

ANALYSE DE LA CAPACITÉ ANDROGÉNÉTIQUE DE TROIS CULTIVARS DE BLÉ DUR (*TRITICUM DURUM*) ET TROIS CULTIVARS DE BLÉ TENDRE (*TRITICUM AESTIVUM*)

Younes El Goumi, Malika Fakiri, Ouafa Lamsaouri, Mounsif Benchekroun et Mohamed Fouad Hassani

Univ. Hassan 1, faculté des sciences et techniques, laboratoire d'agro-alimentaires et santé,
B.P. 577, 26000 Settat, Maroc
elgoumiyounes@hotmail.com

(Received 24 July 2012 - Accepted 19 June 2013)

RÉSUMÉ

*L'utilisation d'haploïdes intervient très avantageusement dans la création variétale des céréales. Cependant, la technique d'obtention des haploïdes et/ou haploïdes doublés par culture in vitro d'anthers est déterminée par nombreux facteurs aussi bien biologiques que physiques ou chimiques. Ces travaux présentent la réponse androgénétique de trois cultivars de blé dur, *Triticum durum* (Karim, Carioca, Sarif,) et de trois de blé tendre, *Triticum aestivum* (Aguilal, Amal et Arrehane), soumis à un prétraitement au froid à 4°C pendant 14 jours (contre un témoin), et ceci, en comparant trois milieux de mise en culture (MS, C17 et BPTG). Un effet bénéfique du prétraitement thermique est mis en évidence pour l'induction d'embryons et la production de calus, mais aussi, sur la qualité des régénérants. Il est aussi à constater que les embryons produits sur milieu C17 donnent plus de plantes chlorophylliennes que ceux provenant du milieu BPTG ; effectivement, sur ce dernier, l'albinisme s'exprime avec un taux de 66,67%, alors que sur C17 ce taux n'est que de 16,67%. On souligne que les facteurs « espèce » et « génotype » sont très marquants relativement à l'induction d'embryons et à la régénération des plantules chlorophylliennes, et que seuls les cultivars de blé tendre ont donné des résultats positifs, le blé dur demeure un génotype récalcitrant surtout pour la régénération des plantules.*

Mots-clés: culture *in vitro*, androgénèse, *Triticum durum*, *Triticum aestivum*, plantes chlorophylliennes, albinisme

ABSTRACT

*Haploid plants production through in vitro anthers culture is a very useful technique for plant improvement as to create new varieties. Nevertheless, success depends on many parameters as species and cultivars, as well as pre-treatments and conditions of in vitro culture. Thus, the androgenetic responses of three bread wheat (*Triticum aestivum*, Aguilal, Amal and Arrehane) and three durum wheat (*Triticum durum*, Karim, Carioca and Sarif) were observed after a 4°C cold pre-treatment of the spikes for 14 days, against a control (receiving no treatment), and comparing the efficiency of three different media (MS, C17 and BPTG). Cold pre-treatment showed to induce either embryos or calluses and could thus be*

considered as an enhancer of embryogenesis. Embryos coming out from C17 medium gave many more green plantlets than from BