing viable pollen (Budar and Pelletier 2001), may appear spontaneously or be induced by inter- or intra-specific crosses or by protoplast fusion. It has been described in over 150 plant species (Schnable and Wise 1998) including crop species like green bean, beet, carrot, maize, onion, petunia, rice, rye, sunflower, and wheat. In CMS types where cytological analysis has been done, the developmental deviation from the normal development pattern can occur at any stage of anther development, either before, during or after meiosis (Laser and Lersten 1972; Kaul 1988). For instance in the sunflower CMS type, named PET1, the pollen is not formed due to premature tapetum degeneration and microspore tetrad disintegration soon after the second meiotic division resulting in sterility (Horner 1977; Smart et al. 1994; Balk and Leaver 2001; Meric et al. 2004). In the *Petunia pcf* male sterile flower, the tapetal cells are disorganized before their degeneration and the microspore degenerate in the callose wall which is not degraded (Conley et al. 1994). However, in other CMS systems, anther development may be normal until late stages of pollen development and male sterility is associated to failure of pollen grain maturation like in rice where the pollen development proceeds up to second mitosis (Li et al. 2004) or in the S-maize CMS where the pollen fails to accumulate starch (Kamps et al. 1996). In contrast, anther development was reported to be affected early in one *Citrus* CMS type in which anther abortion occurred during initiation of anther development (Yamamoto et al. 1997).

Morphological manifestation of CMS may be limited to anther development but in some CMS systems developmental changes can be extended to other floral organs morphology and color (Struckmeyer and Simon 1986; Zubko et al. 1996; Farbos et al. 2001; Leino et al. 2003). Moreover, recent studies indicate that CMS-associated genes may affect the expression of floral homeotic genes leading to the transformation of stamens to petals, or stamens to carpels as observed in wheat (Hanson and Bentolila 2004; Murai et al. 2002), carrot (Linke and Börner 2005), tobacco (Fitter et al. 2005), or stem mustard (Teixeira et al. 2005; Yang et al. 2008).

Genetic factors that determine CMS have been proven to be mitochondrially encoded (Chase 2006; Hanson and Bentolila 2004; Schnable and Wise 1998) and their effect can be suppressed or counteracted by the products of one or more nuclear genes known as restorer-of-

## CHAPITRE I

fertility (*Rf*) genes, which reconstitute the normal flower phenotype and functional pollen (Chase 2006; Ivanov and Dymshits 2007; Fujii and Toriyama 2008). The possibility to restore fertility by these genes constitutes a way for understanding the nuclear-cytoplasmic interactions but also makes it possible to exploit the CMS trait in breeding for F1 hybrids production, as already applied in several cultivated species such as sunflower, rapeseed, onion, or sorghum (Havey 2004). This process occurs through different ways but in some investigated plant species the *Rf* encode pentatricopeptide repeat (PPR) proteins which are normally known to be essential for the mitochondrion or chloroplast gene expression (Hanson and Bentolila 2004; Chase 2006; Hayes and Mulligan 2011).

In *Cichorium intybus* hybrid breeding programs are carried out taking advantage of the availability of male sterility. Nuclear male sterility in this species has been observed in a genotype named “Edith” but its use was expensive due to the cost of required propagation of the male sterile parent clone (Desprez 1993). In such conditions the CMS strategy was a good alternative and CMS plants have been obtained by somatic hybridization between fertile chicory and sunflower protoplasts bearing PET1 CMS (Rambaud et al. 1993; Varotto 2001). Among the male sterile cytotypes obtained the so-called “524” or “411” plants (Rambaud et al. 1993) were backcrossed to different types of pollen donors in order to transfer the male sterile cytoplasm in new nuclear contexts. The progenies presented a series of flower phenotypes suggesting that the nuclear context could affect the sterility of the cybrids (Dubreucq et al. 1999). The pollen donors used belong to the Jupiter (Jup) population and others to the CC line, chosen because the first demonstrated potentiality to restore fertility in some crosses, whereas the second seemed to maintain the 524-male sterility according to macroscopical examination. In spite of molecular studies undertaken on the CMS in chicory (Rambaud et al. 1993; Rambaud et al. 1997; Dubreucq et al. 1999) there is a little information about anatomical and cytological changes in flower development, more particularly in the genotypes used for those analyses.

Though the pollen development in *C. intybus* has been investigated (Levieil 1987; Pacini and Keijzer 1989; Varotto et al. 1996), earlier developmental aspects and anther dehiscence processes in this species are less documented. The early inflorescence and floral ontogeny on *Cichorium capitula* has been reported by Harris (1995). This author reported that the sequence of

floral initiation on the inflorescence meristem in an acropetal manner was a common feature for Asteraceae species with homogamous heads. Micro-sporogenesis and gametogenesis have been studied with emphasis on pollen wall development as well as relations between tapetum and the developing microspore and pollen grain but there are still conflicting reports about tapetum behavior. In the Asteraceae family the tapetum was described as plasmodial (invasive) (Pacini et al. 1985; Lersten 2004) and more particularly in *C. intybus* Pacini and Keijzer (1989) characterized the tapetum intrusion as non-periplasmodial whereas according to Varotto et al. (1996) it was periplasmodial, meaning that the tapetal cells fused and formed a periplasmodium surrounding the microspores in the locule. More recently, the tapetum intrusion was described as starting like secretory but ending as plasmodial, in wild *C. intybus* flowers (Chehregani et al. 2011), which somehow shows different views about the tapetum behavior in this species.

Embryological studies on the female organs development reported that the chicory ovule is anatropous, unitegmic and tenuinucellate (Cichan and Palser 1982; Levieil 1987) the embryo sac is of *Polygonum* type (Maheshwari 1950; Cichan and Palser 1982; Levieil 1987; Chehregani et al. 2011). However, despite information provided by these studies on male and female gametophyte development, anatomical characterizations of flower development with emphasize on the timing of events in both male and female floral organs in the same flower are not well known in *C. intybus*. Such a correlation of events in a scheduled manner can be used as a reference to determine the effects of male sterile cytoplasm on flower development in plants that carry this cytoplasm or exhibiting any other flower development deviation.

In this paper, we firstly analyzed histo-morphological changes during chicory flower development in fertile plants from flower initiation to anther senescence and secondly, by using the normal development as a reference, we investigated alterations in the male sterile 524 and in various phenotypes obtained from crosses between the above male sterile plant and two pollen donor types. The influence of the nuclear genome of pollen donor plants used on the floral morphology in the progenies is discussed.

## Materials and methods

### Plant material

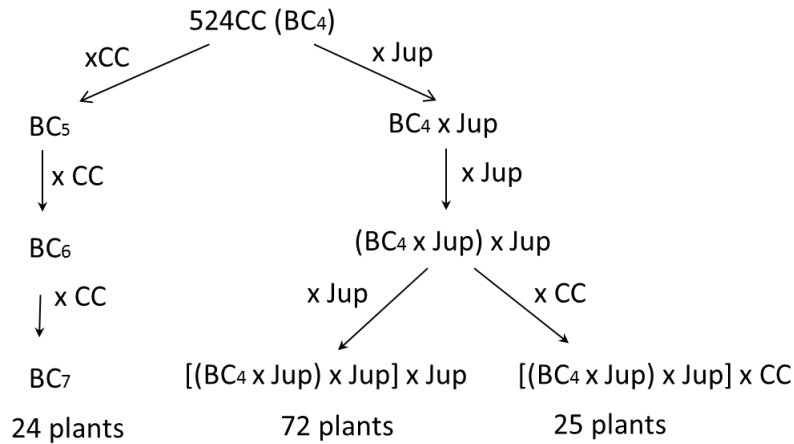
The plants used for crosses and morphological investigation of *C. intybus* fertile flower development included K59 genotype, individuals from the “Jupiter” population and those from the “CC” line (Table 1).

Table 1 Parents used for morphological analysis and for different crosses

Plant	Description	Cytoplasm
K59	Genotype originating from Hungarian landrace population ‘Koospol’ (Florimond-Desprez, Cappelle-en-Pévèle, France). Fertile, self-incompatible	normal
CC	Fertile and rapid cycling line	normal
524CC	Male sterile line obtained after four backcrosses between the cybrid 524 and the CC line.	male sterile
Jup	Genotypes from Jupiter population which belongs to the named “pain de sucre”. Self-incompatible, heterozygous and male fertile	normal

The male sterile cybrid named 524 was obtained by fusion of protoplasts from sunflower male sterile PET1 (Leclercq 1969) with those from fertile *C. intybus* L. cv Magdebourg (provided by “Ets Florimond Desprez”) by Rambaud et al. (1993). A nearly isogenic, alloplasmic male sterile line designated 524CC was created by four successive backcrosses of the cybrid 524 with CC pollen donor line in order to incorporate cytoplasmic male-sterility in this line and, 524CC (i.e. BC4) was then crossed with pollen donors issued from CC line and Jupiter population.

In our investigation, K59, Jupiter (Jup) and CC plants were used as reference for the study of the male sterile flower development and plants with different flower phenotypes which have been chosen in the progenies of different crosses described below.



Apart from Jupiter and CC plants which were obtained from seeds, the plants we used had been regenerated *in vitro* and after acclimation, they were vernalised (10-12 weeks, 6-7°C), and grown under greenhouse conditions ( $20 \pm 4^\circ\text{C}$ ,  $80 \pm 10\%$  of humidity and a 16h photoperiod under ambient light with supplemental lighting when ambient light levels outside were below 3 klux).

## Microscopy

Visual examination of the samples was completed by observations under a Leica LAS stereomicroscope (Leica Microsystems) equipped with a digital camera.

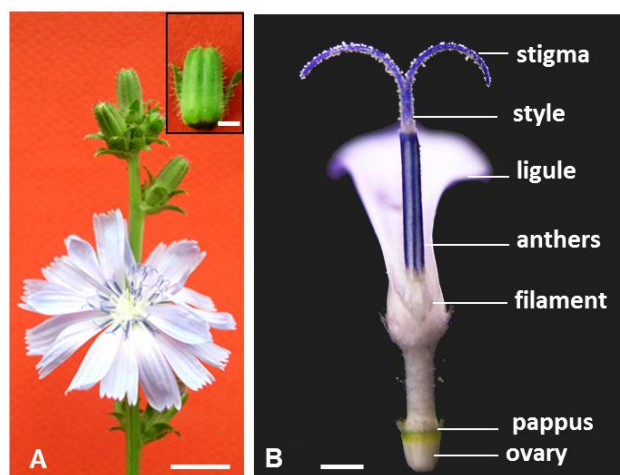
For histological analysis, capitulum buds of 0.5 to 12 mm in length were collected and distributed into different size classes according to the bud length measured between the base of the receptacle and the top of the bud after removing the external bracts. For samples measuring below 0.5 mm, the length was determined under microscope using the micrometer graduation. The buds were fixed in FAA solution (90 ml ethanol 70%, 5 ml formalin 37%, 5 ml acetic acid), dehydrated with an increasing series of ethanol concentrations and a final step in ethanol/butanol (1/1). Capitula were infiltrated with butanol and embedded in glycol methacrylate (Technovit 7100®, Heraeus Kulzer). Blocks were sectioned at 4-5  $\mu\text{m}$  (Leica Microtome RM2065), stained with 1% Toluidine Blue O and observed by optical microscope (Olympus BH-2) equipped with a camera (Olympus CAMEDIA c-4000). At least five capitulum buds from the same size class were observed under microscope in order to determine the corresponding stage of development.

Sections were stained with periodic acid Schiff (PAS) for starch detection, and for callose detection, sections were incubated in decolorized aniline blue and observed under fluorescence microscope (Olympus BH2-RFCA). Pollen viability was estimated by using Alexander stain (Alexander 1969).

## Results

### Inflorescence and flower morphology

As in other Asteraceae, the flowers of *C. intybus* are aggregated into heads. At anthesis the capitulum comprises 15-25 hermaphrodite ligulate florets (Fig 1A) surrounded by involucre bracts. The anthers are blue and white and form a column surrounding the style (Fig 1B). Each of the five stamens is attached to the corolla by the base of its filament. The pistil comprises a unilocular ovary and a style terminating in two (rarely three) stigmatic lobes (Fig 1B). The calyx is reduced to pappus consisting of a ring of small scales and the corolla consists of a ligule with five fused petals (Fig 1B). The flower development lasts approximately 15 days from the flower initiation to anthesis and every capitulum opens only for one day, all the florets being synchronously opened (communication from Theo Hendriks and David Gagneul).



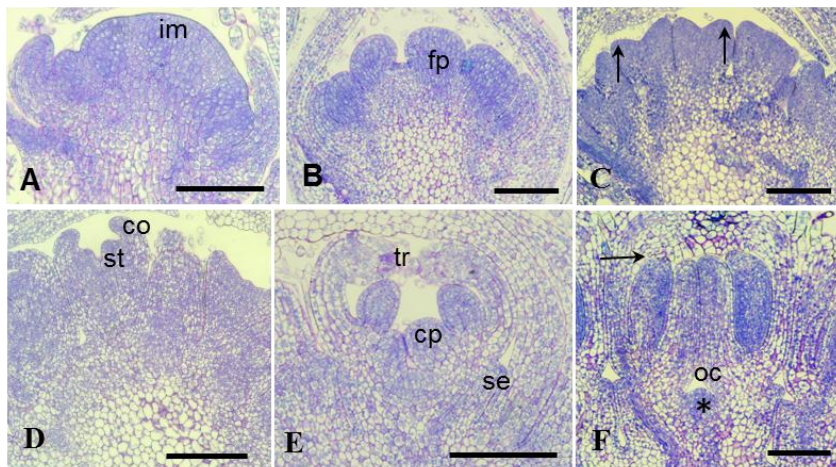
**Fig. 1** Overview of inflorescence and fertile flower structure. **A** Various stages of capitulum development on a branch with an opened capitulum at anthesis showing ligulate florets. *Inset*: capitulum with the external bracts partially removed prior to length measurement. **B** The anthers form a column through which the stigma lobes and style move upward brushing the pollen grains. The stamens are attached to the ligule and the inferior ovary bears a scaly pappus. *Bars* **A**: 1 cm, *inset*: 1 mm, **B**: 1 mm

## Flower organs development in fertile *Cichorium intybus* plants

The morphological events during flower development were examined and characterized starting from the appearance of the flower meristem until anthesis. Based on events observed under light microscope, the developmental process in the fertile flower was divided into 16 stages corresponding each to a morphological marker starting from the emergence of the floral meristem and ending with the flower senescence (Table 2).

### *Flower organ initiation*

From the domed inflorescence meristem (Fig 2A) the flower primordia were initiated acropetally and became flattened at their distal part (stage 1, Fig 2B). Initiation of the primordia of the floral organs occurred sequentially and began at stage 2 by formation of the corolla primordium at the periphery of the terminal apex (Fig 2C). The primordia that will form stamens appeared at stage 3 (Fig 2D) and at stage 4 the stamens became stalked (Fig 2E), the gynoecium appeared and rapidly developed two upward bulges which formed the two carpel primordia while the petals developed several trichomes at their apex, bent inward and covered the growing stamens.



**Fig. 2** Flower organ initiation (stage 1-5). **A** Inflorescence meristem dome (im) is established **B** Stage 1: The flower primordia (fp) emerge from the inflorescence meristem **C** Stage 2: The corolla is initiated at the margin of the flower primordium apex (arrows) **D** Stage 3: The stamen primordia (st) are initiated under the corolla (co) **E** Stage 4: The stamens are stalked, sepals (se) are initiated and the carpel lobes (cp) emerge, trichomes (tr) develop at the top of the petals **F** Stage 5: The carpel lobes and stamens grow and attain the same height (arrow). Ovary cavity (oc) is formed and an ovule is being initiated (\*). Bars 100  $\mu$ m



*CHAPITRE I*

Table 2 Comparative development of flower organs in relation to their size and histology

<i>Bud length (mm)</i>	<i>Stage</i>	<i>Petals, sepals and stamens</i>	<i>Carpel</i>
<0.2*	1	Flower primordia initiation	-
0.2-0.3*	2	Petal primordia initiation	-
0.3-0.4*	3	Stamen primordia emergence, petals bending	Carpel primordia initiation
0.5	4	Stalked and rounded stamen, trichomes differentiation on petals, sepal primordia initiation	Initiation of ovary cavity
0.6-0.7	5	Oval shaped stamen in cross section, differentiation into anther and filament, differentiation of archesporial tissue	Elongation and fusion of carpels up to the height of the stamens
0.8-1	6	Four-lobed anther, filament elongation and vascularization of anther, formation of sporogenous cells and one parietal cell layer	Initiation of ovule
1.2-1.4	7	Appearance of early pollen mother cells (pmc) and second parietal cell layer	Ovule starts bending, primary archesporial cell differentiation
1.5-2	8	Four distinguishable anther layers, about 50 pmc longitudinally aligned in each locule, enlargement and vacuolation of tapetum	Initiation of the integument
2-2.5	9	Callose deposition around pmc, meiosis	Integument folding
2.5-3	10	Tetrads of microspores, crush of middle layer by the enlarging tapetum, nuclear division in tapetum cells	Increase in size of megaspore mother cell (mmc), curvature of ovule 135°
3-4	11	Release of microspores, degradation of callose, disappearance of middle layer, tapetal cell intrusion in the locule	End of ovule curvature, micropyle formation, callose deposition around the mmc, vascularization of raphe
4-5	12	Vacuolate microspore, widening of endothecium, start of septum disintegration	Meiosis, differentiation of integumentary tapetum (endothelium)
6	13	First pollen mitosis, start of starch accumulation in the pollen grain, secondary thickenings of endothecium cell wall, anthocyanin biosynthesis in the anther	Linear tetrad of megaspores, degeneration of the three micropylar megaspores
7	14	Two-celled pollen grain, complete degeneration of tapetum,	Mitosis in the embryo sac mother cell, nucellus degeneration, cell wall thickening in the integument, pigmentation in the style
8-9	15	Tricellular pollen grain, complete disintegration of the septum, stomium opening, release of pollen grains in the locule	8-nucleate embryo sac, elaboration of the egg apparatus, endothelium collapsing
10-12	16	Anthesis, rapid elongation of filament, pollen collection by the brushing hairs of the pistil, senescence of stamens by shrinkage of all its tissues	Mature embryo sac, rapid elongation of the style

\*: the bud length was measured under microscope

Sepals were initiated as small protuberances growing very slowly after initiation of the other floral organs (Fig 2E). The region that will give rise to the carpel walls formed the placenta initium (stage 5, Fig 2F) while the two carpel lobes elongated upwards rapidly and fused at their lower regions. At this stage the stamens were of the same height as the carpel lobes (Fig. 2F) and in cross section, the anther became oval as the filament and anther lobes started to differentiate (Fig 3C).

### *Anther and pollen development in fertile flower*

In cross sections, at stage 4, the rounded anther showed the three zones L1, L2 and L3 which will give rise to different anther tissues (Fig 3A). Archesporial cells differentiated beneath epidermis (L1) and at stage 5, the anther attained oval shape as the locules and the connectivum started to differentiate (Fig 3C). At stage 6, archesporial cells divided periclinally to give rise to the outer primary parietal layer and the inner one which formed the sporogenous cells (Fig 3D).

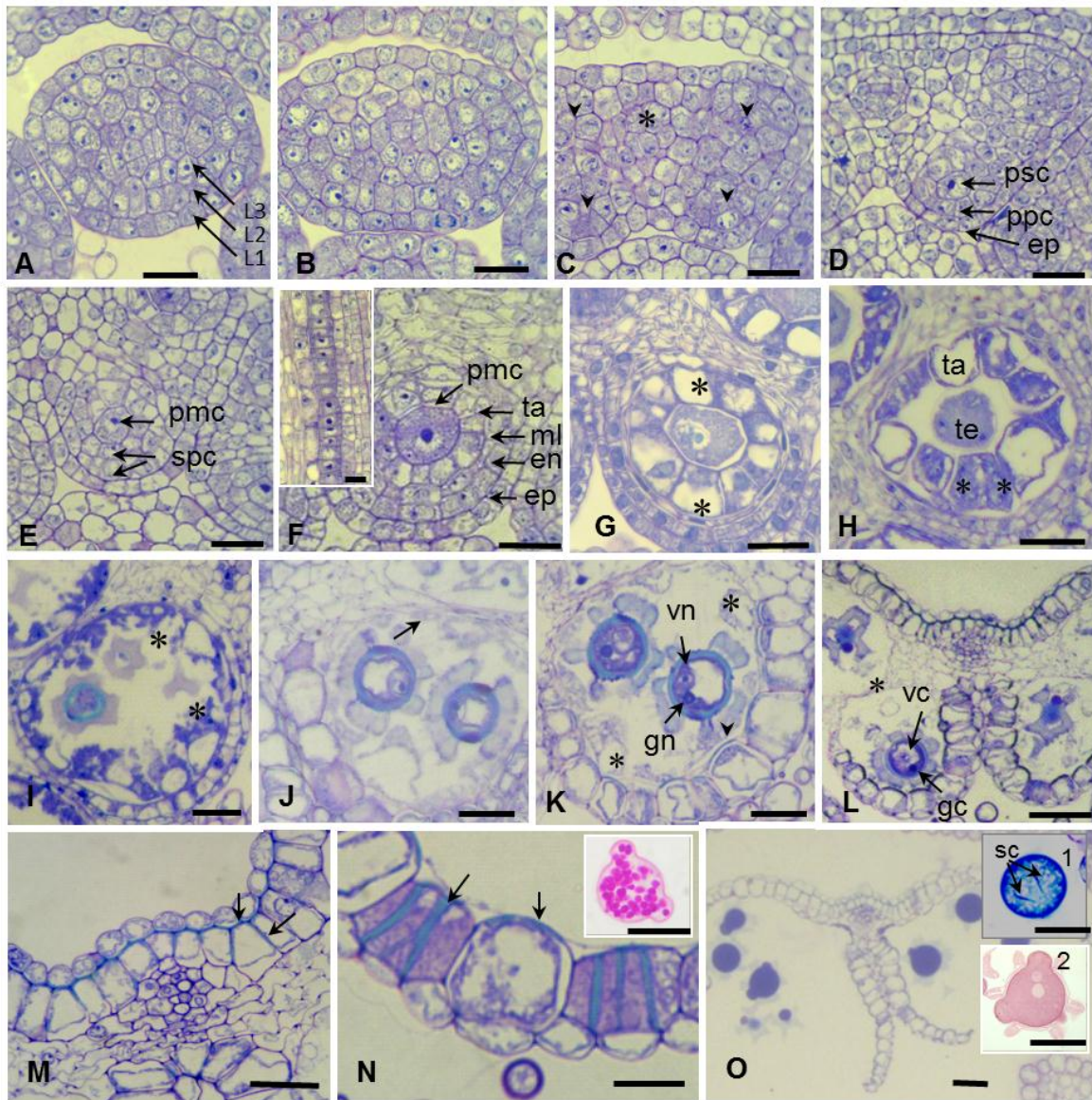
By periclinal divisions the primary parietal layer gave rise to two layers, (stage 7, Fig 3E) one of which formed the tapetum and the other later divided again to generate the endothecium and the middle layer, when the microspore became more distinguishable at late microsporocyte stage (stage 8, Fig 3F). The anther wall finally comprised four cell layers: epidermis, endothecium, middle layer and tapetum surrounding the longitudinal row of microsporocytes (Fig 3F, inset). The anther wall development was of dicotyledonous type as the endothecium and the middle layer developed from the same layer. Contrary to the tapetum which surrounded completely the sporogenous tissue, endothecium and middle layer did not form on the connectivum side of the locule (Fig 3F, G). Through mitosis the primary sporogenous cells formed secondary sporogenous cells which developed into pollen mother cells (pmc). These were longitudinally arranged in the anther locule so that in cross section only one microsporocyte could be observed. Before meiosis the meiocytes exhibited a dense cytoplasm (Fig 3G) and were surrounded by a thick callosic wall (data not shown). The tapetum cells began to expand just after the four layers were formed at microsporocyte stage and at stage 9, it underwent vacuolation and nuclear divisions which became prominent

during meiosis (Fig 3H). Meiosis led to microspore tetrads at stage 10 (Fig 3H) and the process of cytokinesis was of the simultaneous type.

In the same sporangia of the same anther the development was nearly synchronized but this was not always the case for anthers of the same flower. The microspores were released from the callose wall at stage 11; the inner and radial cell walls in the tapetum disintegrated and tapetal protoplasts surrounded the developing microspores in the anther locule (Fig 3I) whereas the transient middle layer started to degenerate. The released microspores had dense cytoplasm and large central nuclei (Fig 3I), exine developed except where the three apertures began to form and the pollen sculpturing continued with the spines formation. The endothecium cells underwent expansion at the onset of the early vacuolate microspore stage (stage 12, Fig 3J). After stage 12, endothecium cells exhibited a high vacuolation and bands of lignified secondary thickening were laid down in the cell walls while the tapetum degenerated (Fig 3K). The first mitosis in the microspore was unequal thus giving a binucleate pollen grain (Fig 3K) with the vegetative cell surrounding the peripheral generative cell (Fig 3L). At the binucleate pollen stage (stage 13, Fig 3K) some remains of tapetal cells were observed at the edge of the locule and kept their individuality as they did not fuse (Fig 3J, K), suggesting a non-periplasmoidal tapetum. It is also at this stage that blue pigmentation was established in the anthers precisely in the epidermal layer of the connectivum.

U-shaped fibrous bands formed in the outermost layer of the connectivum and they were oriented in opposite direction to those formed in the endothecium (Fig 3L, M, N). The septum which started to disintegrate at the uninucleate vacuolate microspore stage (Fig 3J) disappeared after the bicellular pollen stage, and then the stomium opening followed (stage 14). The second pollen mitosis occurred before anthesis and the pollen grains were released towards the inner side of the anther tube (stage 15, Fig 3O). Starch grains accumulated during the pollen maturation phase as revealed by PAS staining (Fig 3N, insert) but they had disappeared at anthesis (Fig 3O, inset 2). At anthesis, the second pollen mitosis had occurred and the two sperm cells were spindle-shaped (Fig 3O, inset 1). The tricellular pollen grains were brushed out of the anther tube by the elongating pistil moving upward through the

stamen column at anthesis. The anther wall consisted only of vacuolated endothecium and epidermis which shrunk during the stamen senescence later on.



**Fig 3** Anther wall and pollen development. **A** Stage 4: round stamen with three germ layers (L1, L2, L3). **B-C** Stage 5: oval shaped anther. The four-locule anther structure established by division of archesporial cells in the four corners (arrow heads). The connectivum is differentiating (\*). **D** Stage 6: under epidermis (ep) the primary sporogenous (psc) and primary parietal cells (ppc) are formed. **E** stage 7: early pollen mother cell (pmc). Two layers form the secondary parietal cells (spc). **F** Stage 8: late pollen mother cells. Four distinguishable anther layers: epidermis, endothecium (en), middle layer (ml), tapetum (ta). Inset: row of microsporocytes in a longitudinal section at this stage. **G** Stage

9: meiocytes enter meiosis, tapetum enlarges and becomes vacuolated (\*). **H** Stage 10: Tetrads of microspores (te). In some tapetal cells two nuclei are visible (\*). **I** Stage 11: release of microspores from callose wall and tapetal protoplasts intrusion in the locule (\*). **J** Stage 12: Uninucleate vacuolate pollen grain. The septum starts to disintegrate (arrow). **K** Stage 13: binucleate pollen grain (gn: generative nucleus, vn: vegetative nucleus). Endothecium expansion and cell wall thickening (arrow heads). The tapetal cell remains are still visible individually in the locule wall (\*). **L** Stage 14: bicellular pollen. (gc: generative cell, vc: vegetative cell). The septum is almost fully disrupted (\*). **M** Magnification of the connectivum region at stage 14 showing U-shaped secondary thickenings (arrows). **N** Magnification of the locule wall showing expanded endothecium cells and their thickened cell walls (arrow heads). Inset: starch grains in the pollen stained by PAS. **O** Stage 15: tricellular pollen. Anther walls have completely opened. Inset 1 shows the two sperm cells in the pollen grain (sc: sperm cells) and in inset 2, carbohydrates in the pollen grain stained with PAS. Bars 20 µm

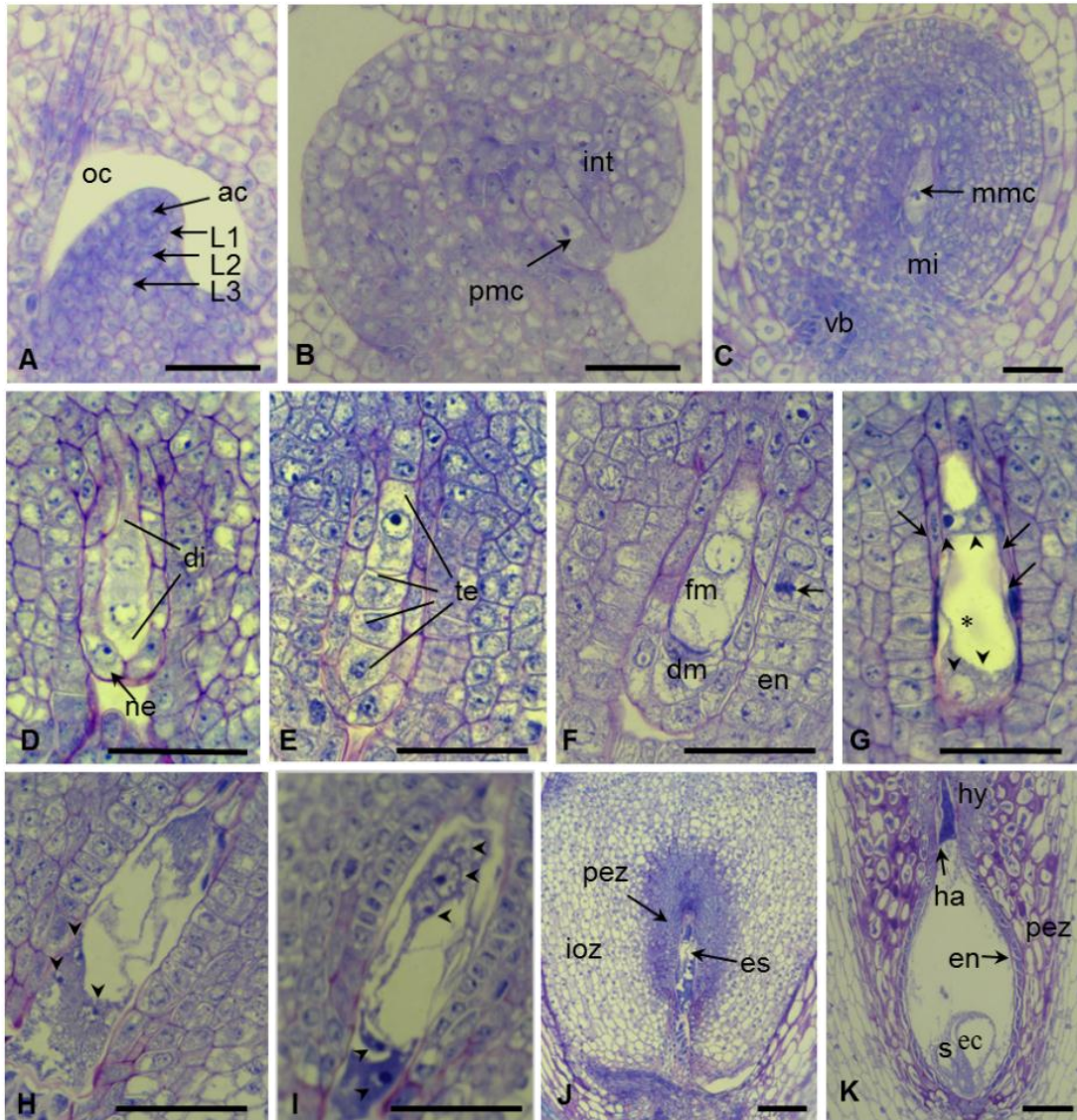
### *Carpel development and early stages of ovule development*

At the stage when the carpel lobes attained the height of the stamens, one ovule was initiated as a conical protuberance from the primordium of the placenta (Fig 4A). The ovary was bicarpellate, syncarpous and unilocular, and the ovule primordium was of the three-zonate type (Fig 4A). The ovule developed one integument initiated at the base of the nucellus during the curvature (Fig 4B) and the ovule became anatropous at the late megasporocyte stage (Fig 4C). The ovule was tenuinucellate as the nucellus consisted of one-layered epidermis and parietal cells were absent (Fig 4D). The nucellar cells elongated longitudinally while the megaspore mother cell (mmc) enlarged. One single vascular bundle differentiated in the ovule raphe and run up to the middle of the antiraphal side without penetrating inward as observed in serial sections.

### *Megasporogenesis and embryo sac development*

During early stages of flower development, one single cell, lying directly below the nucellar epidermis in the second histogenic layer (L2), differentiated into a primary archesporial cell (Fig 4A). It enlarged and differentiated to become the megaspore mother cell (mmc) (Fig 4B, C). The first division of the mmc resulted in a dyad of cells (Fig 4D) and the second in a

linear megaspore tetrad (Fig 4E). The embryo sac was monosporic as the three micropylar megaspores degenerated and the chalazal one functioned as embryo sac mother cell (Fig 4F). At the four-nucleate stage the epidermal layer of the nucellus broke down starting by the micropylar pole (Fig 4G).



**Fig 4** Some of the stages of ovule and megagametophyte development. Earlier stages are presented in Fig 1E-F. **A** Stage 7: one archesporial cell (ac) differentiates below epidermis layer within the ovary cavity (oc). **B** Stage 9: one single ovule integument (int) surrounds the megaspore mother cell (mmc). **C** Stage 10: late megaspore mother cell. Ovule maximum curvature is attained. The micropyle (mi) is formed. The vascular bundle (vb) differentiates by wall thickening. **D-E** Stage 11: meiosis. (D) The first meiotic division gives a dyad (di), the second meiotic division produces a tetrad of megaspores (te) (E). **F** Stage 12: three micropylar megaspores

degenerate (dm) and the functional one (fm) enlarges. Arrow indicates anticlinal divisions in endothelium (en) generating radially oriented cells. **G-I** Stage 13: mitosis in the embryo sac. **G** Four-nucleate embryo sac. A large vacuole (\*) is observed between the two chalazal nuclei and the two micropylar ones. The nucellar epidermis is degenerating (arrows). Arrow heads indicate the four nuclei after the second mitosis. **H** Stage 14: eight nucleate embryo sac. In this section only three nuclei (arrow heads) in the micropylar pole can be observed. **I** In this section the three antipodal nuclei are in the chalazal pole and two of the three micropylar nuclei are visible with dense material (arrow heads). **J** Stage 15: overview of the ovule at eight nucleate stage at anthesis. Embryo sac (es) is surrounded by the endothelium and the periendothelial zone (pez) with highly thickened cell walls and in the integument outer zone (ioz) the cells are thin-walled. **K** Mature embryo sac. In the chalazal end antipodal haustorium (ha) penetrates deeply into hypostase (hy). Endothelium (en) is crushed. Bars 50  $\mu\text{m}$

During the development of the embryo sac, the mitotic divisions of the nuclei were synchronous (Fig 4G, H) in the two poles of the embryo sac. The embryo sac development followed the *Polygonum* type pattern (Fig 4G-K): after the migration of the two polar nuclei in the coenocytic embryo sac (Fig. 3I) cellularization occurred and the embryo sac had seven cells and eight nuclei. In the micropylar zone a pear shaped egg cell was partially neighbored by two synergids of which micropylar ends penetrated in the micropyle. Antipodal wall projections penetrating deeply into the chalazal region resembling to haustorium were observed (Fig 4K). This structure was in contact with hypostase cells towards which rows of the chalazal integument cells seemed to converge. The mature embryo sac was in direct contact with the endothelium as the nucellar epidermis had completely degenerated. A general view of the unique integument exhibited two distinct zones (Fig 4J): the outer zone comprising rectangular, vacuolate and thin-walled cells and the inner zone surrounding endothelium (periendothelial zone) and exhibiting thick-walled and irregularly shaped cells.

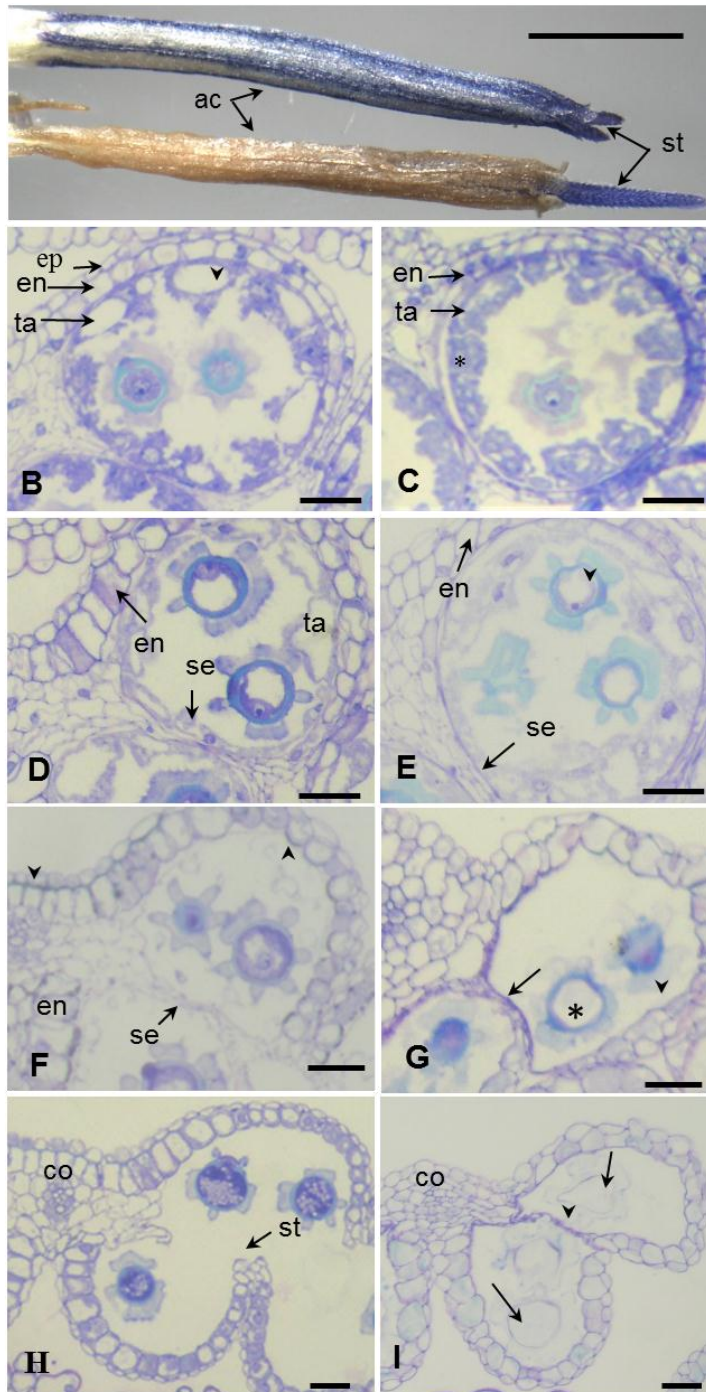
### **Anther development in the “524” CMS plants**

At anthesis, the flower of the male sterile line “524CC” was distinguishable from the fertile one by the brown color of its anthers (Fig 5A) and the absence of pollen grains on the style hairs. Stereomicroscopical observations revealed that aborting pollen grains, the connectivum and the filament were brown conferring this color to the whole stamen. Contrary to the male reproductive organs, the development of female reproductive organs

was normal and proceeded according the stages described in the fertile flower (Fig 4A-K). The anther development was similar in the male sterile 524CC and the fertile K59, CC or Jup plants up to meiosis (stage 9). The first visible deviation was the delay in vacuolation of the tapetum when the tetrahedral tetrads of microspores were formed (Fig 5C). After the microspores were released (stage 11), they exhibited a less dense cytoplasm and nucleus and a large vacuole formed before they started to abort (Fig 5E). In very few pollen grains of 524CC plant, the first mitosis occurred (stage 13) just before their degeneration. Contrary to the fertile anther, no starch accumulation was observed at any stage of pollen development of the male sterile 524CC plant and, at anthesis most of the pollen grains were shrunken without any observable protoplasm and with abnormally sculptured exine (Fig 5G, I).

When in the anther of the fertile plant the pollen was binucleate (stage 13), anthocyanin pigments were observed in the epidermis whereas no blue color was observed in the 524CC male sterile plant anther. Later on, the pollen color in the male sterile 524CC changed from white to brown and this color was extended to the connectivum until anthesis. Moreover, epidermis and endothecium cells exhibited shriveled shapes and no lignified thickenings were observed in the endothecium cell walls or in the sudepidermis of the connectivum (Fig 5G, I). The septum and stomium between adjacent locules which disappeared at the bicellular pollen grain in the fertile flower (Fig. 3M) shrank in 524CC anther but were not completely dissolved at anthesis, keeping the locule unopened and shriveled (Fig. 5I). However, contrary to anthers, the pistil developed similarly in the fertile and male sterile flowers.





**Fig 5** Anther and pollen development in fertile CC line and in “524CC” male sterile anther. **A** At anthesis, the fertile anther is blue colored and the sterile is brown, the stigma lobes (st) arising on the top of the anther column (ac) are normal and blue colored in both cases. (B, D, F and H: fertile anthers; C, E, G and I: sterile anthers). **B-C** Free microspore stage (stage 10). In fertile flower (B) the tapetum has larger vacuoles (arrow heads) and in (C) the vacuoles are numerous but smaller and less significant intrusion of tapetal cells is observed at this stage (\*). **D-E** Vacuolated uninucleate pollen grain stage (stage 11). The endothecium expansion is noticeable in (D) not in (E) where the pollen cytoplasm is diffuse (arrow head). **F-G** Two-celled pollen grain (stage 13) F: connectivum and endothecium cell undergo wall lignification (arrow heads) E: absence of cell wall lignification in the connectivum and endothecium, pollen abortion (\*), shrinkage of endothecium (arrow head) and septum not opened (arrow). The connectivum (co) and endothecium are

lignified and the anther is dehiscent. I: The septum and stomium are unopened (arrow head). The pollen grain is degenerated (arrows), the connectivum is not lignified and the anther is indehiscent. Bars 2 mm in A, 20  $\mu$ m in B-H and.

## Variety of flower phenotypes resulting from various crosses

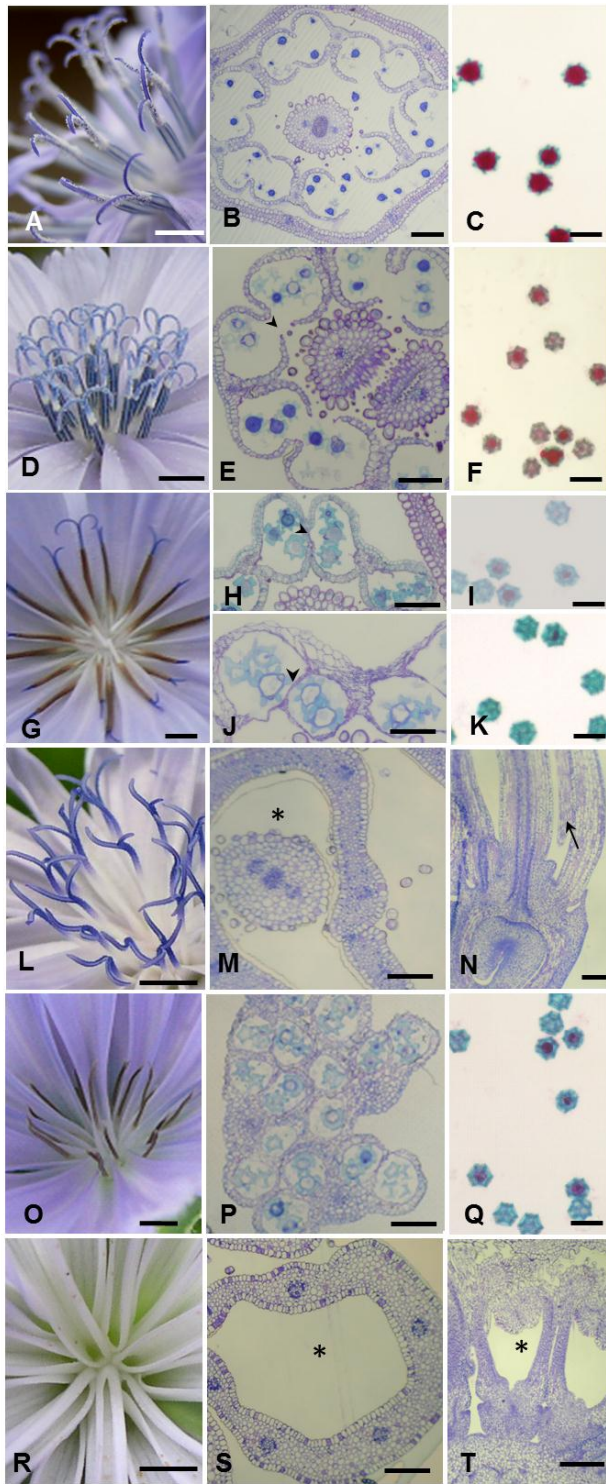
In view to introduce the CMS into the CC and Jupiter nuclear context, the 524CC male sterile plant was crossed with plants from Jupiter population and CC line plants and the progeny exhibited variable phenotypes. By considering the normal fertile flower as a reference, we categorized the flower morphologies of progenies into five classes and the respective frequencies of their occurrence are shown in Table 3.

Table 3 Frequency of different phenotypes issued from crosses with Jupiter and CC pollen donors

Cross combinations		Floral phenotypes in the progenies					Total
♀	♂	blue anther	brown anther	anther absent	style absent	anther, style absent	
		<i>Class 1</i>	<i>Class 2</i>	<i>Class 3</i>	<i>Class 4</i>	<i>Class 5</i>	
524CC	3xCC	0	24 <sup>+</sup> (3)	0	0	0	24
	3xJup	27 (6)	37* (2)	2 (2)	5 (1)	1(1)	72
	2xJup; 1xCC	1	22* (10)	0	1(1)	1(1)	25

+ belong to subclass 2b and \* belong to subclass 2a after cytological analysis. ( ) indicate the number of plants examined under microscope as described below and illustrated in Fig 6.

No segregation was observed in the progenies of the three backcrosses with CC plants as all the 24 obtained plants exhibited the brown anther phenotype whereas segregation was observed in the progenies when Jup was used as pollen donor for three successive crosses. Out of 72 plants obtained 27 and 36 plants exhibited blue anther and brown anther phenotypes respectively with additional severely altered phenotypes. When two Jupiter pollen donors and one CC are involved in the crosses, segregation was observed but most of descendants (22 out of 25) had brown anther phenotype.



**Fig. 6** Morphology of flowers and pollen viability in the parents and progenies of crosses with CC and Jupiter pollen donors. **A-C** Male fertile flowers: the anthers are blue and the stigma brushing hairs collect pollen grains at anthesis (A). Anther dehisces normally (B) and pollen grains are viable (C). **D-F** Class 1: the anthers are blue and the pollen grains collected can be seen on the stigma lobes (D). Anthers are dehiscent in E (arrow head) but pollen viability is reduced (F). **G-K** Class 2: the anther are brown, the pollen grains are not collected as it can be noticed on the stigma lobes and the style. In subclass 2a (H-I) the septum and stomium are disrupted but the opening of locules is not well achieved (arrow head in H) and most of pollen grains are not viable (I). In subclass 2b (J-K) the anthers remain indehiscent and the locule wall is shrunken (arrow head), no lignification of endothecium and connectivum (J) and the pollen grains are not viable (K). **L-N** Class 3: the pistil morphology is normal (L), cross section in the mature floret shows that no stamen develops (\* in M) and longitudinal sections of some florets shows some stamen initiation but no differentiation (arrow in N). **O-Q** Class 4: no style is observed (O). The anthers are indehiscent and stacked together (P). Non-viable pollen is shown in Q. **R-T** Class 5: no anther and style emerge in the corolla tube (\* in R and S). Longitudinal section of young floret buds show that stamens and carpels are not initiated (\* in T). *Bars* **A, D, G, L, O, R**; 2 mm, **B, E, H, J, M, N, P, S, T** 100  $\mu$ m; **C, I, K and Q** 50  $\mu$ m

Beside information provided by visual examination, histological observations allowed characterizing the five classes regarding the anther wall structure, pollen development and pollen viability by Alexander staining.

Class 1: The “*blue anther*” class which was macroscopically similar to the fertile phenotype (Fig 6A-B) exhibited blue anthers and pollen grains were more or less present on the stigma and style at anthesis (Fig 6D), but viable pollen grains were less abundant in the anther than in the normal flower (Fig 6C, F) and in some individuals, the blue color of the anthers was not stable and tended to turn brown. The anther walls development proceeded as in the fertile flower and at anthesis, dehiscence appeared normal (Fig 6E).

Class 2: The “*brown anther*” class without the blue pigment characteristic to the fertile anther. The brown color observed at anthesis was due to aborted pollen grains and the connectivum (Fig 6G). At histological level this class could be divided into two subclasses referring to the structure of the anther wall. In subclass 2a, endothecium cell walls were lignified but even though the dehiscence process occurred, no or very few pollen grains were collected by the brushing hairs at anthesis. Most of the pollen grains aborted and very few exhibited viability (Fig 6H, I). In subclass 2b the anther wall was exactly identical to that of the male sterile 524CC i.e. no lignification in the endothecium cell walls and in the connectivum which appeared shrunken. The anther is indehiscent and the pollen grains aborted and are non-viable (Fig 6J, K). Like in the class 1, the pistil development was normal.

Class 3: The “*anther absent*” class exhibited flowers with only carpel organs which developed normally (Fig 6L, M). However, in few mature flowers rudimentary anther structures could be seen in longitudinal section at the base of the corolla tube (Fig 6N). In this type of anthers, one or two locules were observed and that did not exhibit well differentiated walls; the microspores (when present) prematurely aborted before first pollen mitosis.

Class 4: The “*brown anthers, style absent*” class with brown and stacked anthers (Fig 6O-P). The style was absent or rudimentary but in some florets ovule was initiated and its development was arrested very early, meaning that the carpel development was severely

affected. The endothecium cell walls were not thickened and the anther remained indehiscent, the number of locules was variable from 2 to 4, pollen abortion started after meiosis and most of the pollen grains were non-viable at anthesis (Fig 6Q).

Class 5: The “*anther absent, style absent*” class exhibited the most altered flower phenotype because no structure related to stamen or pistil was observed in the corolla tube when the capitulum opened (Fig 6R-T) even though the ligule exhibited the same morphological features as in the normal flower. Longitudinal sections in a few number of young capitulum buds showed stamen and pistil primordia but they did neither elongate nor differentiate.

## Discussion

In this study the fertile flower development in *C. intybus* was analyzed to allow investigation about morphological alterations in the “524” male sterile line and in the progeny of crosses between this male sterile and different pollen donor plants. The flower development was divided into 16 stages from the flower initiation to anthesis according to morphological landmark and this allowed us to establish correlations between the events observed during anther and carpel development in the same floret. As the ovule is initiated later than the anther, timing in microsporogenesis seems to occur in advance on megasporogenesis so that the tetrads of microspores are formed in the anther while the megaspore mother cell is still enlarging and when the ovule has not acquired its anatropous position. However, during late stages of gametogenesis the embryo sac development proceeds so rapidly that at anthesis both the pollen grains and the embryo sac are mature in the same floret. The sequence of flower organ initiation (corolla-stamens-gynoecium-pappus) is in accordance with Harris (1995).

Anther wall differentiation was according to the dicotyledoneous type (Davis 1966) since the outer secondary parietal cell layer divisions gave the endothecium, one middle layer and the inner functioning as tapetum. Due to its considerable physiological importance the tapetum layer attracted attention of many authors (Davis 1966; Pacini and Keijzer 1989, Parish and Li 2010) and its variation among species has been considered to attempt establishing phylogeny of tapetum types among *Embryophyta* (Pacini et al. 1985). In the Asteraceae family the

plasmoidal (syn. invasive) tapetum is a common feature (Lersten 2004) even though this type of tapetum is rare in dicots. Pacini and Keijzer (1989) have characterized the *C. intybus* as intruding but according to these authors no periplasmodium was formed because the cells did not fuse, whereas Varotto et al. (1996) and Chehregani (2011) noticed that the tapetal cells fused. According to our observations a part of the cytoplasm remained parietally localized keeping individuality of respective cells, just before the tapetum is completely degenerated. Our results on tapetum behaviour are in agreement with Pacini and Keijzer (1989) as individual cells remains are still visible in the locule wall. Recently the occurrence of non invasive (i.e non plasmoidal) tapetal cells in Asteraceae has been reported in *Carthamus tinctorius* (Yeung et al. 2011), where a small population of tapetal cells is formed as a result of periclinal divisions in the tapetum but does not intrude in the locule. However, such divisions have not been observed in *C. intybus*, suggesting that the parietal cell structures observed correspond rather to remains of the unique tapetal cell population than to an additional cell population.

The ovary is unilocular, tenuinucellate, unitegmic, anatropous as in other members of Asteraceae (Pullaiah 1978; Funk et al. 2009). The monosporic embryo sac developed according to the *Polygonum* types as previously reported by Cichan and Palser (1982), and this feature is the most common in Angiosperms (about 70%) (Maheshwari 1950; Johri et al. 1992; Reiser and Fischer 1993). Though the polygonum embryo sac is the most common in the Asteraceae family, several developmental patterns of embryo sac development have been reported such as the *Adoxa* type in *Ligularia przewalskii* (Liu 2001a), the *Drusa* type in *Tussilago farfara* (Liu 2001b), the *Oenothera* type in *Dendranthema nankingense* (Teng et al. 2008), the *Fritillaria* type in *Gaillardia picta* (Maheshwari 1950) or the *Chrysanthemum cinerariaefolium* type I or II (Maheshwari 1950) which suggests a wide variation of this feature in this family.

During its development, the inner zone of the integument, termed periendothelial zone (Cichan and Palser, 1982), undergoes morphological modifications including cell wall thickenings and desintegration later on. This feature has been observed in other Asteraceae members such as *Sonchus* (Lavialle 1912), *Senecio* and *Centaurea* (Pandey 1978), *Vernonia* (Misra 1972) and *Hieracium* (Koltunow et al. 1998) and its function may be related to

embryo nutrient supply after undergoing liquefaction during embryo development (Koltunow et al. 1998).

The description of flower development in fertile plants provides a reference for understanding deviations that occur in the male sterile lines. Comparison of anther development in the fertile and “524” male sterile plants allowed us to identify the main morphological alterations that led to male sterility. A combination of alterations in the male sterile includes the limited tapetum intrusion, pollen degeneration after the free microspore stage, absence of lignification in the anther wall and in the connectivum, absence of anther dehiscence, absence of anthocyan pigments and premature shrinkage of the anther.

Anther development follows the same pattern in the fertile and male sterile “524CC” up to meiosis when in the latter, the tapetum start exhibiting less vacuolation before microspore degeneration which becomes visible at the vacuolate pollen stage. Tapetum vacuolation was reported in *Arabidopsis thaliana* to be a prominent feature during meiosis before its drastic reduction when the microspores are released from callose walls (Wu and Yang 2005) and these vacuoles were supposed to store enzymes required for callose digestion allowing the microspore release in the anther locule. In the 524-CMS plants, despite the absence of large vacuoles in the tapetum cells during meiosis and the limited intrusion of the tapetum cell protoplasts the microspores are normally released (which suggests that the callose is degraded) but further development is so altered that we can hypothesize a defect of tapetum in its contribution in microspore nutrition and maturation. The physiological involvement of tapetum in microspore degeneration in the 524-CMS plants should be investigated more profoundly by electron microscopy which can provide information on organelles structure modification in male sterile plants as examined in *Raphanus sativus* (Shi et al. 2010) where for example chromatin condensation at the periphery of the nucleus is reported.

Usually in normal flower development the late anther development stages consist of preparation of anthesis and pollen maturation for a successful pollen presentation when cells of the connectivum between the locules undergo lyses of their middle lamella and degenerate, leading to fusion of the locules and anther dehiscence (Keijzer 1987). All these processes are affected in the 524-CMS suggesting that required enzymatic action for locules

fusion is not well accomplished in addition to absence of endothecium cell wall thickenings which are reported to be essential in generating shearing forces required for stomium breakage in *Gasteria verrucosa* and *Lilium hybrida* (Keijzer 1987) and in *Arabidopsis* (Dawson et al. 1999; Scott et al. 2004; Cecchetti et al. 2008; Yang et al. 2008).

The 524-CMS plants do not exhibit the same anther phenotype as PET1-CMS from which it was obtained through fusion of protoplasts. The sunflower PET1 male sterile line is characterized by tapetum disorganization, degradation of microspores by the tetrad stage (Smart et al. 1994), and enlargement of the middle layer (Balk and Leaver 2001). Smart et al. (1994) reported that the PET1 phenotype might be related to expression of *orf522* in the meiocytes leading to their abortion. Considering that in the 524-CMS the microspores are normally released in the locule and the tapetum disintegrating lately compared to PET1-CMS, the cause of the developmental deviation in the two male sterilities is different. This is in accordance with the results of mitochondrial DNA structure analysis which demonstrated that *orf522* was absent in the 524-CMS genotype (Dubreucq 1999) suggesting that PET1-CMS and 524-CMS do not share the same molecular mechanism.

The anther color in the male sterile “524” flower is brown contrary to the fertile anther which is blue colored. It seems that the 524-CMS expression affects accumulation of pigments in the anther but the relationship between the lack of anthocyanin pigments and this cytoplasmic male sterility is still unclear. In fertile floret, the blue color in the anther epidermis appears at stage 13, i.e. when the pollen is bicellular and after cell wall lignification in the endothecium and connectivum, but in the male sterile 524, these events do not occur. Anthocyanins and lignins biosynthesis pathways share initial reactions that provide phenylpropanoid units by which those secondary metabolites are built. Therefore, absence of anthocyanins in the connectivum epidermis as well as lignification in connectivum and endothecium tissues of the male sterile anther may be a result of inhibition of a key step of the phenylpropanoid pathway. However in the male sterile 524, this inhibition is restricted to anthers as the pigmentation is not affected in other flower parts like pistil and petals which develop normally and exhibit anthocyanin pigments similarly to the fertile flower.



The progenies of crosses involving Jupiter and CC pollen donors as shown in Table 3 demonstrate a high diversity of floral phenotypes probably due to nuclear-cytoplasmic interactions. Given that the backcrosses between the cybrid 524 and CC line plants always produced male sterile progenies exhibiting homogenous flower morphology, the cytoplasm 524 was stable in the CC nuclear context which can consequently be considered as a maintainer line. Contrary to 524, another cybrid, named 411, produced more variable flower phenotypes when introduced in the CC line background, suggesting that the CMS 524 was more stable than CMS 411 in which instability of the mitochondrial genome has also been observed (Rambaud et al. 1997; Dubreucq et al. 1999). On the other hand, considering the flower morphology in the progeny obtained with Jupiter pollen donor, total or partial pollen viability and tendency to form blue colored anther and to undergo a normal dehiscence process show involvement of a restoration mechanism. Even if dehiscence occurred in the “*brown anther*” subclass 2a, very few pollen grains, brown colored, could be collected by the brushing hairs at anthesis because the degenerated pollen grains appeared to adhere to each other so that their free mobility was hindered when the style elongated. However, the opening of the anther in this class can be considered as a step in restoration process even if most of the pollen grains are non-viable in this phenotype. The variation of pollen grain viability, anther dehiscence and color in the progenies from Jupiter and the male sterile 524 suggests that the fertility restoration is inherited as a quantitative trait.

In natural gynodioecious populations the occurrence of intermediate phenotypes in terms of pollen production and viability is usually interpreted as a result of involvement of at least two loci or co-dominant alleles in the process of restoration (Van Damme, 1983; Ehlers et al. 2005; Dufayé et al. 2008). However, the occurrence of a fertility restoration mechanism for artificially created male sterility by fusion of protoplasts is striking and it is of great interest to investigate about the origin and distribution of the corresponding restoration alleles in the *C. intybus* species. How restoration alleles can be already present in Jupiter population before the mitochondrial genome modification happens through somatic hybridization in *C. intybus* species remains unclear, unless at least one of the following conditions is considered: (1) restoration alleles are currently used in this species to restore fertility in similar cytotypes that occur in non-investigated *C. intybus* populations; (2) during *C. intybus* evolution ancient

CMS-associated genes were naturally present in some populations but have not been maintained due to low fitness advantage of the females whereas restorer genes have been fixed in some genotypes (Ehlers et al. 2005; Touzet 2005); (3) when a mitochondrial function is altered by the CMS condition, certain molecules should be diverted from their normal function and become recruited in the process of fertility restoration. Such a mechanism may for instance involve the so-called pentatricopeptide repeat (PPR) proteins which are known to be essential for normal mitochondria gene expression (Hanson and Bentolila 2004; Chase 2006; Hayes and Mulligan 2011). Their role in fertility restoration was reported for example in *Petunia* (Bentolila et al. 2002), *Sorghum bicolor* (Klein et al. 2005), *Oryza sativa* (Wang et al. 2006), *Raphanus sativus* (Koizuka et al. 2003; Uytterwaal et al. 2008) and *Mimulus* (Barr 2010) acting by suppressing the cytoplasmic dysfunction probably by binding to specific transcripts (Lurin et al. 2004). Moreover, in the T cytoplasm-induced male sterility of maize, fertility can be restored by an aldehyde dehydrogenase (ALDH) protein (Liu et al. 2001) and recently, it was shown that in rice, fertility could be restored by a mitochondrial glycine-rich protein (Itabashi et al. 2011), which is indicative for the diversity of the fertility restoration mechanisms.

To understand the inheritance of the fertility restoration in the CMS-524 system, a QTL analysis is needed taking advantage of the availability of a chicory genetic map (Cadalen et al. 2010). Then, the next step will be analysing the progenies of crosses involving CC plants carrying the 524-cytoplasm and Jupiter and determining how the fertility restoration inheritance is controlled i.e. identifying the alleles of interest and relationships between them.

In conclusion, the information provided in this study on the flower development will be useful for analyzing expression of genes involved in the flower development, in general, and in the male sterilities occurring in *C. intybus* in particular. Moreover this study constitutes a starting point of the analysis of fertility restoration in the 524-CMS which may contribute to the understanding of CMS in chicory. In order to elucidate the restoration systems related to the CMS which have been generated in chicory, production of more important progenies allowing more elaborate phenotype and genotype analysis will be essential.

## Acknowledgements

The authors thank Bruno Desprez (Ets Florimond-Desprez, Cappelle-en-Pévèle, France) for providing seeds of the Koospol population and the male sterile plants used in this work and INRA for providing the seeds of “Jupiter” and “CC” used as male parents.

## References

- Alexander MP (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol* 44:117-122
- Balk J, Leaver CJ (2001) The PET1-CMS mitochondrial mutation in Sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. *Plant Cell* 13:1803-1818
- Barr CM, Fishman L (2010) The nuclear component of a cytonuclear hybrid incompatibility in *Mimulus* maps to a cluster of pentatricopeptide repeat genes. *Genetics* 184: 455-465
- Bentolila S, Alfonso AA, Hanson MR (2002) A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10887–10892
- Budar F, Pelletier G (2001) Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. *C R Acad Sci III* 324: 543-550
- Cadalen T, Mörchen M, Blassiau C, Clabaut A, Scheer I, Hilbert J-L, Hendriks T, Quillet M-C (2010) Development of SSR markers and construction of a consensus genetic map for chicory (*Cichorium intybus* L.). *Mol Breed* 25: 699-722
- Cecchetti V, Altamura MM, Falasca G, Costantino P, Cardarellic M (2008) Auxin regulates *Arabidopsis* anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell* 20:1760-1774
- Chase CD (2006) Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial–nuclear interactions. *Trends Genet* 23 81-90
- Chehregani A, Mohsenzadeh F, Ghanad M (2011) Male and female gametophyte development in *Cichorium intybus*. *Int J Agr Biol* 13: 603–606

- Cichan MA, Palser BF (1982) Development of normal and seedless achenes in *Cichorium intybus* (Compositae). . Am J Bot 69:885-895
- Conley CA, Parthasarathy MV, Hanson MR (1994) Effects of the *Petunia* cytoplasmic male sterile (CMS) cytoplasm on the development of sterile and fertility-restored *P. parodii* anthers. American Journal of Botany 81: 630-640
- Davis GL (1966) Systematic embryology of the angiosperms. J. Willey & Sons, New York
- Dawson J, Sözen E, Vizir I, van Waeyenberge S, Wilson ZA, Mulligan BJ (1999) Characterization and genetic mapping of a mutation (ms35) which prevents anther dehiscence in *Arabidopsis thaliana* by affecting secondary wall thickening in the endothecium. New Phytol 144:213-222
- Desprez B (1993) Recherche de méthodes d'obtention de plantes haploïdes chez la chicorée (*Cichorium intybus* L.). Thèse de l'Université de Paris VI
- Dubreucq A, Berthe B, Asset J-F, Boulidard L, Budar F, Vasseur J, Rambaud C (1999) Analyses of mitochondrial DNA structure and expression in three cytoplasmic male-sterile chicories originating from somatic hybridisation between fertile chicory and CMS sunflower protoplasts. Theor Appl Genet 99:1094-1105
- Dufay M, Vaudey V, De Cauwer I, Touzet P, Cuguen J, Arnaud JF (2008) Variation in pollen production and pollen viability in natural population of gynodioecious *Beta vulgaris* ssp. *maritima*: evidence for a cost of restoration of male function? J Evol Biol 21:202-212
- Ehlers BK, Maurice S, Bataillon T (2005) Sex inheritance in gynodioecious species: a polygenic view. Proc R Soc B 272:1795–1802
- Farbos I, Mouras A, Bereterbide A, Glimelius K (2001) Defective cell proliferation in the floral meristem of alloplasmic plants of *Nicotiana tabacum* leads to abnormal floral organ development and male sterility. Plant J 26:131-142
- Fitter JT, Thomas MR, Niu C, Rose RJ (2005) Investigation of *Nicotiana tabacum* (+) *N. suaveolens* cybrids with carpelloid stamens. J Plant Physiol 162: 225-235
- Fujii S, Toriyama K (2008) Genome barriers between nuclei and mitochondria exemplified by cytoplasmic male sterility. Plant Cell Physiol 49:1484–1494
- Funk VA, Suzanna A, Stuessy TF, Robinson H (2009) Classification of Compositae. In: Funk VA, Suzanna A, Stuessy TF, Bayer RJ (eds) Systematics, Evolution, and Biogeography of COMPOSITAE, International Association for Plant Taxonomy, Vienna pp 171-189.

- Hanson MR, Bentolila S (2004) Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell* 16:S154–S169
- Harris E (1995) Inflorescence and floral ontogeny in Asteraceae: a synthesis of historical and current concepts. *Bot Rev* 61: 94-121
- Havey MJ (2004) The use of cytoplasmic male sterility for hybrid seed production. In: Daniell H CC, eds (ed) *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*, Springer Publisher, The Netherlands, pp 617-628
- Hayes ML, Mulligan RM (2011) Pentatricopeptide repeat proteins constrain genome evolution in chloroplasts. *Mol Biol Evol* 28:2029-2039
- Horner H (1977) A comparative light- and electron-microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile sunflower (*Helianthus annuus*). *Am J Bot* 64:745—759
- Itabashi E, Iwata N, Fujii S, Kazama T, Toriyama K (2011) The fertility restorer gene, *Rf2*, for Lead Rice-type cytoplasmic male sterility of rice encodes a mitochondrial glycine-rich protein. *Plant J* 65:359-367
- Ivanov MK, Dymshits GM (2007) Cytoplasmic male sterility and restoration of pollen fertility in higher plants. *Russ J Genet* 43:354–368
- Johri BM, Ambegaokar KB, Srivastava PS (1992) *Comparative embryology of Angiosperms*. Springer, Berlin.
- Kamps TL, Mc Carty DR, Chase CD (1996) Gametophyte genetics in *Zea mays* L.: dominance of a restoration-of-fertility allele (*Rf3*) in diploid pollen. *Genetics* 142: 1001–10017
- Kaul MLH (1988) *Male Sterility in Higher Plants*. Spinger-Verlag, Berlin
- Keijzer CJ (1987) The processes of anther dehiscence and pollen dispersal I. The opening mechanism of longitudinally dehiscing anthers. *New Phytol* 105:487-498
- Klein RR, Klein PE, Mullet JE, Minx P, Rooney WL, Schertz KF (2005 ) Fertility restorer locus *Rf1* of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes a pentatricopeptide repeat protein not present in the colinear region of rice chromosome 12. *Theor Appl Genet* 111:994–1012
- Koizuka N, Imai R, Fujimoto H, Hayakawa T, Kimura Y, Kohno-Murase J, Sakai T, Kawasaki S, Imamura J (2003) Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein

- gene, *orf687*, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosena radish. *Plant J* 34:407-415
- Koltunow AM, Johnson SD, Bicknell RA (1998) Sexual and apomictic development in *Hieracium*. *Sex Plant Reprod* 11: 213–230.
- Laser KD, Lersten NR (1972) Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile Angiosperms. *Bot Rev* 38: 425-450
- Lavialle P (1912) Recherches sur le développement de l'ovaire en fruit chez les Composées. *Ann Sc Nat Bot* 9: 39-151
- Leclercq P (1969) Une stérilité mâle cytoplasmique chez le tournesol. *Ann Amélior Plant* 19:99-106
- Leino M, Teixeira R, Landgren M, Glimelius K (2003) *Brassica napus* lines with rearranged *Arabidopsis* mitochondria display CMS and a range of developmental aberrations. *Theor Appl Genet* 106:1156-1163
- Levieil C (1987) Etude cytologique et génétique de la reproduction sexuée chez la chicorée (*Cichorium intybus* L.) Thèse, Université de Paris-Sud
- Lersten NR (2004) Flowering plant embryology. Blackwell Publishing, Ames
- Li SQ, Wan CX, Kong J, Zhang ZJ, Li YS, Zhu YG (2004) Programmed cell death during microsporogenesis in a Honglian CMS line of rice is correlated with oxidative stress in mitochondria. *Funct Plant Biol* 31: 369–376
- Linke B, Börner T (2005) Mitochondrial effects on flower and pollen development. *Mitochondrion* 5:389–402
- Liu JQ (2001a) Embryology of *Ligularia przewalskii*. *Acta Bot Boreal Occident Sin* 21:900–904 (in Chinese, with English abstract)
- Liu JQ (2001b) Embryology of *Tussilago farfara* (Asteraceae: Senecioneae). *Acta Bot Boreal Occident Sin* 21:520–525 (in Chinese, with English abstract)
- Lurin C, Andrés C, Aubourg S et al. (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* Pentatricopeptide Repeat Proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16:2089–2103
- Maheshwari P (1950) An introduction to the embryology of Angiosperms. Mc Graw-Hill Book Co. Inc., New York
- Meric C, Dane F, Olgun G (2004) Histological aspects of anther wall in male fertile and cytoplasmic male sterile *Helianthus annuus* L. (Sunflower). *Asian J Plant Sci* 3:145-150

- Misra S (1972) Floral morphology of the family Compositae IV. Tribe Vernoniae- *Vernonia anthelmintica*. Bot Mag Tokyo 85: 187-199
- Murai K, Takumi S, Koga H, Ogihara Y (2002) Pistilloidy, homeotic transformation of stamens into pistil-like structures, caused by nuclear-cytoplasm interaction in wheat. Plant J 29:169–181
- Pacini E, Franchi GG, Hesse M (1985) The tapetum: its form, function, and possible phylogeny in *Embryophyta*. Pl Syst Evol 149: 155-185
- Pacini E, Keijzer CJ (1989) Ontogeny of intruding non-periplasmodial tapetum in the wild chicory, *Cichorium intybus* (Compositae) Pl Syst Evol 167:149-164
- Pandey AK, Singh RP, Chopra (1978) Development and structure of seeds and fruits in Compositae-Cichorieae. Phytomorphology 28: 198-206
- Parish RW, Li SF (2010) Death of a tapetum: A programme of developmental altruism. Plant Sci 178: 73–89
- Pullaiah M (1978) Studies in the embryology of Compositae III. The Tribe-Astereae. Bot Mag 91: 197-205
- Rambaud C, Bellamy A, Dubreucq A, Bourquin J-C, Vasseur J (1997) Molecular analysis of the fourth progeny of plants derived from a cytoplasmic male sterile chicory cybrid. Plant Breeding 116:481-486
- Rambaud C, Dubois J, Vasseur J (1993) Male sterile chicory cybrids obtained by intergeneric protoplast fusion. Theor Appl Genet 87:347-352
- Reiser L, Fischer RL (1993) The ovule and the embryo sac. Plant Cell 5:1291–1301
- Schnable PS, Wise RP (1998) The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. Trends. Plant Sci 3:175-180
- Scott RJ, Spielman M, Dickinson HG (2004) Stamen structure and function. Plant Cell 16:46-60
- Shi S, Ding D, Mei S, Wang J (2010) A comparative light and electron microscopic analysis of microspore and tapetum development in fertile and cytoplasmic male sterile radish. Protoplasma 241: 37–49
- Smart CJ, Monéger F, Leaver CJ (1994) Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower. Plant Cell 6:811-825

- Struckmeyer BE, Simon P (1986) Anatomy of fertile and male sterile carrot flowers from different genetic sources. *J Am Soc Sci* 111:965–968
- Teixeira RT, Farbos I, Glimelius K (2005) Expression levels of meristem identity and homeotic genes are modified by nuclear–mitochondrial interactions in alloplasmic male-sterile lines of *Brassica napus*. *Plant J* 42:731–742
- Teng NJ, Chen FD, Ma X, Hou XL (2008) Investigation on megasporogenesis, megagametogenesis and embryogenesis in *Dendranthema nankingense*. *J Nanjing Agric Univ* 31:47–51 (in Chinese, with English abstract).
- Touzet P (2005) Evolution des systèmes de reproduction et des génomes chez les angiospermes- le cas de la gynodioecie. Exemples choisis chez la betterave, les silènes et la ravenelle. Université de Lille I
- Uyttewaal M, Arnal N, Quadrado M, Martin-Canadell, Vrielynck N, Hiard S, Gherbi H, Bendahmane A, Budar F, H M (2008) Characterization of *Raphanus sativus* Pentatricopeptide Repeat Proteins encoded by the fertility restorer locus for Ogura cytoplasmic male sterility. *Plant Cell* 20: 3331-3345
- Van Damme JMM (1983) Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. II inheritance of three male sterility types. *Heredity* 50: 253-273
- Varotto S, Nenz E, Lucchin M, Parrini P (2001) Production of asymmetric somatic hybrid plants between *Cichorium intybus* L. and *Helianthus annuus* L. *Theor Appl Genet* 102:950-956
- Varotto S, Parrini P, Mariani P (1996) Pollen ontogeny in *Cichorium intybus* L. *Grana* 35:154-161
- Wang Z, Zou Y, Li X et al. (2006) Cytoplasmic male sterility of rice with Boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. *Plant Cell* 18:676–687
- Wu H, Yang M (2005) Reduction in vacuolar volume in the tapetal cell coincides with conclusion of the tetrad stage in *Arabidopsis thaliana*. *Sex Plant Reprod* 18:173–178
- Yamamoto M, Matsumoto R, Okudai N, Yamada Y (1997) Aborted anthers of *Citrus* result from gene-cytoplasmic male sterility. *Sci Hortic-Amsterdam* 70: 9-14



- Yang J-H, Qi X-H, Zhang M-F, Yu J-Q (2008) MADS-box genes are associated with cytoplasmic homeosis in cytoplasmic male-sterile stem mustard as partially mimicked by specifically inhibiting mtETC. *Plant Growth Regul* 56:191–201
- Yeung EC, Oinam GS, Yeung SS, Harry I (2011) Anther, pollen and tapetum development in safflower, *Carthamus tinctorius* L. *Sex Plant Reprod* doi 10.1007/s00497-011-0168-x
- Zubko MK, Zubko EI, Patskovsky YV, Khvedynich OA, Fisahn J, Gleba YY, Schieder O (1996) Novel 'homeotic' CMS patterns generated in *Nicotiana* via cybridization with *Hyoscyamus* and *Scopolia*. *J Exp Bot* 47:1101-1110



**CHAPITRE II - Contribution à l'analyse de la stérilité  
mâle nucléaire chez la chicorée : analyse cytologique**

## 1. Introduction

Chez *C. intybus*, une seule source de stérilité mâle nucléaire est aujourd'hui utilisée par les sélectionneurs. Il s'agit de la stérilité mâle de type « Edith » qui a été découverte dans un cultigroupe de chicorées et qui est transmis sous forme de trait récessif (Desprez et al. 1994). L'intérêt pour l'étude de cette stérilité mâle s'est manifesté lors d'une étude sur l'auto incompatibilité chez la chicorée. Les analyses de la descendance des croisements entre une plante mâle stérile K28 et l'hermaphrodite K59 (toutes les deux appartenant à la population Koospol), ont montré une ségrégation pour cette stérilité mâle et l'auto incompatibilité. La population Koospol avait été antérieurement utilisée pour produire une carte génétique consensus pour la chicorée (Cadalen, 2010) et les analyses préliminaires ont indiqué que les deux traits (c.à.d la stérilité mâle et l'auto incompatibilité) étaient contrôlés par deux loci différents.

Pour éliminer le risque de pseudo autocompatibilité (quelques cas d'autofécondation au sein des plantes auto incompatibles) lors des croisements, les plantes mâles stériles issues de cette descendance ont été utilisées pour déterminer les haplotypes du locus-S des autres plantes (Quillet et al. 2011 en prép.). A cause de l'importance de ces plantes mâle stériles dans cette étude, mais aussi dans un cadre d'études fondamentales, il a été envisagé de caractériser la stérilité mâle nucléaire « Edith » et d'identifier la mutation du gène responsable de ce phénotype.

Comme étape préliminaire pour la caractérisation fonctionnelle de ce gène, nous avons analysé au niveau cytologique, les modifications qui ont lieu dans les anthères des plantes qui portent la stérilité « Edith » par rapport aux anthères des plantes hermaphrodites K59. La méthode utilisée pour traiter les échantillons est la même que celle qui a été utilisée pour les analyses de la smc décrite précédemment.

## 2. Résultats

Macroscopiquement, par rapport aux anthères de K59 (Fig 1-B), les anthères de K28 sont de couleur bleue comme celles de K59 mais sont de taille plus petite (Fig 1C, E). Il n'y a pas de grains de pollen observés sur le pistil de K28 (Fig 1D) et dans certaines fleurs, le passage du style à travers le tube staminal se fait difficilement, si bien qu'il se recourbe à la base du manchon formé par les anthères (Fig 1F).

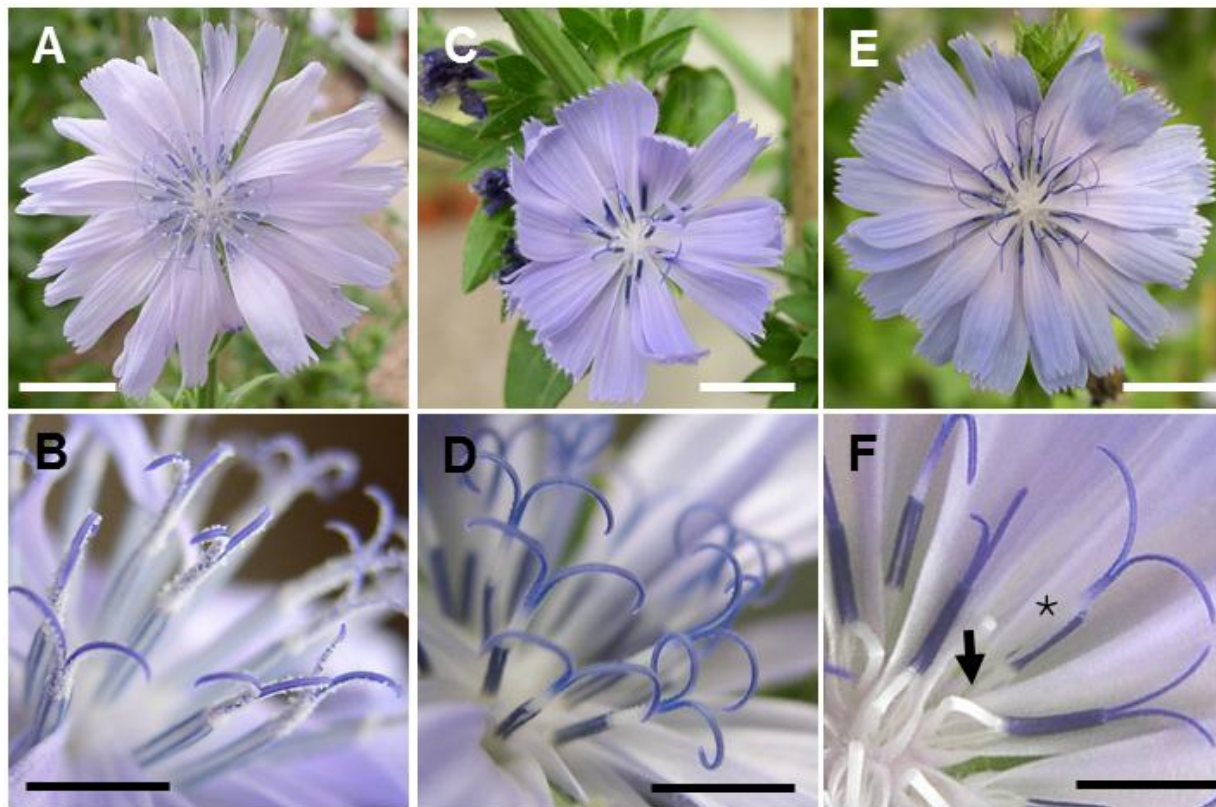


Fig 1 Capitules de la chicorée fertile K59 (A-B) et de la chicorée mâle stérile K28 (C-F) à l'anthèse. A-B: le capitule de K59 porte des fleurs avec des anthères déhiscentes avec des grains de pollen visibles sur le style et le stigmate C-D: capitule de K28 dont la taille est relativement réduite avec des anthères bleues mais sans grains de pollen sur le style et le stigmate. E-F : dans un capitule d'un descendant mâle stérile du croisement K59 x K28, la base du style est recourbée (flèche) car, incapable de traverser le tube staminal et le manchon des anthères est rompu par le pistil au cours de son élongation (\*). Bar = 1 cm

L'examen microscopique des coupes transversales et longitudinales des boutons inflorescentiels correspondant à deux jours avant l'anthèse révèle l'absence totale des grains de pollen chez la plante mâle stérile K28 et les sacs polliniques restent fermés (Fig 2C). A l'intérieur de chaque sac pollinique chez la plante mâle stérile, des cellules de la couche moyenne présentent de larges vacuoles et au centre, les cellules du tapis subissent une dégénérescence. Souvent, entre les cellules du tapis, des zones densément colorées au bleu de toluidine sont visibles et correspondent aux restes de microspores dégénérées (Fig 2C, D).

K59

K28

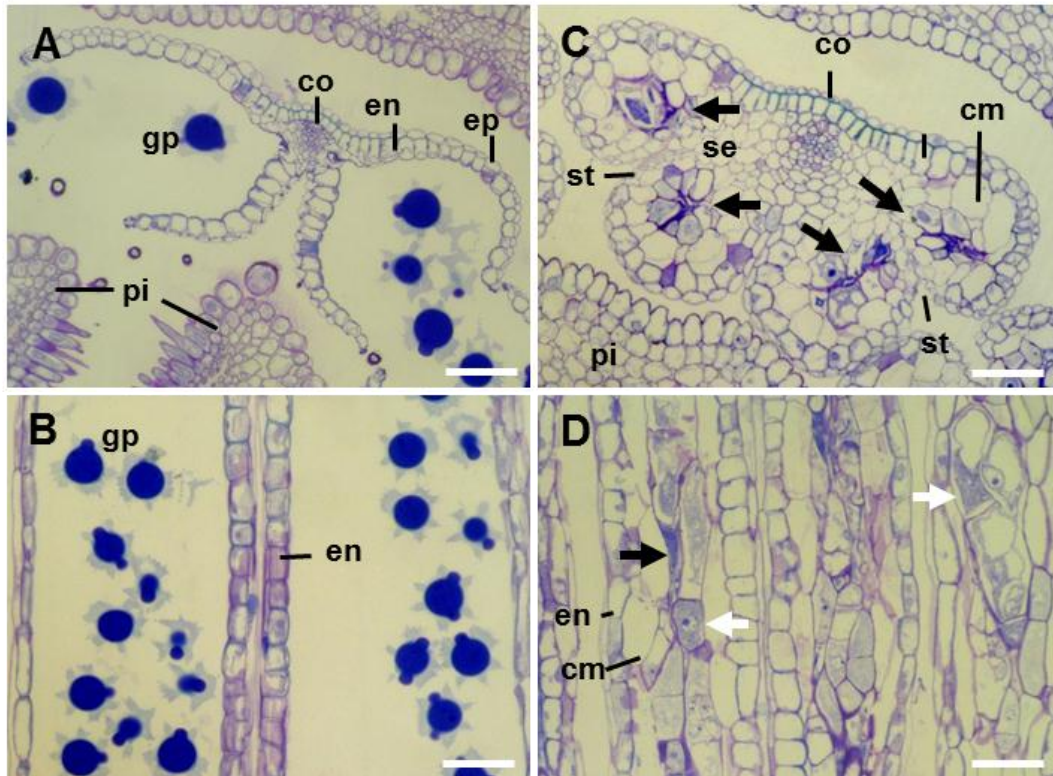


Fig 2 Structure de l'anthere à deux jours avant l'anthèse chez la chicorée fertile K59 (A–B) et la mâle stérile K28 (C–D). A: grains de pollen (gp) libérés de la loge pollinique pour ensuite être balayés par le pistil (pi). A ce stade, la paroi de l'anthere ne comporte que l'épiderme (ep) et l'endothécium (en). Le connectif (co) et l'endothécium sont lignifiés. B: coupe longitudinale de l'anthere de K59. C: les restes des microspores dégénérées et le tapis sont écrasés (flèches) par la couche moyenne (cm). Le connectif est lignifié mais dans l'endothécium, la lignification est moins visible que dans K59 Le septum (se) est persistant, le stomium (st) est rompu normalement mais l'anthere ne s'ouvre pas. D: coupe longitudinale montrant des cellules du tapis en dégénérescence avec un cytoplasme faiblement coloré par le bleu de toluidine (flèches blanches). Les restes des microspores dégénérées sont densément colorés en bleu (flèche noire). Bar= 50  $\mu$ m. A ce stade, le connectif semble normal et le septum intact, seul le stomium manifeste des signes de désintégration (Fig 2C). Par ailleurs, le connectif se développe normalement et présente l'épaississement ligno-cellulosique caractéristique mais celui-ci est moins apparent au niveau de l'endothécium si on le compare aux anthères des fleurs fertiles du type sauvage (K59) (Fig 2A, C).

Pour identifier le stade auquel la stérilité mâle commence à se manifester dans l'anthere, nous avons observé les coupes des différents boutons correspondant aux stades de différenciation de l'anthere dans K28 et K59 et nos observations ont montré que jusqu'au stade de microsporocytes aucune différence n'a été observée (Fig 3). Les quatre couches de la paroi de l'anthere sont formées normalement et les microsporocytes forment une rangée longitudinale continue de 50 microsporocytes à l'intérieur de chaque sac pollinique (Fig 3A-C).

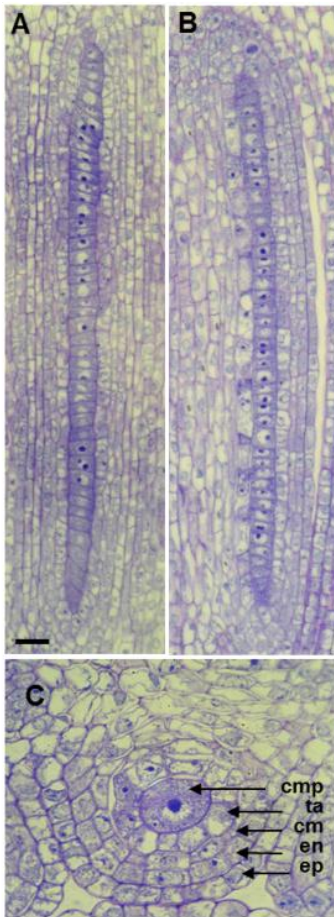


Fig 3 Organisation histologique de l'anthere de la chicorée fertile K59 (A) et de la chicorée mâle stérile K28 (B) au stade de microsporocytes en coupe longitudinale. C: Coupe transversale montrant les quatre couches caractéristiques de l'anthere à ce stade: l'épiderme (ep), l'endothécium (en), la couche moyenne (cm) et le tapis (ta) entourant une rangée de cellules mères des grains de pollen (cmp) ou microsporocytes.  
Bar =20  $\mu$ m

Les différences entre K28 et K59 deviennent évidentes lorsque les microsporocytes entrent en méiose. En effet, dans K28, les cellules du tapis sont fortement vacuolisées mais présentent un cytoplasme moins dense que dans K59 et elles restent uninucléées jusqu'à la méiose. Cependant, les divisions méiotiques semblent se faire normalement chez K28 comme chez K59 car les tétrades sont formées, même si leur aspect semble irrégulier.

Pendant la méiose chez K28, les cellules de la couche moyenne deviennent vacuolisées et larges (Fig 4K, L) puis les microspores subissent une dégénérescence. Leurs restes sont écrasés par les cellules du tapis, elles-mêmes poussées vers l'intérieur par la couche moyenne et dont les cellules persistent en augmentant de volume (Fig 4Q-T).

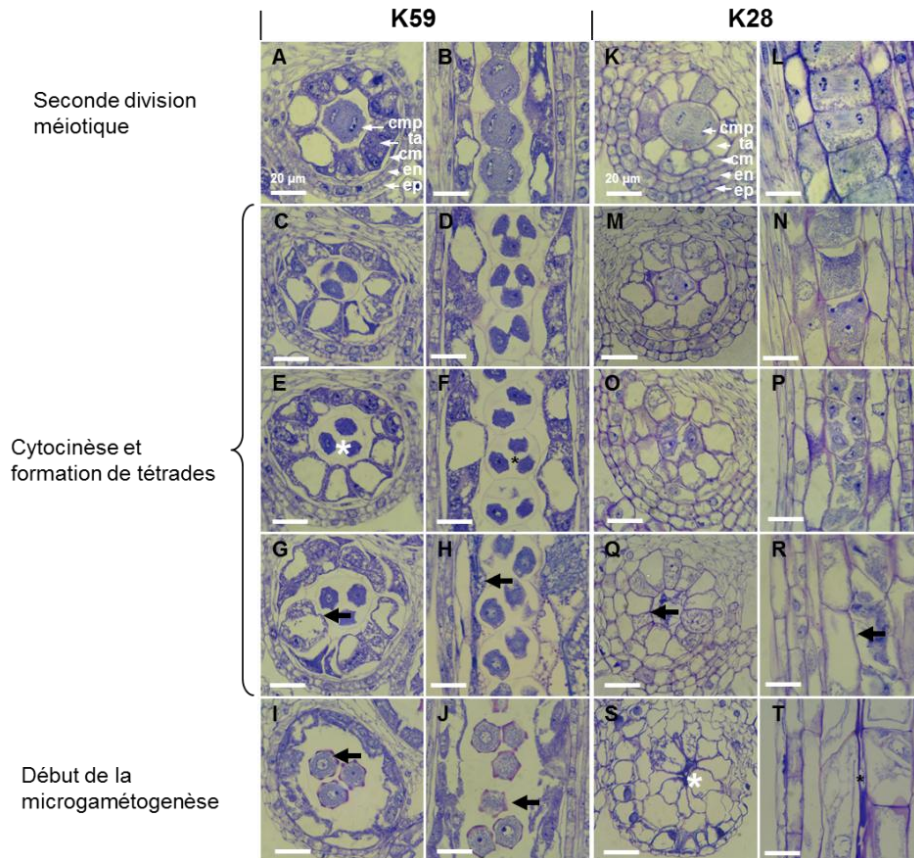


Fig 4 Modifications cytologiques après la méiose dans l'anthere fertile de K59 et dans l'anthere mâle stérile de K28 (K-T). A-J: Après la seconde division méiotique, les microspores forment des tétrades (A-D). Chaque microspore est isolée de ses voisines par une couche de callose (\*) (E, F). Les cellules du tapis sont densément colorées par le bleu de toluidine et perdent leurs parois interne et tangentielle (G, H) (flèche). Autour de chaque microspore une paroi commence à se former (I-J) (flèche). K-T: après la seconde division méiotique les microspores forment des tétrades (K-N) puis commencent à dégénérer sans être complètement séparées les unes des autres (O-P). Les cellules du tapis sont moins colorées par le bleu de toluidine, elles gardent leurs parois internes (Q, R) et persistent sous forme très vacuolisée jusqu'aux stades tardifs du développement. Les restes des microspores dégénérées sont visibles au centre du sac pollinique (S, T) (\*) Bar= 20 $\mu$ m



Pour bien visualiser la morphologie des méiocytes et des microspores dans les anthères de K28, la détection de la callose a été faite en utilisant l'aniline bleue décolorisée (Fig 5). Dans les deux types d'anthères (K28 et K59), de la callose est présente autour des microsporocytes juste avant leur entrée en méiose mais le dépôt se fait de façon irrégulière chez K28. Après la deuxième division méiotique, la callose est déposée entre les microspores mais elle est plus fine chez K28, laissant même à certains endroits un contact direct entre les microspores et le tapis. Juste après la méiose, dans K28, les microspores ont dégénéré sans être libérées de la callose, si bien que dans les anthères plus âgées, à part quelques résidus des microspores dégénérées, seules les cellules du tapis restent visibles au centre du sac pollinique.

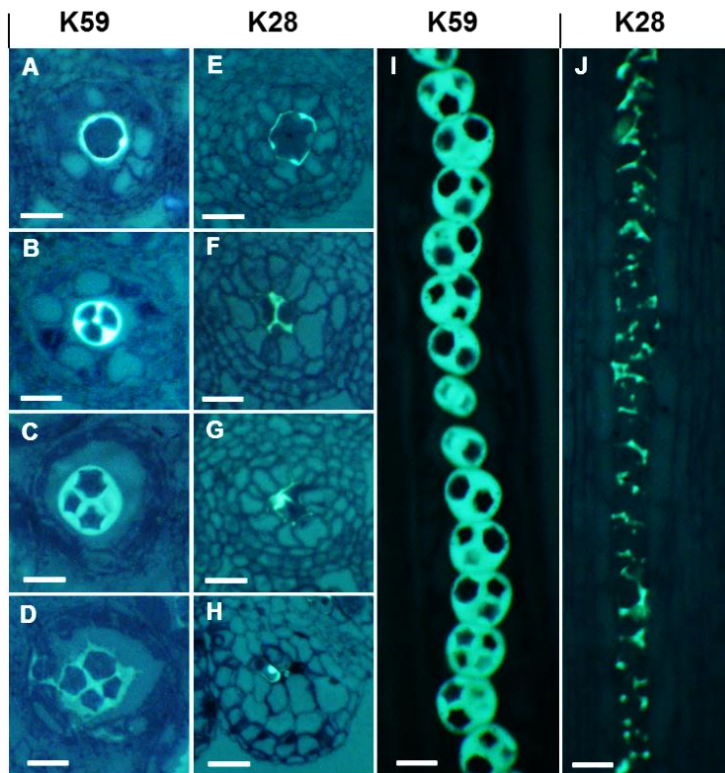


Fig 5 Disposition du dépôt de callose pendant et après la méiose dans l'anthère de K59 (A-D, I) et dans l'anthère de K28 (E-H, J). Chez K59, une couche de callose entoure la tétrade de microspores (A) puis sépare les quatre microspores de chaque tétrade (B). La callose disparaît progressivement alors que les microspores commencent à former une paroi (C, D). Chez K28, une mince couche de callose entoure la tétrade (E) puis isole les microspores (F) mais de façon moins nette que chez les plantes fertiles (G, H). Le dépôt de callose autour et entre les microspores chez K59 est régulier dans l'anthère fertile (I) alors que dans l'anthère stérile, il est irrégulier et moins intense (J). Bar= 20 $\mu$ m

### 3. Discussion

D'après les modifications observées chez les plantes mâles stériles, la stérilité mâle de type « Edith » se manifeste par une altération du développement du tapis, une dégénérescence des microspores juste après le stade tétrade et la persistance de la couche moyenne. Normalement, chez *C. intybus*, après la méiose, les cellules du tapis perdent leur paroi et leur protoplasme envahit l'espace intérieur du sac pollinique en entourant les microspores (Pacini & Keijzer, 1989; Varotto et al. 1996) pour fournir les substances nécessaires à leur développement en grain de pollen (Bedinger, 1992; Wu and Yang, 2005). Dans les plantes qui portent la stérilité de type «Edith », les cellules du tapis gardent leur paroi et restent fortement vacuolisées avant la dégénérescence qui se fait tardivement, ce qui suggère une déficience dans leur interaction avec les microspores.

Alors que dans le développement de l'anthere dans les plantes de K59, la couche moyenne a une existence transitoire (car elle disparaît normalement dès que la méiose est terminée), cette couche subit un élargissement considérable et persiste même jusqu'à l'anthere dans les plantes de K28. Les cellules du septum, qui normalement se résorbent pour permettre l'ouverture du sac pollinique restent persistantes dans K28. En examinant le mécanisme de la déhiscence des anthères chez *Gasteria verrucosa*, Keijzer (1987) a mentionné le rôle mécanique joué par l'expansion du tapis et la présence des grains de pollen qui envahissent l'espace intérieur du sac pollinique, dans la rupture des cellules du septum. Ainsi, l'absence des grains de pollen et l'altération du tapis pourraient expliquer la persistance du septum dans la paroi de l'anthere de la plante K28.

Comme les premiers signes d'altération du développement de l'anthere s'observent au niveau du tapis, on pourrait penser que la dégénérescence des microspores est une des conséquences indirectes des déficiences au niveau du tapis, étant donné le rôle de ce tissu dans la libération des microspores par dégradation de la callose ainsi que leur nutrition au cours de leur développement (Pacini et al 1985).

Les résultats de ces analyses cytologiques ont permis de comparer la stérilité mâle «Edith» aux autres mutants déjà identifiés chez les espèces modèles pour proposer les gènes candidats impliqués dans ce phénomène. En effet, en comparant les perturbations cytologiques et les stades auxquels elles surviennent chez la plante mâle stérile K28 avec celles observées chez les mutants mâles stériles chez *Arabidopsis* et le riz (Jung et al, 2005; Zhang et al, 2006), deux

gènes candidats ont été sélectionnés, *DYT* (*DYSFUNCTIONAL TAPETUM*) et *AMS* (*ABORTED MICROSPORES*). En particulier, les mêmes événements dans un même timing ont été observés chez le mutant *dyl1* d'*Arabidopsis* (Fig. 6) ce qui a suscité un intérêt particulier pour le gène *DYT*.

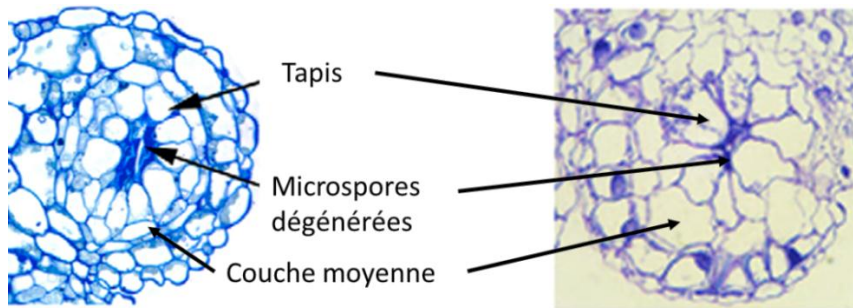


Fig 6 Comparaison histologique de l'anthère du mutant *dyl1* d'*Arabidopsis* et de K28. Au centre du sac pollinique, les microspores dégénérées sont écrasées à l'intérieur du tapis très vacuolisé entouré par la couche moyenne qui est persistante.

Par la suite, les analyses moléculaires ont pu montrer que la mutation conférant la stérilité mâle de type « Edith » chez la chicorée est causée par un transposon qui a été localisé dans un gène *CiDYT* orthologue de *DYT* d'*Arabidopsis* et codant un facteur de transcription de type bHLH (Quillet et al, 2011 en prép.). Ce gène est impliqué dans le développement et le bon fonctionnement du tapis staminal.

Si on compare les deux stérilités mâles étudiées chez la chicorée (la smn « Edith » et la smc « 524 »), on remarque qu'elles se manifestent d'une manière totalement différente. En effet, même si dans les deux cas les microspores sont formées, elles ne sont jamais libérées de la paroi de callose chez « Edith » alors que pour « 524 », leur développement atteint le stade de microspore vacuolisée et même, dans certains cas, la première division mitotique du grain de pollen peut être observée (voir chap. I). De plus, les effets des deux stérilités sur la paroi de l'anthère sont globalement opposés: alors que le tapis et la couche moyenne dégénèrent pour la smc « 524 », ces deux tissus persistent pour la smn « Edith ». Par contre, chez ce dernier, la lignification dans la couche sous-épidermique du connectif n'est pas affectée et les cellules épidermiques accumulent les anthocyanes qui sont responsables de la coloration bleue des anthères,

contrairement à « 524 ». Même si l'indéhiscence des anthères est un point commun pour ces deux stérilités mâles, elle n'a certainement pas la même cause. Dans la smn « Edith », elle serait plus associée à plusieurs facteurs comme l'absence des grains de pollen dans le sac pollinique qui exerceraient une pression facilitant la rupture du septum ou alors la persistance du tapis et de la couche moyenne dont les cellules restent encore unies par leurs parois et empêchent ainsi la dislocation de la paroi de l'anthère. Par contre chez « 524 », l'indéhiscence peut être associée au manque de lignification et d'expansion de l'endothécium qui le rendent incapable de générer les forces mécaniques nécessaires pour l'ouverture de l'anthère (Keijzer, 1987).

**CHAPITRE III - Développement de l'akène et de la  
graine chez la chicorée à racine cultivée (*Cichorium  
intybus* L., Asteraceae)**



Comme le développement de la fleur, le développement du fruit comporte une succession d'événements hautement coordonnés visant l'accomplissement de la formation, la protection et la dispersion d'une nouvelle plante sous forme de graine. Dès la fécondation, il se passe des changements physiologiques et morphologiques importants impliquant la sénescence de certaines parties florales et l'établissement de nouvelles parties du futur fruit. La plupart de ces parties résultent de la division des cellules et de la croissance des parties de l'ovaire, permettant ainsi son allongement et son épaississement. A l'intérieur du fruit, le développement de l'embryon et de l'albumen génère une grande diversité de tissus si bien que le fruit est souvent considéré comme l'organe le plus complexe de la plante (Robles & Pelaz, 2005). Des interactions complexes entre toutes ces différentes parties du fruit au cours de son développement existent et leur nature n'est pas encore bien élucidée malgré leur importance dans la formation de la graine et sa dispersion. Ainsi, l'exploration des mécanismes moléculaires et des réseaux régulateurs qui régissent ces interactions est essentielle pour comprendre le développement chez les Angiospermes, ce qui contribuerait significativement à améliorer les programmes de production de fruits et de graines au niveau appliqué.

Même si chez la chicorée, l'étude du développement au niveau histologique du fruit a déjà été abordée (Johansen, 1950; Cichan and Palser, 1982), certaines informations fournies semblent incomplètes voire même non concordantes notamment concernant le déroulement chronologique des événements successifs du développement de l'embryon.

De plus, étant donné que dans notre laboratoire le développement embryonnaire a fait l'objet de plusieurs travaux sur l'embryogenèse somatique (Dubois, 1991; Blervacq *et al.* 1995; Legrand, 2006; Legrand *et al.* 2007; Clabaut, 2009; Lucau-Danila *et al.* 2010), il sera intéressant de vérifier par des études moléculaires, l'expression de certains gènes candidats qui ont été proposés comme intervenant dans l'embryogenèse somatique. Pour une telle étude, la caractérisation morphologique du développement de la graine peut alors être un bon préalable. D'autre part au moment où l'étude anatomique du développement continue à compléter la systématique évolutive moléculaire, la morphologie du développement chez la chicorée est aussi une source d'informations, si on veut comparer cette espèce aux autres Angiospermes en général et aux Asteraceae en particulier. Les résultats de ce travail sont présentés forme d'une publication qui a été envoyée à la revue *Annals of Botany*.

**Achene and seed development in cultivated root chicory (*Cichorium intybus* L., Asteraceae)**

Ildephonse Habarugira<sup>§</sup>, Anne-Sophie Blervacq<sup>§</sup>, Caroline Rambaud, Marie-Christine Quillet, Theo Hendriks\*.

Université Lille Nord de France, USTL1, UMR INRA 1281 Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux Cultivés, IFR 147, Bâtiment SN2, F-59650 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

\*for correspondence: Tel: 00 33-(0) 3 20 43 40 21

E-mail: [theo.hendriks@univ-lille1.fr](mailto:theo.hendriks@univ-lille1.fr)

<sup>§</sup> both authors contributed equally to this work.



● **Background and Aims:** For *Cichorium intybus* L. plants grown in greenhouse and in natural conditions, examination of colour and physiological changes during achene development, and histological investigation of seed development from pollination up to maturation were carried out to characterize the corresponding developmental stages and the timetable of related events in cultivated root chicory.

● **Methods:** Achene colour, mass and water content changes were examined and fruiting capitula at timed intervals after pollination were collected, fixed, embedded, sectioned, stained, and examined by light microscopy.

● **Key results:** Developmental stages and the time table of events were established and total time elapsed from pollination to maturation was twice as long when compared to previous studies in wild chicories grown in similar environmental conditions. The time elapsed before the first zygote division and the embryo growth phase are the most affected by the delay. Histological data showed that *C. intybus* embryo development was similar as reported for other Asteraceae with exception of the lengthwise rotation over 90° at heart stage embryo. During the maturation phase lipid bodies accumulated in the endosperm and proteins in the embryo body.

● **Conclusions:** The difference in the duration of the seed development process in cultivated root chicory and wild chicories is not due to environmental conditions but seems genetically determined. The timetable of the characteristic steps in normal achene development established for root chicory will be useful for molecular studies aiming at analyzing expression of genes involved in the development of embryo endosperm and maternal tissues, as well as in the coordinating regulatory network.

**Keywords:** Asteraceae, achene, *Cichorium intybus*, embryo development, endosperm, seed, zygotic embryogenesis.

## INTRODUCTION

Seed and fruit formation are important steps in the completion of sexual reproduction in flowering plants, as they assure the survival and dispersal of the species. Normally, they are initiated by the double fertilization, i.e. the fusion of one male sperm nucleus with the nucleus of the egg cell, and the fusion of a second male sperm nucleus with two nuclei of the central cell. The first leads to the development of the embryo, the second to that of the triploid endosperm. These events occur in the megagametophyte, or embryo sac, which is surrounded by the maternal tissues of the ovule and ovary that will contribute to the development of the seed coat (testa) and fruit, respectively. Though they occur independently in certain cases, and thus can be studied separately, the development of embryo, endosperm, seed coat, and fruit unfold usually in a timely fashion, implying the existence of a coordinating regulatory network (e.g. Chaudhury et al., 2001; Grini et al., 2002; Ingouff et al., 2006; Ungru et al., 2008). The diversity in seeds and fruits from species that belong to different Angiosperm families implies the existence of various and/or specialized developmental programs, and thus merits exploration of the molecular components underlying their respective regulatory networks.

Chicory, *Cichorium intybus* L., has been classified in the Cichorieae tribe of the Cichorioideae subfamily of the Asteraceae, and represents one of the domesticated species in this genus, the other being endive, *C. endivia* L. (Kilian et al., 2009). In cultivated chicory different cultigroups can be distinguished, depending on their usage, and the most important ones are 'industrial' or 'root' chicory, 'Brussels' or 'witloof' chicory, 'leaf' chicory, and 'forage' chicory. The large taproot of root chicory is used for the production of a coffee substitute or for the extraction of inulin and oligofractans (Kaur and Gupta, 2002), and that of witloof chicory for the production of etiolated buds or chicons by forcing. The leaves of leaf chicories, like the green-leaved varieties of 'Pain de Sucre' and 'Catalogne', and the 'blond', 'red' or 'variegated' 'Radicchio' varieties, are consumed as fresh or cooked vegetables. Forage chicories are used to increase herbage availability in perennial pastures for grazing livestock (Wang and Cui, 2011).

Like other species belonging to the Asteraceae family (Funk et al., 2009), seeds of chicory are enclosed in single-seeded, non-dehiscent, dry fruits, named achenes or cypselas (Singh, 2004), that develop from the inferior ovaries of flowers that are organized in capitula.

Achenes of chicory, when ripe, measure 2-3 mm, are obovoid to cylindrical and basally indistinctly ribbed, and their colour varies from completely dark brown or black to light brown with dark brown or black spots. In contrast to most other Asteraceae, chicory achenes are crowned by a minute scaly pappus (Kiers, 2000; Funk et al., 2009). The seed consists of a relative large and straight embryo that fills nearly the entire achene, only separated from the pericarp by a delicate testa and a thin layer of endosperm (Cichan and Palser, 1982).

Intrigued by the occurrence of seeded and seedless achenes upon incompatible pollinations, Cichan and Palser (1982) studied their development in cross- and partially cross-pollinated capitula of wild chicories. They confirmed most of the previously published general aspects of normal achene and seed development, like the Asterad pattern of embryo development (Carano, 1915; Johansen, 1950), and the nuclear type of endosperm development (Dahlgren, 1920), and presented for the first time a timetable for characteristic steps during the development of the embryo, endosperm, seed coat, and fruit wall. Their results were obtained for individuals from chicory populations growing in the wild but of which the origin was unknown. As chicory is an introduced species in North America, they may represent truly wild chicory, or may be descendants from escaped individuals belonging to one of the chicory cultigroups. Mature achenes were obtained about 2 weeks after pollination (Cichan and Palser, 1982; Cichan, 1983), a time lapse similar as reported previously by Carano (1915) for wild chicory growing near Rome in Italy, but that represented only half the time between pollination and the harvest of mature achenes on root chicories grown in our greenhouses (4-5 weeks). This may of course be related to the growth conditions, the climates being more similar in the regions around New Brunswick (New Jersey, USA) and Rome (Italy) than in the region around Lille (North of France), but may also be indicative for genetic differences. Variability in seed maturation was reported for witloof chicory in which poor seed germination in some batches that contained light and dark coloured achenes was caused by incomplete embryo development in the dark coloured achenes (Corbineau and Côme, 1990). Germination of seeds in the dark achenes could be improved by postponing their harvest two weeks in comparison to the light coloured achenes.

Whereas somatic embryogenesis is worthwhile to be studied as such, representing an ultimate form of totipotency (Komamine et al., 2005), it is also considered as an experimental model to study zygotic embryogenesis (Ko and Kamada, 2002).

A somatic embryogenesis protocol for chicory was developed for an interspecific hybrid, *C. intybus* x *C. endivia*, named '474' (Dubois et al., 1988; Dubois et al., 1990; Blervacq et al., 1995; Vasseur et al., 1995). Unfortunately, the '474' hybrid was nearly completely sterile, thus hampering a genetic dissection of the complex somatic embryogenesis trait, as well as its transfer to recalcitrant agronomical important cultigroups. As a result of tracing back the '474' parents, genetic variability for somatic embryogenesis capacity was found in the Hungarian landrace 'Koospol' from which the *C. intybus* parent originated. Crosses between two plants of this population, K28, male sterile and hardly embryogenic, and K59, hermaphrodite and highly embryogenic, were realised, yielding a progeny that showed segregation for somatic embryogenesis. This progeny was used to construct a consensus genetic map for chicory (Cadalen et al., 2010), and allowed subsequently the mapping of QTL for somatic embryogenesis, as well as several of previously identified candidate genes (Clabaut, 2009). Among the latter, several are homologous to genes that are expressed during zygotic embryogenesis in *Arabidopsis* (Legrand, 2006; Legrand et al., 2007; Clabaut, 2009; Lucau-Danila et al., 2010), suggesting that they may also represent interesting candidates to initiate molecular studies on this process in chicory.

Here, we report on normal achene and seed development on plants originating from the Koospol chicory landrace grown under controlled (greenhouse) conditions. The development of achenes and seeds were followed visually (colour), and microscopically, respectively. In addition, achene development was followed visually and on a basis of mass dynamics (fresh mass, dry mass and water content) on plants transferred to outdoor conditions during the flowering period. The results allowed us to establish a timetable for most characteristic events during achene and seed development, an important tool for future molecular-genetic studies on these processes and the underlying regulatory network in chicory.

## MATERIALS AND METHODS

### *Plant material*

The plants used (Table 1) were clones of K28 and K59, and plants from the progeny of the K28\*K59 cross realised in 2001. Seeds for K28 and K59 originated from the Hungarian chicory landrace “Koospol” (Florimond Desprez, Cappelle en Pevèle, France).

The seeds had been germinated *in vitro* on Heller culture medium (Heller, 1953) supplemented with 10 g L<sup>-1</sup> of sucrose and solidified with 0.6 % agar, and plantlets transferred to culture tubes with the same medium. Leaf explants from the plantlets were tested for their capacity to form somatic embryos (Dubois et al., 1991), and K28 and K59 turned out to be low and highly embryogenic, respectively. Some of the K28 and K59 somatic embryos were grown into plantlets and transferred to the greenhouse after acclimation. After vernalisation, flowering plants of K28 and K59 were obtained. Whereas K59 capitula had normal hermaphroditic flowers, the flowers in K28 capitula were male sterile. Crosses with K28 as seed plant and K59 as pollen donor were performed in 2001 by rubbing capitula of K28 with capitula of K59. Similar as for the parents, seeds that resulted from these crosses were germinated *in vitro*, plantlets used to test their somatic embryogenesis capacity, and some of the resulting somatic embryos grown into plantlets that were transferred to the greenhouse. For plantlets that did not form somatic embryos, plantlets were multiplied by regeneration (Decout et al., 1994).

### *Achene development under greenhouse conditions*

During the 2001-2010 period, flowering plants of K28 and K59, and of genotypes in the K28\*K59 progeny had been grown in different greenhouse compartments that represented two different types of controlled conditions; one in which temperature, relative humidity, and light conditions, were controlled ( $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ ,  $80 \pm 10\%$  humidity, and a photoperiod of  $16 \text{ h d}^{-1}$  under ambient light with supplemental lighting when ambient light levels outside were below 3klux), and one in which only the temperature was controlled to prevent frost and too high temperatures. Pollinated capitula were tagged with etiquettes indicating the date and pollen donor. The time between hand pollination and the harvest of mature achenes was determined by following their

growth and the development of their colour (dark brown, black, or light brown mottled with brown or black spots), but also by the change in the colour of the involucre bracts (from green to light brown).

To follow achene development under (local) natural conditions, 17 plants raised in the greenhouse, and that represented different compatibility and male sterility genotypes in the K28\*K59 progeny, were placed outdoors in the last week of June 2006.

After removal of the dried capitula from the plant, 28-35 days after pollination (dap), the mature seeded achenes, as well as seedless achenes and degenerated ovaries, were liberated from them to determine seed set (= seeded achenes/total number of ovaries).

#### *Achene development on plants grown under natural conditions*

. From 7 July until 8 August, open capitula on these plants were tagged with etiquettes indicating the date of anthesis, and allowed to be pollinated by visiting insects. On 9, 10, and 11 August, all tagged capitula were harvested individually, as well as those that had opened that day (0 dap). As chicory flowers stay open only a couple of hours, the date of anthesis corresponded to the date of pollination, and thus the number of days elapsed between pollination and harvest could be determined. The daily weather conditions for the period were obtained from the reports of the close by weather station at the airport Lesquin-Lille (<http://climat.meteofrance.com>), situated at 4 km of the site (50°33'36"N, 03°06'00"E, altitude 52 m).

After harvest of the capitula, achenes were released, and a first evaluation of the achenes was made on the basis of colour of the achenes and the capitulum carrying them, similar as applied for greenhouse grown plants. After liberation of all ovaries/achenes from the capitula with pointed tweezers, a distinction between seeded and seedless achenes was made by size and firmness, and, for later stages, also in colour (cf. Fig. 1D-M). For early stages, i.e. 0-3 dap, seeded and seedless achenes were difficult to distinguish, and the number of achenes harvested may have exceeded the actual number of seeded achenes. Dry mass ( $M_d$ ) was determined after drying the samples for 48 h in an oven at 60°C, water content ( $M_w$ ) was calculated as the difference between fresh mass ( $M_f$ ) and  $M_d$ , and the relative water content ( $M_{w\%}$ ) was calculated as the percentage of the  $M_w$  related to  $M_f$ .

The number of seeded achenes for a single capitulum was expressed per 100 achenes, plotted against the number of days elapsed between pollination and harvest, and 3<sup>rd</sup> order polynomial curves were fitted using the Excel (Microsoft®) software. The equations were subsequently used to determine the time elapsed to reach the maxima and/or minima, by resolving their first derivatives. The maximum values of  $M_d$  and minimum values of  $M_w$  and  $R_w$  were considered as estimates of the number of days to obtain mature achenes, whereas the maximum values of  $M_w$  were used to estimate the transition between early achene growth phase and achenes maturation phase. This procedure was applied to two periods, 0-35 dap and 0-25 dap.

#### *Seed development under greenhouse conditions*

For the cytological and histochemical analyses of seed and embryo development under greenhouse conditions, achenes were collected in 2004 from capitula of K28 plants that had been pollinated by K59. Two series of 5-10 capitula were harvested. The first series contained achenes from capitula before hand pollination, early after hand pollination (0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 9 h, 10 h, 11 h, 12 h, 13 h, 14 h, 16 h, 18 h, 24 h, 36 h, and 48 hours after pollination (hap), and thereafter daily up to 23 days after pollination. A second series of achenes was collected at 2h intervals between 12 and 24 hap. Achenes from 0.5 hap to 5 dap were directly fixed in formaldehyde: acetic acid: ethanol (FAE, 3.5:6.5:90, by vol.). For achenes older than 5 dap the pericarp was removed before fixation to facilitate sectioning.

Samples were transferred to a graded series of ethanol then included in JB4® resin (Polysciences Ltd.) according to the manufacturer's protocol. Embedding was performed in silicone molds (400 µL volume, TAAB) for 0.5 hap to 5 dap samples. Other samples (> 5 dap) were imbedded in gelatin capsules (370 µL volume, TAAB). During this step achenes settled down in the mold according their asymmetrical shape (this concerned both entire achenes and achenes deprived of the outer parts) and longitudinal sections of achenes younger than 5 dap allowed following embryo development up to late globular stage. After 5 dap, embedding had to be modified, however, to allow following embryo development from the heart stage onward. The bottom of the gelatin capsule was filled with resin until it hardened. Thereafter, achenes were

correctly positioned in the capsule with new resin. This two-step embedding method allowed us to obtain longitudinal sections of the embryo in the desired plane.

Sections of 3  $\mu\text{m}$  were obtained using a RM Leica Microtome. For cytological examination sections were stained with 0.1 % w/v toluidine blue O (Sigma) in distilled water and observed under a microscope (Olympus BH-2) equipped with a camera (Olympus Camedia C-4000 Zoom). Sections were double stained with periodic acid Schiff (PAS) and naphthol blue black (NBB). PAS specifically stains polysaccharides red (Michaux-Ferrière et al., 1992) and NBB stains proteins bluish black (Fisher, 1968; Michaux-Ferrière et al., 1992). For lipid detection sections were stained by Sudan III according to Johansen (1940); lipid bodies stain orange.

## **RESULTS**

### **Achene development under greenhouse conditions**

For the chicories grown under greenhouse conditions, mature achenes were harvested mostly in the 5<sup>th</sup> week after hand pollination, i.e. 28-35 dap. Their maturity was determined by visual inspection of their growth and colour, and the changes in colour for the involucre bracts (cf. Fig. 1D-M, for illustrations). Seeds in these achenes germinated directly after harvest (Fig. 1N), indicating they had not become dormant. In the K28\*K59 progeny of 177 F1 individuals (Cadalen, 2010), no genetic variability was detected for the duration of achene development. Moreover, for 10 years (2001-2010) the time lapse between pollination and harvest of mature achenes was more or less constant and independent of the period of the year in which the plants were pollinated, i.e. between April and September, as well as of the conditions in the different greenhouse compartments. Variations in seed sets and achene size between different plants or between capitula from the same plant were noted. Even within a single capitulum the size of mature achenes differed, in particular in width (Fig. 1C). This is related to the position of the achenes within the capitulum, those at the periphery being flattened and curved. The seeds in achenes obtained during this period germinated for > 90%, even after storage at ambient conditions for up to 5 years (data not shown).



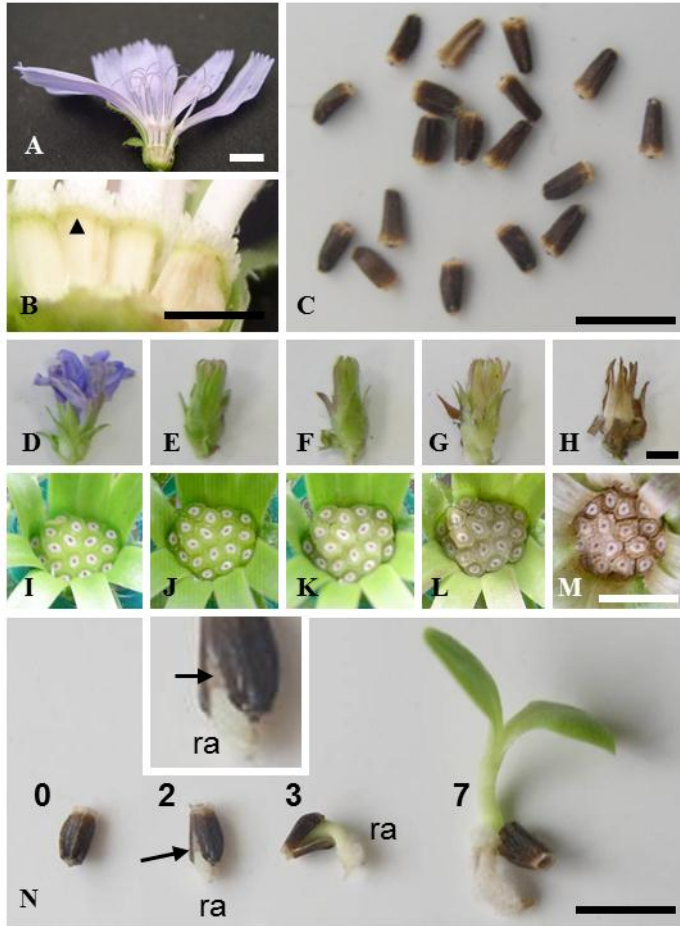


Fig. 1 Visual modifications of capitulum and achenes after pollination. A General view of capitulum at anthesis cut longitudinally in half to show florets attachment on the receptacle B Magnification of capitulum showing the ovaries. Arrow head indicates the chlorophyll-containing ring of tissue visible under the pappus. C Mature achenes from a single capitulum showing the variation in size and shape. D-M Changes in the colour of the involucre bracts (D-H) and achenes (I-M) after pollination. D, I 1 dap; E, J 8 dap; F, K 15 dap; G, L 22 dap; H, M 30 dap. N Germination of a seed 30 dap; the seedling radicle (ra) emerges by splitting of the achene wall (arrow) and piercing the persistent endosperm layer (arrow in insert). The number of days after imbibition of the achene is indicated. Bars = 5 mm

### Seed development under greenhouse conditions

Achenes of K28, grown in the greenhouse and hand pollinated with K59 pollen, were used for a cytological and histochemical study of seed development under greenhouse conditions. The

development of the fruit wall was not studied as the glass knives were damaged during microtome sectioning of whole achenes, that rapidly becomes very tough (> 5 dap).

*Ovule and female gametophyte before fertilization*

The mature unilocular ovary contained a unitegmic, anatropous ovule that measured about 800  $\mu\text{m}$  in length (Fig. 2A).

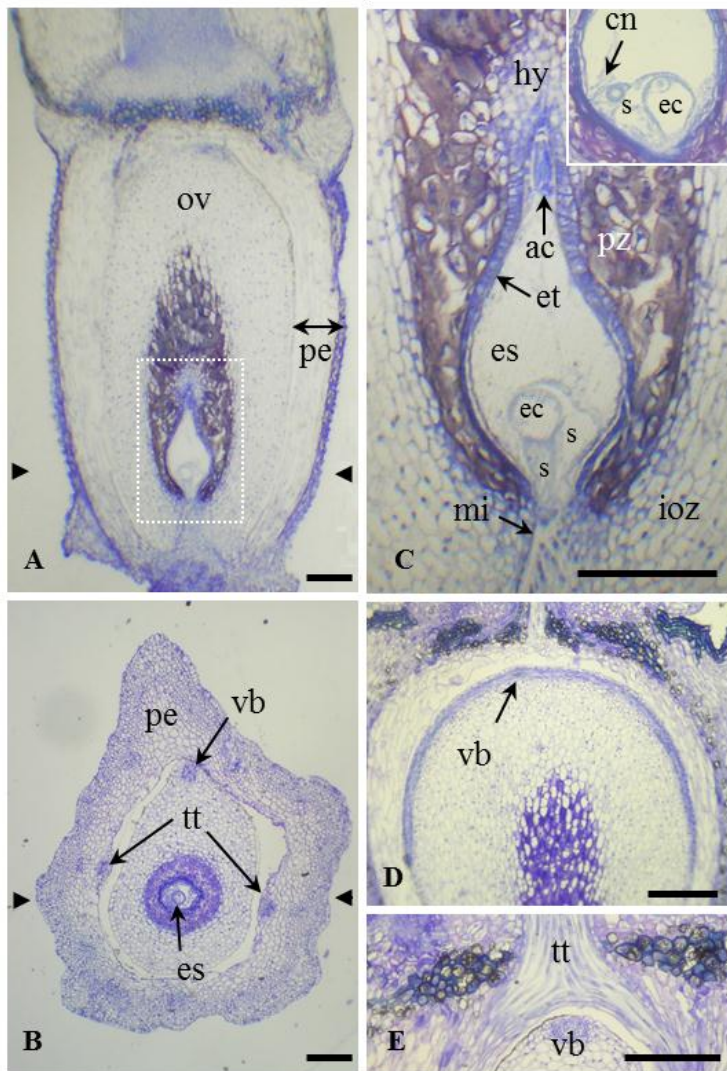


Fig. 2 Anatomical structure of the ovary and ovule before fertilization A Longitudinal section showing the unilocular ovary with anatropous, unitegmic ovule (ov) protected by the pericarp (pe). Arrow heads indicate the position of cross section shown in B. B Cross section in the ovary at the level of the egg apparatus. This section shows the irregular pentagonal circumference with its longest side parallel to the

long axis of the ovule. The single vascular bundle (vb) is visible only on the raphe side. The two transmission tissue (tt) tracts are positioned in the internal ovary wall. Arrow heads indicate the position of the longitudinal section shown in A. C Magnification of the embryo sac (es) and surrounding tissues. Three domains are visible in the ovule integument: a uniseriate endothelium (et), a periendothelial zone (pz) and the integument outer zone (ioz). In the micropylar pole is two synergids (s) and the egg cell (ec) and in the chalazal pole one of the three antipodal cells (ac) is shown penetrating in the hypostase (hy). The periendothelial zone cells are highly thick-walled and disorganized. Inset shows the central cell nucleus (cn) close to the egg cell and synergids. D Longitudinal section of ovary showing the ovule vascular bundle course around the periphery of the ovule. E Longitudinal section at right angle to section in B showing transmission tissue tracts (tt) running in a perpendicular plane to that of the vascular bundle. Bars = 100  $\mu\text{m}$

A single vascular bundle passed through the funiculus and surrounded the embryo sac for nearly  $\frac{3}{4}$  in the unique integument, in a plane that was perpendicular to that of the two transmitting tissue tracts situated on the inside of the ovary wall (Fig. 2B, D, and E). No signs of specialised structures leading from the vascular bundle towards the embryo sac were observed (Fig. 2D, E). The transmission tissue tracts, starting from their branching off from the transmitting tissue in the style (Fig. 2E), encircled the ovary, and fused at the base of the funiculus to enter the micropylar channel together (Fig. 2C). In the integument two domains could be distinguished: an outer domain composed of thin-walled, and largely vacuolated, rectangular cells and an inner domain, the periendothelial zone, constituted of cells with thick walls that stained pink with toluidine blue O. The innermost layer of the integument forms the endothelium, a single cell layer consisting of small cells that stained deep blue with toluidine blue O (Fig. 2A-C). A hypostase, exhibiting small round thin-walled cells, was present around the chalazal pole of the embryo sac (Fig. 2A, C). The polygonum-type embryo sac measured 300-350  $\mu\text{m}$  in length and was surrounded by the endothelium. It contained 7 cells and 7 nuclei, indicating that at this megagametophyte stage the two polar nuclei were fused. In the micropylar zone, the egg cell was flanked by two synergids with their fusiform ends fitted in the micropyle channel (Fig. 2C) and their relatively small nuclei positioned centrally. The egg cell was slightly elongated and displayed a clear polar organisation; a large vacuole at the basal end and most of its cytoplasm and the nucleus at the apical end. The egg cell with its cytoplasm being confined to a thin layer appressed against the wall was placed slightly higher into the embryo sac, whereas the vacuolated end was in close contact with the

endothelium. The central cell was highly vacuolated and its huge diploid nucleus was situated close to the egg apparatus comprising the two synergids and the egg cell (Fig. 2C).

Three antipodal cells were at the chalazal pole of the embryo sac; they were triangular, arranged side by side, penetrating in the hypostase and exhibiting dense cytoplasm (Fig. 2C).

#### *Early post-fertilization events: the zygotic phase (6-16 hap)*

In our material we have not been able to precisely determine the time of fertilization. However, the first cytological indications for penetration of the pollen tube in the embryo sac, i.e. degeneration of one of the synergids, enlargement of the central cell's nucleus, and presence of nucleoli therein, were observed in the 6 hap samples (not shown).

At 8 hap, several observations confirmed the occurrence of the double fertilization. The primary endosperm nucleus had moved close to the apical end of the zygote, and its large nucleolus showed vacuoles (Fig. 4A). One of the two synergids showed densely stained mass corresponding to degenerating cell materials, whereas the other remained intact and fully inflated, and filled with elongated fibrillar structures (Fig. 3A). The zygote had elongated in the micropyle/antipodal direction and was polarized, with a large vacuole at the basal end and an apically positioned nucleus that faced the endosperm nucleus (Fig. 3A).

During the period 9-16 hap, serial sections allowed to observe the results of the first mitosis of the primary endosperm nucleus 9 hap (Fig. 4B), and a second round of synchronous mitoses 12 hap (see later).

#### *Embryo development*

Embryo development was of the Asterad type, and was divided into three main phases (Fig. 3). The first phase, proembryogenesis (18 hap-4 dap), covered the first divisions of the zygote up to the formation of the globular embryo. In the second phase, morphogenesis (5-9 dap), the main axis of polarity, symmetry, and the main structures of the embryo (cotyledons, hypocotyl and radicle) were formed by passing subsequently through triangular, heart, torpedo, and early cotyledonary stages. The third phase, maturation (9-22 dap), represents the phase during which the embryo attained its final size (late cotyledonary stage) and accumulated storage compounds.

Proembryogenesis (18 hap - 4 dap)

The first division of the zygote, observed at 18 hap, was transverse and resulted in a large basal cell, the suspensor initial cell, and a small apical cell, the embryo proper (Fig. 3B). Subsequent divisions in the apical cell and the basal cell differed in their orientation being longitudinal in the first and transversal in the second (Fig. 3C). At 36 hap, the embryo could be divided in an apical part and a hypophysis (Fig. 3D), the latter most likely originating from the upper most basal cell derivative. The 8-celled embryo head exhibited two cell layers obtained by right-angle divisions. The suspensor was 2-celled with an important part of the basal cell appressed against the endothelium (Fig. 3D). The dermatogen stage was reached at 2 dap (Fig. 3E), and typical globular stage embryos, with a distinguishable protoderm, were observed at 3-4 dap (Fig. 3F). At the late globular stage (4 dap), the embryo cell number had considerably increased but apart from the protoderm, no cytological characters were noticed to differentiate them. A uniseriate, 5-6 celled, filamentous suspensor was anchored under an angle of 45° to the endothelium with its enlarged basal cell (Fig. 3F). In a few cases, apical suspensor cells that had divided longitudinally were observed, leading to a partial biseriate structure (not shown).

Embryo morphogenesis (4-8 dap)

Triangular embryos were observed in some achenes 4-5 dap (not shown), but at 5 dap most embryos had reached heart stage, characterized by the emergence of the cotyledons (Fig. 3G). The suspensor basal cell began to degenerate, and between 5 and 6 dap, the embryo rotated lengthwise over ~90° in the embryo sac. Embryo rotation early during the morphogenesis phase was revealed by changing the orientation of the embryo during sectioning.

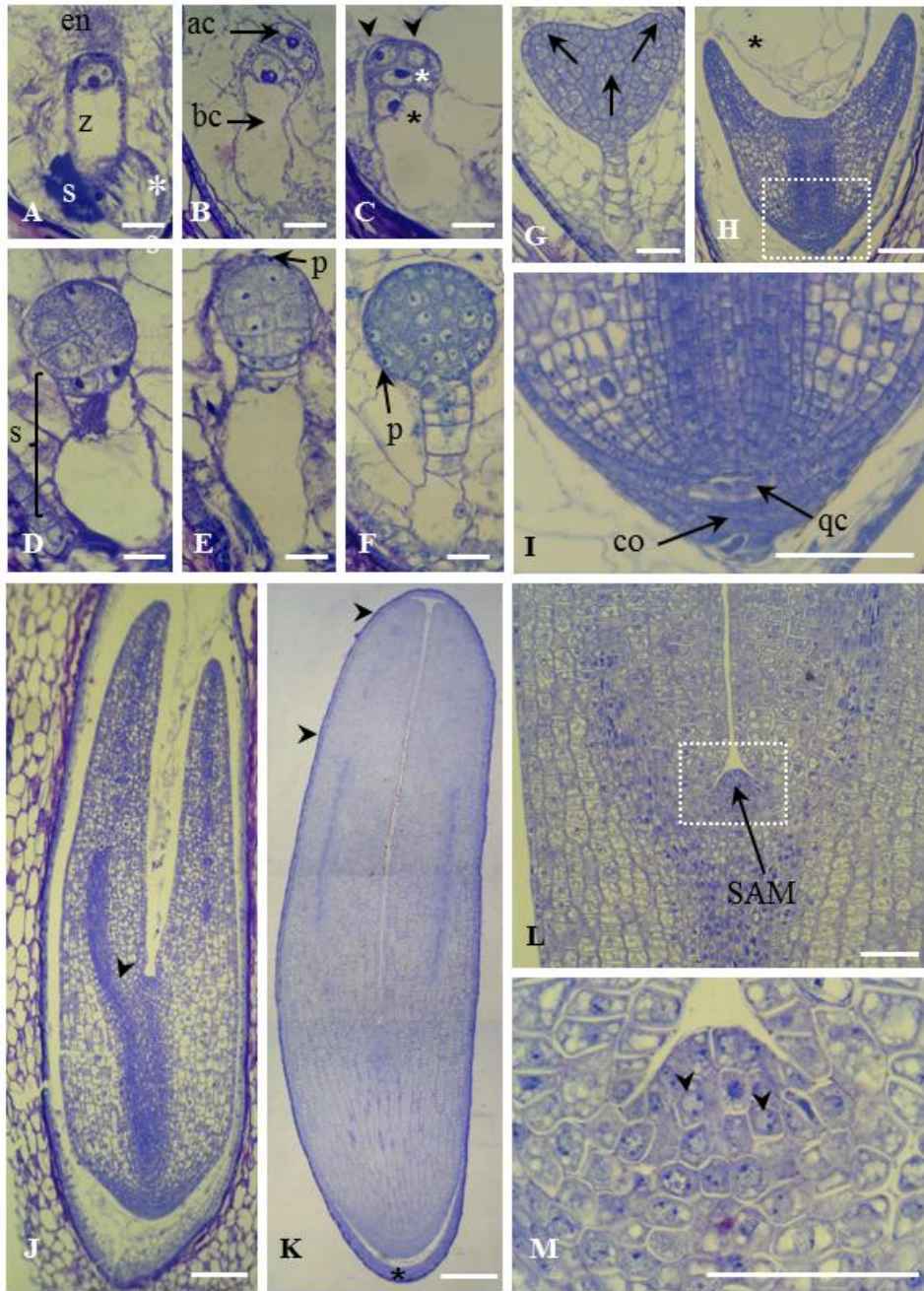


Fig. 3 Light micrographs illustrating embryogenesis stages in *Cichorium intybus*. A 8-17 hap, zygote stage. The zygote (z) is elongated and its diploid nucleus is placed at the apical end next to the endosperm nucleus (en). One synergid is degenerating and the other one shows fibrillar structures (\*) B 18 hap, bicellular embryo stage. The basal cell (bc) is large and vacuolate while the apical (ac) is small and exhibits a highly dense cytoplasm. C: 1 dap, four-celled proembryo stage. Two juxtapsed cells (arrow heads) are derived from the apical cell and two superposed cells derived from the basal cell (\*). D 1.5 dap, the suspensor (s) is

4-cellular with a large basal cell and a smaller one immediately beneath hypophysal cells. The terminal tier comprises a quadrant and the middle tier comprises two juxtaposed cells. E, F 3-4 dap. E, Dermatogen stage has just differentiated the protoderm (p) at the periphery of the whole embryo, except around hypophysal cells. F, Late globular stage. The protoderm is constituted by a unicellular layer of isodiametric cells. The suspensor shows a single file of vacuolated cells, the basal cell is still voluminous. G: 5-6 dap, Heart stage. Pre-caulinar and cotyledonary territories are determined according to the embryo axis (arrows). H 7-8 dap, torpedo stage. Cotyledons grow and occupy the disintegrating endosperm place (\*). I Magnification of the quiescent center initiation zone (qc). The first cell layers of the columella (co) are already produced J 9-10 dap, early cotyledonary stage. The procambium forms a continuous strand in the hypocotyl and cotyledons (arrow head). K 19 dap, general view of the cotyledonary embryo. Embryo occupies the whole internal space of the achene, cotyledons have almost reached the top of the achene. The embryo is surrounded by a thin layer of endosperm fused with the remains of endothelium (arrow heads). Numerous endosperm layers are present in the micropylar zone (\*). L The shoot apical meristem (SAM) dome is established in the cotyledonary stage. M Magnification of the SAM showing the meristematic cells with their voluminous nuclei (arrow heads). Bars = 20  $\mu\text{m}$  (A-I); 100  $\mu\text{m}$  (J, K); 50  $\mu\text{m}$  (L, M).

As achenes have a more or less irregular, and slightly flattened, pentagonal circumference (Fig 4B), they had the tendency to settle down on one of the longer sides in the mould during embedding. In sections of blocks with freely settled down 5 dap achenes, triangular and heart stage embryos were observed, but sections of older achenes embedded this way failed to reveal embryos with both cotyledonary regions in the same section plane. This inconvenience was overcome by changing the orientation of the achenes during embedding, i.e. by rotating them lengthwise to a position perpendicular to that if allowed settling down freely (see Materials and Methods). Torpedo stage embryos were observed in achenes 7-8 dap, and showed evidence of tissue differentiation (Fig. 3H). In the hypocotyl a delineation of protoderm, cortex, and a central cylinder with procambium surrounded by single celled pericycle and endodermis, respectively, was distinguishable (Fig. 3I). The root apical meristem (RAM) had largely attained its final organisation, with the quiescent centre clearly discernible, and had formed the first columella cells of the future root cap (Fig. 3I). In contrast, the future shoot apical meristem (SAM) zone was flat without any visible cellular organisation. Scattered groups of procambium cells were present in the cotyledons, not yet having fused and without connection to the hypocotyl procambium (Fig. 3H).

## Embryo maturation (8-22 dap)

Achenes 9-10 dap contained early cotyledonary stage embryos (Fig. 3J) and at 21-22 dap the embryo had reached its final length, the tips of the cotyledons having reached the apical end of the seed (Fig. 3K). The embryo occupied nearly the interior volume of the achene (~95%), separated from the achene wall by only a thin layer of remaining endosperm and integument (see next section). Cortical cells in hypocotyl and ground cells in cotyledons were rectangular in shape and aligned longitudinally (Fig. 3L). These cells were characterized by a nuclear-cytoplasmic ratio less than 0.5, a fragmented vacuome, and globular inclusions filled with reserve compounds (see below). The procambium in the cotyledons and hypocotyl formed a continuous structure in the embryo. Median longitudinal sections through the radicle revealed that the RAM had completed and that the columella was constituted of numerous cell layers obtained by anticlinal cell divisions (Fig. 4I). The SAM appeared as a protrusion of 30-35 cells observed in the median section plane (Fig. 3L, M). The nuclear-cytoplasmic ratio for cells in this zone was comprised between 0.8-1, indicative for their meristematic character.

## *Development of endosperm*

The first divisions of the primary endosperm nucleus took place at 9 hap in the phase preceding those of the zygote shown in Fig. 4A. After the first division, the two sister nuclei migrated apart at right angles to the long axis of the embryo sac (Fig. 4B), and they underwent synchronously a second division oriented in the long axis of the embryo (Fig. 4C). After 2-3 subsequent rounds of caryokinesis, free endosperm nuclei were present in the micropylar zone and all along in the periphery of the embryo sac. Serial sections revealed that the endosperm was coenocytic with a central vacuole and a parietal zone of dividing nuclei. At 18 hap, when the zygote underwent the first division, cellularization has started in the micropylar end and was followed by cytokinesis of the parietal nuclei, the latter leading to the formation of a cell layer appressed against the endothelium. Endosperm cellularization continued in a centripetal pattern while embryo development progressed through pre-globular until dermatogen stages (Fig. 4D-E). At the early globular stage cellularization was complete (Fig. 4F), and the cellularized endosperm was partitioned into two compartments: a peripheral domain exhibiting small and densely cytoplasmic cells in a single celled-layer (outer endosperm), and an inner domain where cells were larger and vacuolated (inner endosperm) (Fig. 4F). Rare multinucleate endosperm cells were noticed (not



shown) and the endosperm occupied most of the embryo sac volume. At 5-6 dap (triangular to heart stage), the inner endosperm started to become disorganised especially the inner cells close to the embryo protoderm (Fig. 3H, 4F). At 17-22 dap (late cotyledon stage), the inner endosperm was completely disintegrated. The outer endosperm still persisted both at the endothelium interface and in the micropylar end (Fig. 3K, 4I-H); such an organisation was observed until the end of seed maturation.

*Post-fertilization fates of other cells in the embryo sac*

The three antipodal cells were relatively easy distinguishable until at least the globular stage without undergoing secondary multiplication of nuclei (Fig. 4E). The synergid remains could be seen until globular stage as densely stained material in the micropylar region next to the basal most cell of the suspensor (Fig. 4F).

*Integument changes after fertilization*

After fertilization, cells in the integument underwent autolysis. At the globular stage the periendothelial zone had completely lost cell integrity and appeared as a disorganized mass being progressively replaced by a vacant place around the embryo sac (Fig. 4E-G). This zone had disappeared at the torpedo stage (Fig. 3J) when endothelium became crushed by the growing embryo between the endosperm and the integument outer zone. Endothelium was reduced to a linear zone corresponding to disintegrated cell wall material that stained dark blue-violet with toluidine blue O (Fig. 3J), and persisted as a non-cellular pellicle in the mature seed (Fig. 3K). The seed coat (testa) was formed by the remaining integument of which the outer most layers underwent lignification during the maturation stage (Fig. 4I).

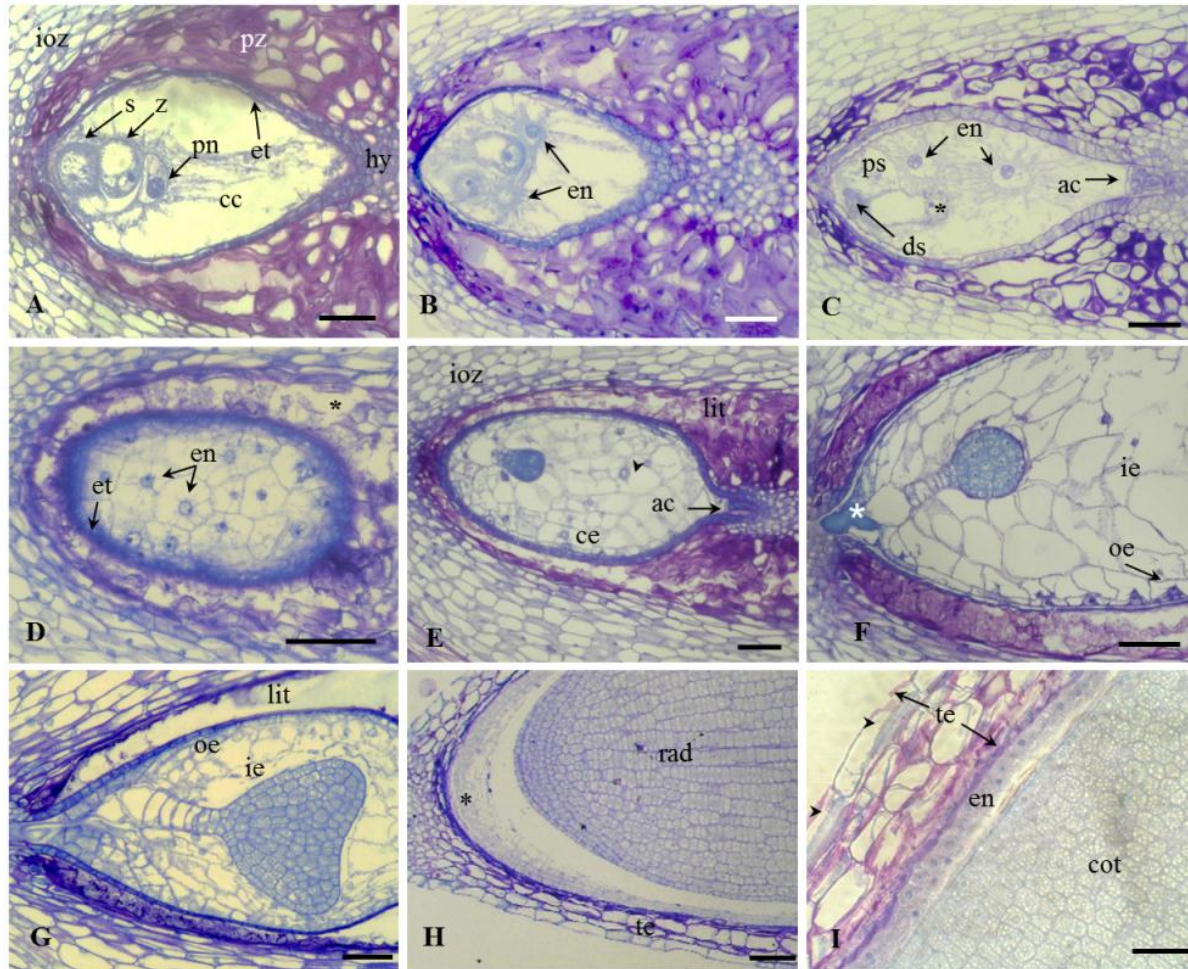


Fig. 4 Endosperm and integument modifications during zygotic embryogenesis A Zygote stage (8 hap). From the micropyle to the chalazal pole of the embryo sac are shown the persisting synergid (s), the zygote apical pole (z) and the triploid primary endosperm nucleus (pn) close to the zygote cell wall and exhibiting a large nucleolus. Strands of cytoplasm are visible through the central cell (cc). Four zones in the integument: integument outer zone (ioz), periendothelial zone (pz), endothelium (et) and hypostase (hy). B Migration of the two endosperm nuclei after the first division of the primary endosperm nucleus (9 hap). The two triploid endosperm nuclei (en) migrating apart in the direction of the short axis of the embryo sac. C Second endosperm nuclear division (12 hap). The two of the endosperm nuclei observed in this section plane exhibit conspicuous nucleoli while dense cytoplasm strands expand throughout the central cell. One degenerated synergid (ds) shows disintegrating cell material. The persistent synergid (ps) is also noticeable. The zygote is elongated and its nucleus is placed at the apical pole (\*). The three antipodal cells (ac) occupy the chalazal pole, surrounded by the hypostase. D Section showing endosperm nuclei (en) and cellularisation in the peripheral zone of the embryo sac (34 hap). The periendothelial zone disintegration started (\*) E At early globular embryo stage (2 dap) endosperm is cellularized (ce) except

for a small zone in the center of the embryo sac (arrow head), the cell walls in the periendothelial zone are completely altered except near the hypostase. The integument outer zone is still intact F: At late globular stage endosperm exhibits two domains: an outer endosperm (oe) which is in contact with endothelium and an inner endosperm (ie). Dense synergid wall materials are still visible in the micropyle channel (\*) G At heart stage, endothelium is crushed between the endosperm and the altered liquefied integument (lit) which at this stage, begins to disappear. H-I Cotyledonary stage. Persistent endosperm (\*) is visible in the micropylar zone at the radicle (rad) interface (H), endothelium is reduced to a thin blue-violet line and (I), remaining outer endosperm at cotyledon (cot) interface shows two layers of dense, small cells. Integument outer zone forms the testa (te); its cells undergo lignification (arrow heads). Bars = 100  $\mu\text{m}$  (A-F), 20 $\mu\text{m}$  (G, H, I).

*Accumulation of storage compounds during cotyledonary stages (9-22 dap)*

Accumulation of storage compounds in the developing embryo and endosperm was investigated histochemically at the beginning and during maturation. At early cotyledonary stage (9 dap) no lipid bodies were detected (Fig. 5A) whereas carbohydrate compounds and protein bodies were visible most prominently in the embryo. The occurrence of protein-rich vesicles was particularly clear in the cotyledon protoderm (Fig. 5B). Lipid bodies were detected at the late cotyledonary stage, both in the cotyledons and the remaining endosperm (Fig. 5C), and the protein-rich bodies had become more conspicuous than in the early cotyledonary stage (Fig. 5D). The differentiating procambium exhibited highly dense PAS-stained materials compared to the surrounding areas (Fig. 5D). In the apical meristem cells protein-rich bodies were detected (Fig. 5E, F).

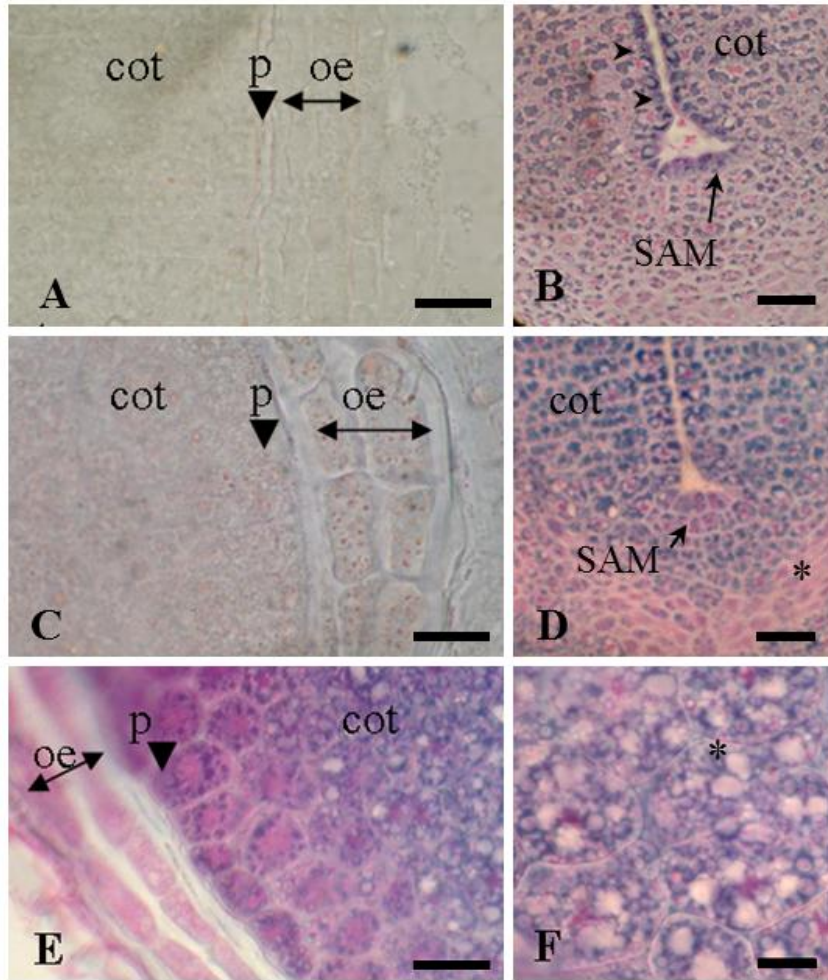


Fig. 5 Compounds storage during *Cichorium intybus* zygotic embryogenesis cotyledonary stage. A, B Early cotyledonary stage (9 dap), C to F Late cotyledonary stage (19 dap). A No visible oil bodies are stained in orange with Sudan III in the cotyledon (cot), in the protoderm (p) or in the remaining outer endosperm (oe). B Hypocotyl cells exhibit less protein bodies (stained in black) than cotyledon cells. Inner cotyledon protoderm is particularly rich in proteins (arrow heads). C Small oil bodies are detected in the cotyledon and endosperm cells. D Protein bodies are more abundant than at 9 dap. Procambium is now a continuous strand with fusiform cells filled with carbohydrates stained in red with PAS (\*). The shoot apical meristem appears as a dome showing small cells with few protein bodies. E Details of the cotyledon-teguments interface. Protoderm and the underlying cells show numerous protein bodies and is rich in PAS stained-material. In contrast, fundamental meristematic cells (F) exhibit protein bodies (\*). A, C sections stained with Sudan III. B, D, E and F, sections double-stained with PAS and NBB. Bars= 10 $\mu$ m.

### Achene development under natural conditions

According to literature (Carano, 1915; Cichan and Palser, 1982, Cichan, 1983), in wild chicory, mature achenes developed in about 14-15 dap, representing only about half the time we estimated necessary to obtain mature achenes after hand pollinations of chicories originating from the Koospol landrace. To test whether this was due to greenhouse conditions, achene development was followed on flowering plants transferred from the greenhouse to the courtyard of the greenhouse complex in the summer of 2006.

As a result of differences in the availability of the number of capitula per plant on the days of tagging, complete data sets were obtained only for 5 of the 17 plants grown under natural conditions. These plants, representing 3 different genotypes (Table 1), had allowed the harvest of achenes from capitula that had been tagged on all days that the plants were visited during the period of the experiment. The numbers of seeded achenes in capitula harvested after different pollination dates for each of them are shown in Table 2.

Table 1 Plants used for the experiments

Name	Origin	Sexual phenotype	Genotype NMS1
K59	Koospol	hermaphrodite	<i>*NMS1nms1</i>
K28	Koospol	male sterile	<i>nms1nms1</i>
**B263.1-3	K28xK59	hermaphrodite	<i>NMS1nms1</i>
B234	K28xK59	hermaphrodite	<i>NMS1nms1</i>
B302	K28xK59	male sterile	<i>nms1nms1</i>

\*: *NMS1* and *nms1* are respectively the dominant and recessive alleles of the nuclear male sterility gene.

\*\* : B263.1, B263.2, and B263.3 are three clones of the same plant

Visual evaluation of the maturation of achenes on these plants (cf. Fig. 1D-M) suggested that the time course of achene development following open pollination under natural conditions was very similar as under greenhouse conditions, i.e. mature achenes were present in the capitula after about 28 dap as the change of involucre bracts and achene colour was observed from about 22 dap in both conditions.

Table 2 Number of seeds per capitulum for the plants used for the outdoor experiment in 2006

Plant	B263.1	B263.2	B263.3	B234	B302
Harvest date	9/8	10/8	11/8	9/8	10/8
Tagging date					
7/7	10;5;3	-	8;2;2	14	19;18;16
10/7	13;8;8	16;10	8;6	20;20;18	21;19;18
12/7	9;8;3	5;4	13;7;2	20;19;19	17;17
14/7	9;9;7;3	8;6;4	12;7;2	20;18;18	12;10;7
17/7	16;16	18;14;8	12;2;1	18;18;18	18;17;8
19/7	19;17;14	14;12;12	15;15;15	18;16;15	16;10
21/7	18;17;15	17;17	21;20;18	16;13;13	15;15;14
24/7	16;16	19	18;17;17	15	-
26/7	15;12	18;18;11	21;18;18	18;15;13	20;17;14
28/7	17;13;9	14;13;13	18;16;16	14;13;11	17;13;11
31/7	12;8	15;15;9	18;9	13	15;15;13
2/8	18;15;15	16;14;11	17;16;10;9	16;13;10	13;12
4/8	18;15;14	19;17;15	17;14;13	17;9	9;5
7/8	17;15;14	17;16;15	16;9	18;15;14;14	18
9/8	16;15;15	19;19;15	15	17;17;15	-
10/8	-	17;17;16	16;12	-	22
11/8	-	-	16;11	-	-

B263.1, B263.2, and B263.3 are three clones of the same plant

Besides the visual inspections, achene development on the 5 plants was evaluated by determining the changes in fresh mass ( $M_f$ ), dry mass ( $M_d$ ), mass water content ( $M_w$ ) and relative water content ( $R_w$ , %). A typical example of a graph is shown in Fig. 6, and illustrates the different phases that were distinguished during achene development. Curve fitting suggested that the changes in  $M_f$ ,  $M_d$ ,  $M_w$ , and  $R_w$ , during 5 weeks of achene development could be described as 3<sup>rd</sup> order polynomials (Fig. 6). Inspection of the individual graphs for the five plants showed that decreases in  $R_w$  leveled off at about 30 % between 20 and 24 dap, to be followed by sudden decreases to their final levels of about 10 % between 24 and 26 dap. For this reason, curve fitting was repeated for the changes in  $M_d$  and  $R_w$  in the period 0-25 dap, showing that these also could be described as 3<sup>rd</sup> order polynomials. As indicated by the determination coefficients, the curves' equations for  $M_d$  and  $R_w$  were particularly robust ( $R^2 \geq 0.99$ ), followed by those for  $M_w$  ( $0.82 < R^2 < 0.98$ ) and  $M_f$  ( $0.76 < R^2 < 0.97$ ) (data not shown). In addition, highly reproducible results were obtained for the three clones of the B263 genotype (Table 1), despite variations observed

for achenes from the individual capitula harvested at the different number of days after pollination (Fig. 6). To estimate the duration of the different phases, the derived equations for the different curves were resolved to determine the time to reach their minima and/or maxima that were considered as the start or end of a particular phase (Table 3).

Table 3 Estimate time (dap) elapsed to reach maximum values for dry mass ( $M_d$ ) and minimum values for relative water content ( $R_w$ ) during achene development. Equations of 3<sup>rd</sup> order polynomial curves were fitted through the changes in dry mass ( $M_d$ ), and relative water content ( $R_w$ ), expressed as %, during achene development after pollination on 5 individual chicory plants. B263.1, B263.2, and B263.3, are three clones from the same genotype. Resolving the derived equations of the curves for  $M_d$  and  $R_w$  were used to estimate time (dap) elapsed to reach their maximum and/or minimum values, respectively, for the whole period (0-35 dap) and for the period 0-25. For plant B302 the equations were obtained after removal of the outlying data for 0 dap achenes in a single capitulum harvested that day.

	0-35 dap		0- 25 dap	
	$M_d$ max	$R_w$ min	$M_d$ max	$R_w$ min
B263.1	29	30	20	23
B263.2	29	31	22	25
B263.3	31	31	25	25
B234	30	31	22	26
B302	27	31	18	23
mean B263	30	31	22	24
Sd	1.2	0.5	2.8	0.8
mean all	29,2	31	21	24
Sd	1.4	0.4	2.8	1.2

Sd: standard deviation

The first phase was characterized by a rapid increase in the  $M_f$  of the achenes in the 0-7 dap period, nearly doubling its initial value. The increase in  $M_f$  was mainly due to an increase in  $M_w$  rather than an increase in  $M_d$ , indicating that during this first period the achene underwent expansion growth. The increase in  $M_d$  of achenes, slowly in the first phase, was most important during the second phase, slowed down around 21 dap, and resumed for 2 days in the third phase to reach its maximum values after about 28 dap (Fig. 6, Table 3). During this period, the increases in  $M_f$  leveled off to reach a maximum value at 14 dap, remained stable until the end of

the second phase, and finally decreased slightly during the third phase. The difference between  $M_d$  and  $M_f$  changes indicated that during the second phase, one week after pollination, the achenes had started to lose water. Initially measuring 80-85 % of the  $M_f$ , the  $R_w$  reached about 30 % at 23 dap, followed a further decrease to about 10 % after 28 dap (Fig. 6, Table 3).

Daily climatic conditions for the period of the outdoor experiment are illustrated in Fig. 7 and showed that for most of the days outdoor temperatures were higher and relative humidity lower than maintained in the greenhouse ( $22 \pm 4^\circ\text{C}$  and  $80 \pm 10\%$ ). Furthermore, light intensities, though not measured, were much higher outdoors most of the days, as indicated by the number of sunny days in this period, conditions which in the greenhouse leads to closure of the blinds. In fact, in 2006 the month July was exceptionally sunny and warm for the region, with an average of about 10 h sunshine per day (total 321h for the month), and a mean  $T_{\text{max}}$  of  $26^\circ\text{C}$  being  $4^\circ\text{C}$  higher than the long term mean.

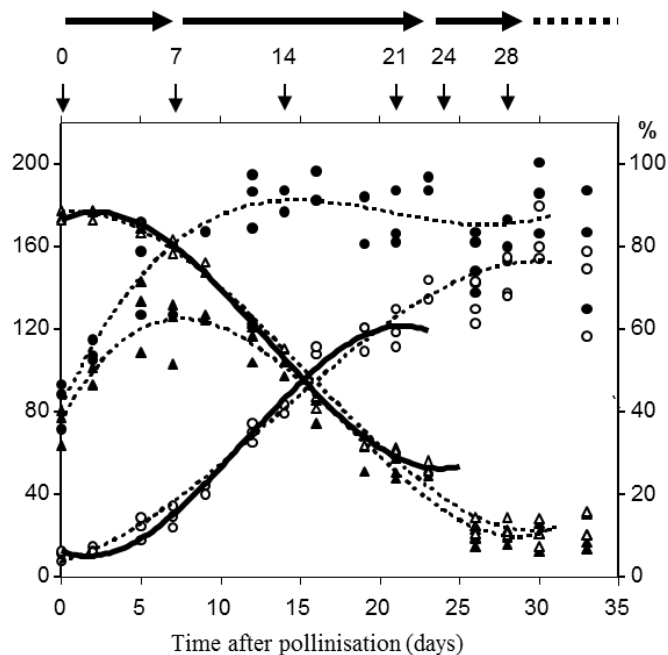
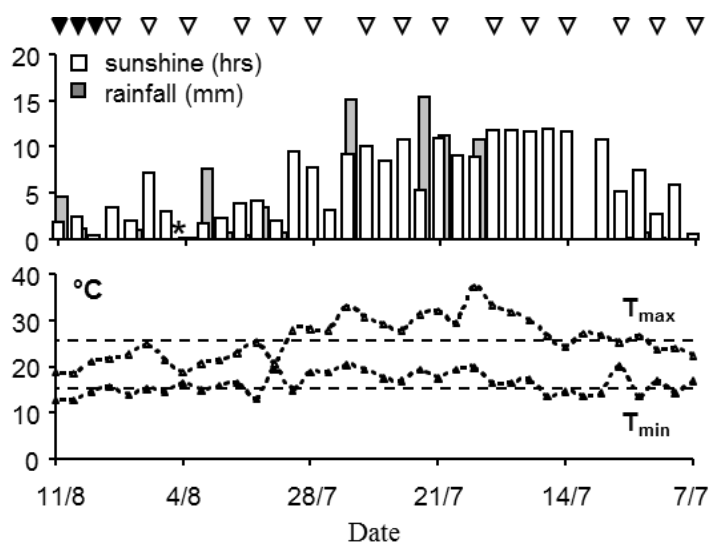


Fig. 6 Graph illustrating mass dynamics during achene development under natural conditions. The curves fitted through the changes of  $M_f$  ( $\bullet$ ),  $M_d$  ( $\circ$ ),  $M_w$  ( $\Delta$ ) and  $R_w$  ( $\blacktriangle$ ) are described by third order polynomials. The dashed lines correspond to the period 0-35 dap and the solid lines to the 0-25 dap period. The results shown correspond to plant B263.1.





**Fig. 7** Daily weather conditions during the period of achene development under natural conditions. Open arrow heads indicate the dates when opened capitula were tagged and pollinated by insects. Closed arrow heads indicate the harvest dates. The order of the dates has been inversed to correspond with the time after pollination as indicated in Fig. 6.

## DISCUSSION

Achene and seed development in *C. intybus* have been studied since long, but most studies were focussed on a particular aspect of these processes, i.e. development of the embryo (Carano, 1915; Cichan and Palser, 1982), of the endosperm (Dahlgren, 1920), or of the testa and fruit wall (Cichan and Palser, 1982; Cichan, 1983). A more or less complete histological study on achene and seed development was reported by Cichan and Palser (1982) for wild chicory. In our study, achene and seed development in cultivated root chicory were followed by different methods in the greenhouse and in an outdoor experiment. Changes in the colour of achenes and involucre bracts indicated that under the two different environmental conditions achenes had reached maturity at about four weeks after pollination. This was corroborated by the dynamics of  $R_w$  and  $M_d$  in the achenes developed under outdoor conditions showing a transition that corresponded to the end of embryo growth and the start of final achene maturation. The latter was also characterised by apparent chlorophyll degradation in the involucre bractea and in the achenes (cf. Fig.1). The similarity in achene and seed development under the two different environmental conditions allowed the establishment of an integrated timetable of visible (colour),

physiological (fresh mass, dry mass and water content), and histological changes during these processes (Fig. 8).

In comparison to the previously cited reports on wild chicories, the time elapsed between pollination and the development of mature achenes in our study was twice as long, i.e. 15 days for wild chicories vs. 30 days in root chicories. All the stages of achene development in wild chicories occurred earlier than in root chicory. In addition to the delay observed for the first division of the zygote, a global comparison of the timetable of events reveals that the time elapsed before the cotyledonary stage is about 1/3 of the total duration in both cases (i.e. about 5/14 days in wild chicories, and about 10/28 days in root chicory) and the remaining 2/3 are allocated to the embryo growth phase and late maturation phases. However, the late maturation phase covered one week in both cases meaning that it is the growth phase which was particularly affected, i.e. 5-8 dap for wild and 9-22 dap for root chicory. The weather conditions during the 2006 experiment (Fig. 7) were very similar as those for the regions in which the wild chicories grew (Carano, 1915; Cichan and Palser, 1982), suggesting that this difference is genetically determined, possibly as a result of selection during the domestication process. So far, no genetic variability in the timing of achene and/or seed development was detected in our material, which would have allowed mapping of QTL and/or genes for this character. It will therefore be interesting to enlarge our genetic resources for chicory, including wild accessions and other cultigroups, like witloof chicory (cf. Corbineau and Côme, 1990).

When compared to other reports on achene and seed development in chicory, our results confirm most of the general characteristics, i.e. the *Polygonum* type of embryo sac development, the occurrence of the *Asterad* type of embryo development, the nuclear endosperm later becoming cellularized and its persistence in the mature seed. Some structures which are common in the Asteraceae family were also described in this study such as uniseriate endothelium layer, periendotherial zone, conspicuous hypostase, antipodal cells which persist until globular stage. The involvement of these structures in nutrition of the developing embryo either by transferring nutrients or providing them after degeneration was hypothesized by some authors (Maheshwari, 1950; Kapil and Tiwari, 1978; Cichan and Palser, 1982, Newcomb, 1973; Forino et al., 2000; Fambrini et al., 2006).

At heart stage the *C. intybus* embryo rotates lengthwise over about 90°. Very few reports exist on zygotic embryo rotation during development except Lecomte et al. (1998) who observed embryo rotation of 90° in *Phaseolus vulgaris* at heart stage. In chicory, in view of its attained bilateral form, it may be that the rotation of the embryo, made possible by the degeneration of the suspensor, will facilitate the development of the cotyledons which have to fit the seed coat by reducing possible space constraints in a manner that the bilateral symmetry of ovule coincides with the bilateral axis of the dicotyledonary embryo (Hudson, 2000).

The mature seed in *C. intybus* is endospermic and this feature is observed in most of the Angiosperms (Müller et al., 2006) and, even though this tissue is reduced to two cell layers only, its storage function may be significant as numerous lipid bodies are present. In *Arabidopsis thaliana* seed where endosperm is limited to one cell layer, Penfield et al. (2004) showed that significant amounts of lipids were stored in the endosperm and that carbohydrates derived from these lipids are required for postgerminative seedling growth in the dark. Moreover, endosperm may also be implicated in preventing radicle growth and thus contributing to seed dormancy as reported in some Brassicaceae (Müller et al., 2006). In lettuce high temperatures can induce dormancy in most genotypes and weakening of the endosperm layer is a prerequisite for radicle protrusion at high temperature (Cantliffe et al., 2000).

This study reveals the occurrence of protein accumulation in the last phase of *C. intybus* embryogenesis, particularly in the cotyledons. The synthesis of proteins was also reported during the *Arabidopsis* embryo desiccation phase (Baud et al., 2002). During the maturation stage, the most abundant mRNAs in *Arabidopsis* embryos are those encoding the seed storage proteins which are thought to be a nitrogen source for the young seedlings (Pang et al., 1988). Further ultrastructural, biochemical and transcriptomic investigations are needed to a better understanding of protein, carbohydrate, and lipid metabolisms during the maturation stage and to obtain information regarding nutrition relationships between the embryo, the endosperm and the maternal tissues in chicory.

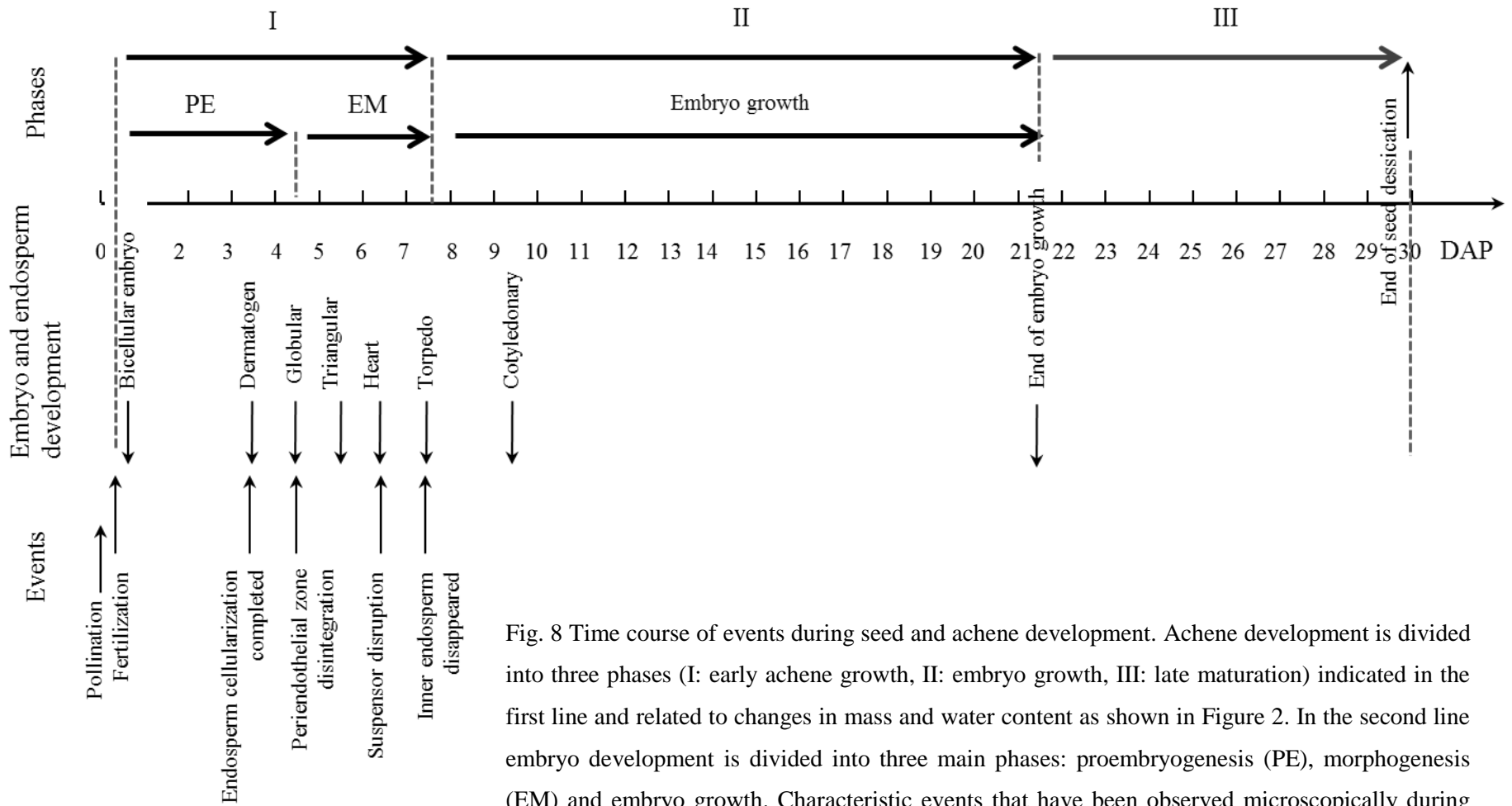


Fig. 8 Time course of events during seed and achene development. Achene development is divided into three phases (I: early achene growth, II: embryo growth, III: late maturation) indicated in the first line and related to changes in mass and water content as shown in Figure 2. In the second line embryo development is divided into three main phases: proembryogenesis (PE), morphogenesis (EM) and embryo growth. Characteristic events that have been observed microscopically during the development of embryo and endosperm are indicated at their respective time.

The timetable of the characteristic steps in normal achene development established for our root chicory material opens the way to molecular-genetic investigations on the underlying regulatory network. This may include the study of seedless achenes that formed as result of parthenocarpy and stenospermocarpy (Cichan and Palser, 1982) and in which this network is disturbed.

The root chicory studied originated from the Hungarian landrace Koospol and are used in our laboratory for research on different aspects of asexual and sexual reproduction, like somatic embryogenesis, male sterility and self incompatibility. A genetic map for the K28\*K59 progeny is available (Cadalen et al., 2010), and has allowed the co-localization of QTL and candidate genes for somatic embryogenesis capacity (Clabaut 2009), the latter selected based on their differential expression between high and low embryogenic genotypes (Legrand, 2006; Legrand et al., 2007; Lucau-Danila et al., 2010). To validate these candidate genes, the study of their expression during achene and seed development is an obvious next step (e.g. Fambrini et al., 2006). The K28xK59 progeny also showed segregations for traits related to sexual reproduction, like sporophytic self-incompatibility and nuclear male sterility, allowing us to start investigations on their molecular genetic regulation (Gonthier et al., 2010; Gonthier, 2011). During the many compatible and incompatible crosses performed to determine the S haplotypes of plants, the occurrence of seedless achenes in capitula that contained at least one normal seeded achene was observed frequently. This suggests that this plant material would also be well suited to pursuit the investigations on the development of seeded and seedless, i.e. parthenocarpic and/or stenospermocarpic, achenes.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Bruno Desprez (Ets Florimond-Desprez, Cappelle-en-Pévèle, France) for providing seeds of the Koospol population.

## LITERATURE CITED

- Baud S, Boutin JP, Miquel M, Lepiniec L, Rochat C. 2002.** An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 151-160.
- Blervacq AS, Dubois T, Dubois J, Vasseur J. 1995.** First divisions of somatic embryogenic cells in *Cichorium* hybrid "474". *Protoplasma* **186**: 163-168.
- Cadalen T, Morchen M, Blassiau C, Clabaut A, Scheer I, Hilbert J-L, Hendriks T, Quillet M-C. 2010.** Development of SSR markers and construction of a consensus map for chicory (*Cichorium intybus* L.). *Molecular Breeding* **25**: 699-722.
- Cantliffe DJ, Nascimento WM, Sung Y, Huber DJ. 2000.** Lettuce endosperm weakening: a role for endo- $\beta$ -mannanase in seed germination at high temperature. In: Black M, Bradford KJ, Vasquez-Ramos, eds. *Seed Biology: Advances and Applications*, 277-285.
- Carano E. 1915.** Ricerche sull'embryogenesi delle Asteraceae. *Annals of Botany* **13**: 251-301.
- Chaudhury AM, Koltunow A, Payne T, Luo M, Tucker MR, Dennis ES, and Peacock WJ. 2001.** Control of early seed development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **17**: 677-699.
- Cichan MA and Palser BF. 1982.** Development of normal and seedless achenes in *Cichorium intybus* (Compositae). *American Journal of Botany* **69**: 885-895.
- Cichan MA. 1983.** Self fertility in wild populations of *Cichorium intybus* L.. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **110**: 316-323.
- Clabaut A. 2009.** *Analyse génétique de l'embryogenèse somatique chez la chicorée (Cichorium intybus L.): cartographie des QTL et gènes candidats*. PhD thesis. University of Lille 1, France.
- Corbineau F, Côme D. 1990.** Germinability and quality of *Cichorium intybus* L. seeds. *Acta Horticulturae* **267**: 183-189.
- Dahlgren KVO. 1920.** Zur embryologie tier Kempositen mit besonderer Berücksichtigung der Endospermbildung. *Botanische Zeitung*. **12**: 481-516.
- Decout E, Dubois T, Guerida M, Dubois J, Audran JC, Vasseur J. 1994.** Role of temperature as a triggering signal for organogenesis or somatic embryogenesis in wounded leaves of chicory cultured in vitro. *Journal of Experimental Botany* **45**: 1859-1865.

- Dubois T, Dubois J, Guedira M, Vasseur J. 1988.** Embryogenèse somatique directe sur les styles de *Cichorium*: effets de la température et origine des embryoïdes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* **307**: 669–675.
- Dubois T, Guedira M, Dubois J, Vasseur J. 1990.** Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium*: is callose an early marker? *Annals of Botany* **65**: 539–545.
- Dubois T, Guedira M, Dubois J, Vasseur J. 1991.** Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*. A histological and SEM study of early stages. *Protoplasma* **162**: 120–127.
- Fambrini M, Durante C, Cionini G, Geri C, Giorgetti L, Michelotti V, Salvini M, Pugliesi C. 2006.** Characterization of *LEAFY COTYLEDON1-LIKE* gene in *Helianthus annuus* and its relationship with zygotic and somatic embryogenesis. *Development Genes and Evolution* **216**: 253-264.
- Fisher DB. 1968.** Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemistry* **16**: 92-96.
- Forino LM, Andreucci AC, Giraldi E, Tagliasacchi AM. 2000.** Cytohistochemical analysis of *Malus domestica* Borkh. seeds from shedding and nonshedding fruits. *International Journal of Plant Sciences* **161**: 463-472.
- Funk VA, Suzanna A, Stuessy TF, Robinson H. 2009.** *Classification of Compositae*. In: Funk VA, Suzanna A, Stuessy TF and Bayer RJ, eds. *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*, International Association for Plant Taxonomy, Vienna, 171-189.
- Gonthier L. 2011.** *Etude de l'autoincompatibilité chez la chicorée (Cichorium intybus L., Asteraceae): Cartographie génétique et physique du locus S*. PhD Thesis, University of Lille 1, France.
- Gonthier L, Bellec A, Blassiau C, Prat E, Helmstetter N, Rambaud C, Huss B, Hendriks T, Berges H, Quillet M-C. 2010.** Construction and characterization of two BAC libraries representing a deep-coverage of the genome of chicory (*Cichorium intybus* L., Asteraceae). *BMC Research Notes* **3**: 225-233.
- Grini PE, Jürgens G, Hülkamp M. 2002.** Embryo and endosperm development is disrupted in the female gametophytic *capulet* mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* **162**: 1911–1925.
- Heller R. 1953.** Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Annales de Sciences Naturelles* **14**: 1-223.

- Hudson A. 2000.** Development of symmetry in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**:349-70.
- Ingouff M, Jullien PE, Berger F. 2006.** The female gametophyte and the endosperm control cell proliferation and differentiation of the seed coat in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 3491–3501.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. New York, London: McGraw-Hill.
- Johansen DA. 1950.** *Plant embryology*. Chronica Botanica Co. Waltham, Mass.
- Kapil RN, Tiwari SC. 1978.** The integumentary tapetum. *Botanical Review* **44**: 457-490.
- Kaur N, Gupta AK. 2002.** Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences* **27**: 703-14
- Kiers AM. 2000.** Endive, chicory, and their wild relatives. A systematic and phylogenetic study of *Cichorium* (Asteraceae). *Gorteria*, Suppl. **5**: 1-78.
- Kilian N, Gemeinholzer B, Lack HW. 2009.** *Cichorieae* In: Funk VA, Suzanna A, Stuessy TF, Bayer RJ, eds. *Systematics, evolution, and biogeography of Compositae*. International Association for Plant Taxonomy, Vienna, 343-383.
- Ko S, Kamada H. 2002.** Enhancer-Trapping System for Somatic Embryogenesis in Carrot. *Plant Molecular Biology Reporter* **20**: 421a–421j.
- Komamine A, Murata N, Nomura K. 2005.** Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures: morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **41**: 6–10.
- Lecomte B, Longly B, Crabbé J, Baudoin JP. 1998.** Etude comparative du développement de l'ovule chez deux espèces de *Phaseolus*: *P. polyanthus* and *P. vulgaris*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2**: 77-84.
- Legrand S. 2006.** *Etude transcriptomique au cours des phases précoces de l'embryogenèse somatique chez la chicorée*. PhD thesis. University of Lille 1, France.
- Legrand S, Hendriks T, Hilbert JL, Quillet M-C. 2007.** Characterization of expressed sequence tags obtained by SSH during somatic embryogenesis in *Cichorium intybus* L. *BMC Plant Biology* **7**:27-38.
- Lucau-Danila A, Laborde L, Legrand S, Huot L, Hot D, Lemoine Y, Hilbert JL, Hawkins S, Quillet M-C, Hendriks T, Blervacq AS. 2010.** Identification of novel genes potentially involved in somatic embryogenesis in chicory (*Cichorium intybus* L.). *BMC Plant Biology* **10**:122



- Maheshwari P. 1950.** *An introduction to the embryology of Angiosperms*. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
- Michaux-Ferrière N, Grout H, Carron MP. 1992.** Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). *American Journal of Botany* **79**: 174-180.
- Müller K, Tintelnot S, Leubner-Metzger G. 2006.** Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **47**: 864–877.
- Newcomb W. 1973.** The development of the embryo sac of sunflower *Helianthus annuus* after fertilization. *Canadian Journal of Botany* **51**: 879-890.
- Pang PP, Pruitt RE, Meyerowitz EM. 1988.** Molecular cloning, genetic organization, expression and evolution of 12S seed storage protein genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **11**: 805-820.
- Penfield S, Rylott EL, Gilday AD, Graham S, Larson TR, Graham IA. 2004.** Reserve mobilization in the *Arabidopsis* endosperm fuels hypocotyl elongation in the dark, is independent of abscisic acid, and requires *PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE1*. *Plant Cell* **16**: 2705–2718.
- Singh G. 2004.** *Plant systematics. An integrated approach*. Science Publishers, Inc, Enfield.
- Ungru A, Nowack MK, Reymond M, Reza S, Manoj K, Sandra B, Grini PE, Schnittger A. 2008.** Natural variation in the degree of autonomous endosperm formation reveals independence and constraints of embryo growth during seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **179**: 829-841.
- Vasseur J, Dubois J, Hilbert JL, Couillerot JP. 1995.** Somatic embryogenesis in chicory (*Cichorium* species). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* **31**: 125-137.
- Wang Q, Cui J. 2011.** Perspectives and utilization technologies of chicory (*Cichorium intybus* L.): A review. *African Journal of Biotechnology* **10**: 1966-1977.



## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**



L'objectif général de ce travail a été de caractériser morphologiquement le développement de la fleur, de l'akène et de la graine chez *C. intybus* pour le cultigroupe de chicorée industrielle, dans le but d'établir des référentiels utilisables dans le cadre d'analyse de la reproduction chez cette espèce.

Dans un premier temps, la description des différents stades de développement chez les plantes fertiles nous a permis de mettre en place une base de référence pour les études visant le développement de la fleur pour les deux appareils reproducteurs mâle et femelle. Un accent particulier a été mis sur le développement des anthères, en raison de leur importance dans les phénomènes de stérilités mâles qui sont parmi les volets de recherche étudiés au sein de notre laboratoire.

Dans un second temps, l'exploitation du référentiel établi pour le développement floral a servi pour analyser les altérations développementales associées à la stérilité mâle nucléaire de type « Edith » et à la stérilité mâle cytoplasmique de type « 524 » obtenue par fusion de protoplastes (Rambaud et al. 1993), mais aussi pour examiner les modifications causées par les interactions entre le cytoplasme 524 et les noyaux des plantes appartenant à la population Jupiter et à la lignée CC.

Ces analyses ont permis de montrer que la stérilité mâle « Edith » est associée à un dysfonctionnement du tapis causant la dégénérescence des microspores juste après la méiose, mais aussi d'autres anomalies structurales comme la persistance de la couche moyenne et l'indéhiscence de l'anthère. En comparant ces résultats sur la stérilité mâle « Edith » à ceux observés chez des mutants mâles stériles qui ont été caractérisés chez les plantes modèles, les mêmes événements dans un même timing ont été observés chez les mutants *dyt1* d'*Arabidopsis* (Zhang et al. 2006), ce qui a incité le choix du gène *DYT1* comme candidat pour les analyses moléculaires de cette stérilité mâle. Ces analyses ont montré que chez la chicorée, c'est le gène *CiDYT* homologue à *DYT1* qui est affecté par la mutation. L'analyse histologique aura donc permis de caractériser le gène qui est affecté par la mutation responsable de la stérilité « Edith ».

Le référentiel du développement des anthères pourra également être exploité pendant l'étape de validation fonctionnelle pour ce gène *CiDYT*, notamment lors des analyses

d'hybridation *in situ* pour déterminer dans quel tissu et à quel stade ce gène est préférentiellement exprimé dans l'anthere.

Cela permettra une comparaison avec ce qui a été observé chez *Arabidopsis thaliana* où le gène *DYTI* est exprimé dans le tapis et atteint son plus haut niveau d'expression au stade des cellules mères des microspores (stade 5) et juste avant la méiose (stade 6) (Zhang et al. 2006).

Concernant la stérilité mâle cytoplasmique « 524 », plusieurs événements anormaux ont été observés au cours de la microsporogénèse dans plusieurs tissus jouant normalement des fonctions différentes tels que l'endothécium et le connectif, si bien qu'il est difficile de préciser histologiquement l'origine de cette stérilité. La dégénérescence des grains de pollen a lieu au niveau de la première mitose pollinique et par conséquent dans des conditions différentes de celles observées chez le tournesol, partenaire de fusion de la chicorée pour cette stérilité mâle et chez qui les microspores dégèrent juste après la deuxième division méiotique, avant la dégradation de la callose (Horner, 1977; Smart et al. 1994; Balk & Leaver 2001). Même s'il a été constaté que le mécanisme de stérilité mâle observé chez les plantes à cytoplasme 524 est bien différent de celui du tournesol mâle stérile, les analyses moléculaires réalisées jusqu'à ce jour n'ont pas encore pu identifier le déterminant moléculaire responsable de cette smc (Dubreucq et al. 1999).

La caractérisation morphologique de plantes mâle stériles cytoplasmiques présentant des morphologies florales plus ou moins affectées par des interactions nucléo-cytoplasmiques notamment par l'introduction d'un génotype nucléaire de type « Jupiter » a permis de mettre en évidence un mécanisme de restauration de la fertilité qui se manifeste histologiquement comme un caractère quantitatif à travers la viabilité des grains de pollen, la déhiscence et la coloration des anthères. Ce phénomène est très intéressant, d'autant plus que la smc chez la chicorée a été créée artificiellement par fusion de protoplastes. Du point de vue évolutif, il est étonnant pour cette situation particulière, de trouver des allèles nucléaires capables de restaurer la fertilité, à moins que cette stérilité ait déjà existé auparavant au sein de l'espèce ou qu'elle soit liée à un détournement d'une fonction de certaines protéines impliquées dans le rétablissement du fonctionnement normal de la cellule, notamment en cas de dysfonctionnement mitochondrial (Lurin et al. 2004; Hayes & Mulligan, 2011). C'est le cas des gènes qui codent les protéines PPR dont le rôle dans la restauration de la fertilité a été démontré pour un bon nombre de smc et se

manifeste à travers la modification de l'expression des gènes associés à la smc (Schnable & Wise, 1998). Par exemple, ces protéines induiraient la dégradation des transcrits du gène associé à la smc de type Boro II chez le riz (Wang et al. 2006) ou la réduction de l'accumulation des protéines exprimées par l'*orf125* responsable de la smc chez le radis (Koizuka et al. 2003). Dans le cas de la chicorée, il y a un intérêt considérable à envisager la caractérisation moléculaire du mécanisme de restauration de la fertilité pour les plantes ayant la smc 524, dans le but de comprendre ce phénomène mais aussi d'identifier le déterminant mitochondrial responsable de cette stérilité. Etant donné que cette restauration se révèle comme un caractère quantitatif, l'étude génétique de ce phénomène pourra se faire à travers une analyse QTL, et c'est dans cette perspective qu'un programme de croisements a débuté entre la lignée mainteneuse de stérilité (CC) à cytoplasme 524 et des plantes issues de la population Jupiter. Cette approche QTL sera facilitée par le fait qu'une carte génétique existe déjà chez la chicorée (Cadalen et al. 2010). Une analyse RFLP permettra de vérifier si le génome mitochondrial du cytoplasme « 524 » reste stable en présence du contexte nucléaire de « Jupiter » puis, suivra l'étape de fixer les allèles de restauration dans le génotype restaurateur et de déterminer s'il s'agit d'une hérédité simple ou complexe, dominante ou récessive.

Dans un troisième temps, un autre volet du développement chez la chicorée a été concerné par notre travail, à savoir le développement de l'akène et de la graine avec un accent particulier sur l'embryogenèse zygotique. Cette étude a été initiée dans le but de faire suite aux travaux réalisés dans le cadre de l'étude de l'embryogenèse somatique sur des individus appartenant à la population Koospol et pour lesquels il n'existait pas encore d'informations histologiques suffisantes sur le développement de l'embryon zygotique pour mener une étude comparée des deux processus d'embryogenèse chez la chicorée. Ainsi, cette analyse histologique du développement de l'embryon zygotique réalisée servira de préalable pour l'analyse de l'expression des gènes comme *STM* (*SHOOTMERISTEMLESS*), *AGO* (*ARGONAUTE*) et *AGP* (*ARABINOGALACTAN PROTEIN*) qui colocalisent avec les QTL impliqués dans l'embryogenèse somatique (Clabaut, 2009), mais dont on ne sait pas encore où et quand ils sont préférentiellement exprimés au cours de l'embryogenèse zygotique.

En comparant à d'autres études sur le développement de l'akène et de la graine dans des chicorées sauvages (Cichan & Palser, 1982), nous avons constaté une variabilité pour la durée de la maturation de la graine chez la chicorée. Cela nous a incités à mettre en place un référentiel propre à la chicorée industrielle, pour pouvoir comparer la durée des différentes phases du développement chez la chicorée industrielle et les chicorées sauvages. L'existence de cette variabilité pour la durée de maturation de la graine ouvre des perspectives sur l'étude des gènes responsables de la variation de la durée de cette étape importante du cycle de vie et sur la sélection de chicorées à durée de maturation courte. Le matériel végétal pour cette étude pourrait être recherché dans les différentes ressources génétiques disponibles: les chicorées sauvages chez lesquelles cette durée est courte (Cichan & Palser, 1982), les chicorées du cultigroupe witloof qui ont aussi manifesté une certaine variabilité pour ce trait (Corbineau & Côme, 1992), mais aussi parmi les chicorées industrielles.

Nous avons aussi décrit et illustré en détails les stades du développement de l'albumen chez la chicorée. Cette description pourra contribuer à la compréhension de la formation d'akènes sans graines mais ayant un albumen ou vice-versa. De tels akènes sont souvent observés chez les chicorées sauvages (Cichan & Palser, 1982) mais aussi chez la chicorée industrielle (communications personnelles de Hendriks T, Quillet M-C et Rambaud C) et la compréhension de l'origine de leur formation est intéressante pour la sélection des semences mais aussi pour comprendre les interactions moléculaires qui existent entre les tissus maternels, l'albumen et l'embryon. Chez *Arabidopsis thaliana*, des gènes comme par exemple *FIE* (*FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM*) et *FIS* (*FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED*) (Luo et al. 2000) et *MSI* (*MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1*) (Ingouff et al. 2006) impliqués dans ce genre d'interactions ont déjà été identifiés et seraient de bons candidats pour les analyses moléculaires chez la chicorée.

Un autre cadre d'étude qui pourra bénéficier de l'exploitation du référentiel du développement floral est celui de l'auto incompatibilité sporophytique chez la chicorée et qui est actuellement étudiée au sein du laboratoire SADV (Gonthier, 2011). Etant donné que les déterminants mâles de cette autoincompatibilité sont secrétés au niveau du tapis, la détermination des stades auxquels ces déterminants sont exprimés dans l'anthère, dans les microspores et dans



les grains de pollen sera facilitée par l'existence d'une description détaillée de la différenciation de cet organe comme celle fournie par ce travail.

Enfin, les référentiels mis en place pourront être utiles dans divers volets de recherche appliquée, notamment dans l'optimisation de la production de plantes haploïdes par culture *in vitro*. Même si la production de plantes haploïdes ou d'haploïdes doublées par la culture des anthères ou d'embryons immatures est problématique chez la chicorée (Desprez, 1993; Doré et al. 1996; Levieil, 1987), le choix du stade auquel il faut prélever l'explant est déterminant. Comme il est actuellement possible d'estimer le stade en se référant seulement à la taille des boutons inflorescentiels, ce choix devient plus facile. La culture *in vitro* d'embryons immatures chez la variété « Chioggia » de *C. intybus* a aussi été entreprise par Varotto et al. (2000) et s'est avérée être une méthode efficace pour obtenir rapidement des plantules destinées aux programmes de sélection. Dans cette étude, les embryons au stade cordé et torpille précoce se sont révélés les plus propices pour le sauvetage des embryons. Si tel était le cas pour la chicorée industrielle, le calendrier des événements décrits dans le référentiel du développement de la graine chez ce cultigroupe peut alors être utile pour pouvoir cibler avec précision, les akènes qui contiennent les stades d'embryons qui conviennent pour ce genre de culture.

Les deux référentiels mis en place lors de ce travail constituent donc des outils de choix dans de nombreux domaines de recherche fondamentale et appliquée.



**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ainsworth C (2000) Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. *Ann Bot* 86: 211-221

Ao C (2007) Comparative anatomy of bisexual and female florets, embryology in *Calendula officinalis* (Asteraceae), a naturalized horticultural plant. *Sci Hortic* 114: 214-219

Balk J and Leaver CJ (2001) The PET1-CMS mitochondrial mutation in Sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. *Plant Cell* 13:1803-1818

Bannerot H (1967) Rapport d'activité 1965-1967. Station de génétique et d'amélioration des plantes, INRA de Versailles

Bedinger P (1992) The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* 4: 879-887

Bergman P, Edqvist J, Farbos I and Glimelius K (2000) Male sterile tobacco displays abnormal mitochondrial atp1 transcript accumulation and reduced floral ATP/ADP ratio. *Plant Mol Biol* 42: 531-544

Bhandari NN (1984 ) The microsporangium. In: Johri BM (ed) *Embryology of Angiosperms*, Springer-Verlag, Berlin

Blackmore S, Wortley AH, Skvarla JJ and Rowley JR (2007) Pollen wall development in flowering plants. *New Phytol* 174: 483-498

Blervacq AS, Dubois T, Dubois J and Vasseur J (1995) First divisions of somatic embryogenic cells in *Cichorium* hybrid "474". *Protoplasma* 186: 163-168.

Bremer K (1994) *Asteraceae, cladistics and classification*. Timber Press, Portland, Oregon

Broholm SK, Pöllänen E, Ruokolainen S, Tähtiharju S, Kotilainen M, Albert VA, Elomaa P and Teeri TH (2010) Functional characterization of B class MADS-box transcription factors in *Gerbera hybrida*. *J Exp Bot* 61: 75-85

Budar F and Pelletier G (2001) Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. *C R Acad Sci III* 324: 543-550

Cadalen T, Mörchen M, Blassiau C, Clabaut A, Scheer I, Hilbert J-L, Hendriks T and Quillet M-C (2010) Development of SSR markers and construction of a consensus genetic map for chicory (*Cichorium intybus* L.). *Mol Breed* 25: 699-722

Carano E (1915) Ricerche sull'embryogenesi delle Asteraceae. *Annals of Botany* 13: 251-301

Chaudhury AM, Koltunow A, Payne T, Luo M, Tucker MR, Dennis ES and Peacock WJ (2001) Control of early seed development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 677–699

Chehregani A, Mohsenzadeh F and Ghanad M (2011) Male and female gametophyte development in *Cichorium intybus*. *Int J Agr Biol* 13: 603–606

Cichan MA (1983) Self fertility in wild populations of *Cichorium intybus* L. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 110: 316-323.

Cichan MA and Palser BF (1982) Development of normal and seedless achenes in *Cichorium intybus* (Compositae). *Am J Bot* 69: 885-895.

Clabaut A (2009) *Analyse génétique de l'embryogenèse somatique chez la chicorée (Cichorium intybus L.): cartographie des QTL et gènes candidats*. Thèse à l'Université Lille1, France

Coen ES and Meyerowitz EM (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31-37

Colombo L, Franken J, Koetje E, van Went J, Dons HJM, Angenent GC and van Tunen AJ (1995) The petunia MADS Box gene FBPI7 determines ovule identity. *Plant Cell* 7: 1859-1868

Corbineau F and Côme D (1990) Germinability and quality of *Cichorium intybus* L. seeds. *Acta Horticulturae* 267: 183-189.

Cronquist A (1988) *The evolution and classification of flowering plants*, 2nd ed. The New York Bot. Gard., New York

Dahlgren R (1975) The distribution of characters within an angiosperm system. I. Some embryological characters. *Bet Notiser* 128: 181-197

Darwin C (1877) *Different forms of flowers on plants of the same species*. Murray, London

Davis GL (1966) *Systematic embryology of the angiosperms*. J. Willey & Sons, New York

Desprez B (1993) *Recherche de méthodes d'obtention de plantes haploïdes chez la chicorée (Cichorium intybus L.)*. Thèse de l'Université de Paris VI, France

Desprez B, Delesalle L, Dhellemmes C and Desprez M, 1994. Genetics and breeding of industrial chicory. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France* 80: 47-62

- Doré C, Prigent J and Desprez B (1996) In situ gynogenetic haploid plants of chicory (*Cichorium intybus* L.) after intergeneric hybridization with *Cicerbita alpina* Walbr.. Plant Cell Rep 15: 758-761
- Dubois T, Guedira M, Dubois J and Vasseur J (1991) Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium* - a histological and SEM study of early stages. Protoplasma 162: 120-12
- Dubreucq A, Berthe B, Asset J-F, Boulidard L, Budar F, Vasseur J and Rambaud C (1999) Analyses of mitochondrial DNA structure and expression in three cytoplasmic male-sterile chicories originating from somatic hybridisation between fertile chicory and CMS sunflower protoplasts. Theor Appl Genet 99: 1094-1105
- Eenink AH (1981) Compatibility and incompatibility in Witloof chicory (*Cichorium intybus* L.). 4. Formation of self-seeds on a selfincompatible and a moderately selfcompatible genotype after double and triple pollinations. Euphytica 33: 161-167
- Fei H, Zhang R, Pharis RP and Sawhney VK (2004) Pleiotropic effects of the male sterile33 (ms 33 ) mutation in Arabidopsis are associated with modifications in endogenous gibberellins, indole-3-acetic acid and abscisic acid. Planta 219: 649-660
- Ferrario S, Immink RGH and Angenent GC (2004) Conservation and diversity in flower land. Curr Opin Plant Biol 7: 84–91
- Forde BG and Leaver CJ (1980) Mitochondrial genome expression in maize: possible involvement of variant mitochondrial polypeptides in cytoplasmic male sterility. Plant Genome : 131-136
- Friedt W (1992) Present state and future prospects of biotechnology in sunflower breeding. Field Crops Research: 425-442
- Funk VA, Suzanna A, Stuessy TF and Robinson H (2009) Classification of Compositae. In: Funk VA, Suzanna A, Stuessy TF and Bayer RJ (eds) Systematics, Evolution, and Biogeography of COMPOSITAE, International Association for Plant Taxonomy, Vienna, 171-189.
- Gillaspy G, Ben-David H and Gruissem W (1993) Fruits: a developmental perspective. Plant Cell 5: 1439-1451
- Glover J, Grelon M, Craig S, Chaudury A and Dennis L (1998) Cloning and characterisation of MS5 from *Arabidopsis*: a gene critical in male meiosis. Plant J 15: 345–356

Gonthier L (2011) *Etude de l'autoincompatibilité chez la chicorée (Cichorium intybus L., Asteraceae): Cartographie génétique et physique du locus S*. Thèse à l'Université Lille1, France

Gotelli MM, Galati BG and Medan D (2008) Embryology of *Helianthus annuus* (Asteraceae). *Ann. Bot. Fennici* 45: 81-96

Hanson MR and Bentolila S (2004) Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell* 16 Suppl: S154-169

Harris E (1995) Inflorescence and floral ontogeny in Asteraceae: a synthesis of historical and current concepts. *Bot Rev* 61: 94-121

Hayes ML and Mulligan RM (2011) Pentatricopeptide repeat proteins constrain genome evolution in chloroplasts. *Mol Biol Evol* 28: 2029-2039

Hernandez LF (2008) Visit path pattern of the honeybee (*Apis mellifera* L.) on the sunflower capitulum-correspondence with the location of seedless and incompletely developed fruits. *Helia* 31: 1-16

Heslop-Harrison J (1987) Pollen germination and pollen-tube growth. *Int Rev Cytol* 107: 1-78

Heywood VH (2009) The recent history of Compositae systematics: from daisies to deep achenes, sitters groups and metatrees. In: Funk VA, Suzanna A, Stuessy TF and Bayer RJ (eds) *Systematics, evolution, and biogeography of Compositae*, International Association for plant taxonomy, Vienna, 39-44

Horner H (1977) A comparative light- and electron-microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile sunflower (*Helianthus annuus*). *Am J Bot* 64:745—759

Ingouff M, Jullien PE and Berger F (2006) The female gametophyte and the endosperm control cell proliferation and differentiation of the seed coat in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 3491–3501.

Jian L, Nianjun T, Chen S, Chen F, Chunqing S and Fang W (2009) Reproductive characteristics of *Opisthopappus taihangensis* (Ling) Shih, an endangered Asteraceae species endemic to China. *Scientia Horticulturae* 121: 474-479

Johansen DA (1950) *Plant embryology*. Chronica Botanical Co. Waltham, Mass.

Jones RL (1974) The structure of the lettuce endosperm. *Planta* 121: 133-147



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Jung KH, Han MJ, Lee YS, Kim YW, Hwang I, Kim MJ, Kim Y-K, Nahm BH and An G (2005) Rice *UNDEVELOPED TAPETUM1* is a major regulator of early tapetum development. *Plant Cell* 17: 2705-2722
- Kater MM, Dreni L and Colombo L (2006) Functional conservation of MADS-box factors controlling floral organ identity in rice and *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 57: 3433–3444
- Kaul MLH (1988) Male Sterility in Higher Plants. Springer-Verlag, Berlin
- Kaur N and Gupta AK (2002) Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J Biosci* 27: 703-14
- Keijzer CJ (1987) The processes of anther dehiscence and pollen dispersal I. The opening mechanism of longitudinally dehiscing anthers. *New Phytol* 105:487-498
- Kiers AM, Mes THM, Van der Meijden R and Bachmann K (2000) A search for diagnostic AFLP markers in *Cichorium* species with emphasis on endive and chicory cultivar groups. *Genome* 43: 470–476
- Kilian N, Gemeinholzer B and Lack HW (2009) Cichorieae In: Funk VA, Suzanna A, Stuessy TF and Bayer RJ (eds) Systematics, evolution, and biogeography of Compositae, International Association for Plant Taxonomy, Vienna, 343-383
- Koizuka N, Imai R, Fujimoto H, Hayakawa T, Kimura Y, Kohno-Murase J, Sakai T, Kawasaki S and Imamura J (2003) Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, *orf687*, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosena radish. *Plant J* 34:407-415
- Köhler RH, Horn R, Lossl A and Zetsche K (1991) Cytoplasmic male-sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the ATPa gene. *Mol Gen Genet*, 227: 369-376
- Koltunow AM, Johnson SD and Bicknell RA (1998) Sexual and apomictic development in *Hieracium*. *Sex Plant Reprod* 11: 213–230.
- Kotilainen M (2000) Flower development in *Gerbera hybrida*, Asteraceae. Thesis, Institute of Biotechnology University of Helsinki, Finland
- Krizek BA and Fletcher JC (2005) Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nat Rev Genet* 6: 688-698

Ku S, Yoon H, Suh HS and Chung YY (2003) Male-sterility of thermosensitive genic male-sterile rice is associated with premature programmed cell death of the tapetum. *Planta* 217: 559-565

Laitinen RAE, Broholm S, Albert VA, Teeri TH and Elomaa P (2006) Patterns of MADS-box gene expression mark flower-type development in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *BMC Plant Biol* 6: 11

Laver HK, Reynolds SJ, Monoger F and Leaver CJ (1991) Mitochondrial genome organization and expression associated with cytoplasmic male-sterility in sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant J* 1: 185-193

Leclercq P (1969) Une stérilité mâle cytoplasmique chez le tournesol *Ann Amélior Plant* 19: 99-106.

Legrand S (2006) *Etude transcriptomique au cours des phases précoces de l'embryogenèse somatique chez la chicorée*. Thèse à l'Université Lille1, France

Legrand S, Hendriks T, Hilbert JL and Quillet MC (2007). Characterization of expressed sequence tags obtained by SSH during somatic embryogenesis in *Cichorium intybus* L. *BMC Plant Biol* 7: 27-38

Lersten NR and Curtis JD (1990) Invasive tapetum and tricelled pollen in *Ambrosia trifida* (Asteraceae, tribe Heliantheae). *Plant Syst Evol* 169: 237–243

Levieil C (1987) *Etudes cytologique et génétique de la reproduction sexuée chez la chicorée (Cichorium intybus L.)*. Thèse, Université de Paris-Sud Centre d'Orsay, France

Li GD and Kemp PD (2005) Forage chicory (*Cichorium intybus* L.): a review of its agronomy and animal production. *Advances in Agronomy* 88: 187-222.

Li SQ, Wan CX, Kong J, Zhang ZJ, Li YS and Zhu YG (2004) Programmed cell death during microgenesis in a Honglian CMS line of rice is correlated with oxidative stress in mitochondria. *Funct Plant Biol* 31: 369–376

Liu F, Cui X, Horner HT, Weiner H and Schnable PS (2001) Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize. *Plant Cell* 13: 1063-1078

Liu JQ (2001a) Embryology of *Ligularia przewalskii*. *Acta Bot Boreal Occident Sin* 21:900–904 (in Chinese, with English abstract)

Liu JQ (2001b) Embryology of *Tussilago farfara* (Asteraceae: Senecioneae). *Acta Bot Boreal Occident Sin* 21:520–525 (in Chinese, with English abstract)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lucau-Danila A, Laborde L, Legrand S, Huot L, Hot D, Lemoine Y, Hilbert JL, Hawkins S, Quillet MC, Hendriks T and Blervacq AS (2010) Identification of novel genes potentially involved in somatic embryogenesis in chicory (*Cichorium intybus* L.). *BMC Plant Biol* 10:122
- Lucchin M, Varotto S, Barcaccia G and Parrini P (2008) Chicory and endive. In: *Vegetables I*. Edited by Prohen J, Nuez F. New-York: Springer; 3-48
- Luo M, Bilodeau P, S E, Dennis ES, Peacock W and Chaudhury A (2000) Expression and parent-of-origin effects for *FIS2*, *MEA*, and *FIE* in the endosperm and embryo of developing *Arabidopsis* seeds. *Proc Natl Acad Sci* 97: 10637-10642
- Lurin C, Andrés C, Aubourg S et al. (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* Pentatricopeptide Repeat Proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16:2089–2103
- Maheshwari Devi H (1963) Embryological studies in Compositae. 4. Heliantheae. *Proc. Indian Acad. Sci. Ser. B*. 58: 27-290.
- Maheshwari P (1950) An introduction to the embryology of Angiosperms. Mc Graw-Hill Book Co. Inc., New York
- Mariani C, De Beuckeleer M, Truettner J, Leemans J and Goldberg RB (1990) Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347: 737-741
- Mascre M and Thomas R (1930) Le tapis staminal (assise nourricière du pollen) chez les angiospermes. *Bull Soc Bot Fr* 77: 654-664
- Matthew M, Evans S and Kermicle JL (2001) Interaction between maternal effect and zygotic effect mutations during maize seed development. *Genetics* 159: 303-315
- Meyer D and Stasse-Wolthuis M (2009) The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. *Eur J Clin Nutr* 63: 1277-1289
- Meyerowitz EM, Smyth DR and Bowman JL (1989) Abnormal flowers and pattern formation in floral development. *Development* 106: 209-217
- Misra S (1972) Floral Morphology of the Family Compositae IV. Tribe Vernoniae- *Vernonia anthelmintica*. *Bot Mag* 85: 187-199
- Moffatt BA and Sommerville CR (1988) Positive selection for male-sterile mutants of *Arabidopsis thaliana* lacking adenine phosphoribosyltransferase activity. *Plant Physiol* 86: 1150–1154

Newcomb W (1973). The development of the embryo sac of sunflower *Helianthus annuus* after fertilization. *Can J Bot* 51: 879-890.

Newton KJ and Walbot V (1985) Maize mitochondria synthesize organ-specific polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 6879-83

Noyes RD (2007) Apomixis in the Asteraceae: Diamonds in the Rough. Global Science Books, Arkansas

Op den Camp RG and Kuhlemeier C (1997) Aldehyde dehydrogenase in tobacco pollen. *Plant Mol Biol* 35: 355-365

Pacini E, Franchi GG and Hesse M (1985) The tapetum: its form, function, and possible phylogeny in *Embryophyta*. *Pl Syst Evol* 149: 155-185

Pacini E and Keijzer CJ (1989) Ontogeny of intruding non-periplasmic tapetum in the wild chicory, *Cichorium intybus* (Compositae). *Pl Syst Evol* 167:149-164

Pandey, AK Chopra S and Singh RP (1983) Development and structure of seeds and fruits in Compositae, tribe Inuleae. *Proc Indian Acad Sci* 92: 467-471

Pecaut P (1962) Etude sur le système de reproduction de l'endive (*Cichorium intybus* L.). *Ann Plant* 12 : 265-296.

Pelaz S, Ditta GS, Baumann E, Wisman E and Yanofsky MF (2000) B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature* 405: 200-203.

Pelletier G and Budar F (2007) The molecular biology of cytoplasmically inherited male sterility and prospects for its engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 121-125

Pool-Zobel BL (2006) Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *Br J Nutr* 93: S73-S90

Pullaiah T (1978) Embryology of Compositae. III. The Tribe-Astereae. *Bot Mag Tokyo* 91: 197-205

Pullaiah T (1984) Embryology of Compositae. Today and Tomorrow's Printers & Publ, New Delhi

Rambaud C, Bellamy A, Dubreucq A, Bourquin J-C and Vasseur J (1997) Molecular analysis of the fourth progeny of plants derived from a cytoplasmic male sterile chicory cybrid. *Plant Breeding* 116: 481-486

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rambaud C, Dubois J and Vasseur J (1993) Male sterile chicory cybrids obtained by intergeneric protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 87: 347-352
- Regan SM and Moffatt BA (1990) Cytochemical analysis of pollen development in wild-type *Arabidopsis* and a male-sterile mutant. *Plant Cell* 2:877-889
- Robles P and Pelaz S (2005) Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *Int J Dev Biol* 49 633-643
- Ruokolainen S, Peng Ng Y, Albert VA, Eloma P and Teeri TH (2010) Large scale interaction analysis predicts that the *Gerbera hybrida* floral E function is provided both by general and specialized proteins. *BMC Plant Biol* 10:129
- Saxena KB, Sultana R, Mallikarjuna N, Saxena RK, Kumar RV, Sawargaonkar S and Varshney RK (2010) Male-sterility systems in pigeonpea and their role in enhancing yield. *Plant Breeding* 129: 125-134
- Schnable PS and Wise RP (1998) The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends Plant Sci* 3: 175-180
- Sharma HP and Murty YS (1978) Embryological studies in the Composite Astereae-II. *Proc Indian Acad Sci* 87: 149-156
- Simpson BB (2009) Economic importance of Compositae. In: Funk VA, Suzanna A, Stuessy TF and Bayer RJ (eds) *Systematics, evolution, and biogeography of Compositae* International Association for plant taxonomy, Vienna, 45-58
- Small J (1917) The origin and development of the Compositae. I. History of classification of the *Compositae* *New Phytol* 16: 157-177
- Smart CJ, Monéger F and Leaver CJ (1994) Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower. *Plant Cell* 6:811-825
- Soltis DE, Ma H, Frohlich MW, Soltis PS and Albert VA, Oppenheimer DG, Altman NS, dePamphilis CW and Leebens-Mack JH (2007) The floral genome: an evolutionary history of gene duplication and shifting patterns of gene expression. *Trends in Plant Science* 12: 1360-1385
- Teeri TH, Uimari A, Kotilainen M, Laitinen R, Help H, Elomaa P and Albert VA (2006) Reproductive meristem fates in *Gerbera*. *J Exp Bot* 57: 3445-3455
- Teixeira RT, Knorpp C and Glimelius K (2005) Modified sucrose, starch, and ATP levels in two alloplasmic male-sterile lines of *B. napus*. *J Exp Bot* 56: 1245-1253

Teng NJ, Chen FD, Ma X and Hou XL (2008) Investigation on megasporogenesis, megagametogenesis and embryogenesis in *Dendranthema nankingense*. J Nanjing Agric Univ 31:47–51 (in Chinese, with English abstract).

Theissen G (2001) Development of floral organ identity: stories from the MADS house. Curr Opin Plant Biol 4: 75–85

Theissen G and Saedler H (2001) Floral quartets. Nature 409: 469-471.

Tobe H (1989) The embryology of angiosperms: its broad application to the systematic and evolutionary study. Bot Mag Tokyo 102: 351-367

Tucker MR, Araujo AC, Paech NA, Hecht V, Schmidt ED, Rossell JB, De Vries SC and Koltunow AM (2003). Sexual and apomictic reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* are closely interrelated developmental pathways. Plant Cell 15: 1524–1537

Van der Meer IM, Stam ME, vanTunen AJ, Mol JNM and Stuitje AR (1992) Antisense Inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. Plant Cell 4: 253-262

Van Dijk PJ, Tas IC, Falque M and Bakx-Schotman T (1999) Crosses between sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum*). II. The breakdown of apomixis. Heredity 83: 715-721

Varotto S, Lucchin M and Parrini P (2000) Immature embryos culture in Italian red chicory. Plant Cell, Tiss Organ Cult 62: 75-77,

Varotto S, Parrini P and Mariani P (1996) Pollen ontogeny in *Cichorium intybus* L.. Grana 35: 154-161

Vijayaraghavan MR and Prabhakar K. (1984) The endosperm. In: Johri BM (ed) Embryology of Angiosperms, Springer-Verlag, Berlin, pp 319-376.

Wang Q and Cui J (2011) Perspectives and utilization technologies of chicory (*Cichorium intybus* L.): A review. Afr J Biot 10: 1966-1977

Wang Z, Zou Y, Li X et al. (2006) Cytoplasmic male sterility of rice with Boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. Plant Cell 18: 676-687

Wu H and Yang M (2005) Reduction in vacuolar volume in the tapetal cell coincides with conclusion of the tetrad stage in *Arabidopsis thaliana*. Sex Plant Reprod 18:173–178

Yeung EC, Oinam GS, Yeung SS and Harry I (2011) Anther, pollen and tapetum development in safflower, *Carthamus tinctorius* L. Sex Plant Reprod doi 10.1007/s00497-011-0168-x

*REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

Zhan X, Wu H and Cheung AY (1996) Nuclear male sterility induced by pollen-specific expression of a ribonuclease. *Sex Plant Reprod* 9: 35-43

Zhang W, Sun Y, Timofejeva L, Chen C, Grossniklaus U and Ma H (2006) Control of *Arabidopsis* tapetum development by *DYSFUNCTIONAL TAPETUM 1 (DYTI)* encoding a putative bHLH transcription factor. *Development* 133: 3085–3095

**Setting up morphological references for flower and seed development in chicory (*Cichorium intybus* L., Asteraceae)**

**ABSTRACT**

To provide a useful reference for morphological studies on flower and seed development in *Cichorium intybus*, the normal development for these two organs was histologically examined. With reference to the morphological events during normal flower development, the nuclear male sterility named "Edith" was described histologically and the resemblance with some mutants in *Arabidopsis thaliana* and rice helped for selection of candidate genes for molecular analyses of this male sterility type.

The same reference allowed us to characterise the cytoplasmic male sterility named "524" which was created by fusion of protoplasts from male sterile sunflower and from fertile chicory. Moreover, morphological analysis of flower development in plants carrying the cytoplasm "524" led us to demonstrate the existence of a mechanism of fertility restoration for which heredity needs to be investigated.

For the achene and seed development, the timing of events and morphological and physiological characterisation of developmental stages revealed genetic variability in the duration of achene and seed development in chicories. The reference established for achene and zygotic embryo development will help more particularly analysing expression of genes which have been previously shown to be involved in the somatic embryogenesis process in chicory.

**Key words:** chicory (*Cichorium intybus* L.), Asteraceae, flower development, achene, cytoplasmic male sterility, nuclear male sterility, embryo development





## RESUME

Dans le but de fournir une base de référence utile pour les études morphologiques du développement de la fleur et de la graine chez *Cichorium intybus*, le développement normal de ces deux organes a été analysé histologiquement. Le référentiel établi pour le développement floral normal nous a servi pour décrire histologiquement la stérilité mâle nucléaire nommée « Edith ». Les ressemblances histologiques entre le mâle stérile « Edith » avec certains mutants d'*Arabidopsis thaliana* et du riz ont servi dans le choix de gènes candidats pour les études moléculaires de ce type de stérilité mâle.

Ce même référentiel nous a permis de caractériser la stérilité mâle cytoplasmique «524», créée par fusion de protoplastes de tournesol mâle stérile et de chicorée fertile. Par ailleurs, l'analyse morphologique du développement floral chez des plantes portant le cytoplasme « 524 » nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un mécanisme de restauration de la fertilité, mais dont la nature génétique reste à déterminer.

Pour le développement de l'akène et de la graine, la chronologie des événements, ainsi que la caractérisation morphologique et physiologique des différents stades de développement ont prouvé qu'il existe une variabilité génétique pour la durée du développement de l'akène et de la graine chez les chicorées. Le référentiel pour le développement de l'akène et de l'embryon zygotique pourra notamment servir aux analyses d'expression des gènes candidats qui ont été identifiés pendant les études antérieures sur l'embryogenèse somatique chez la chicorée.

**Mots-clés:** Chicorée (*Cichorium intybus* L.), Asteraceae, développement floral, akène, stérilité mâle cytoplasmique, stérilité mâle nucléaire, développement embryonnaire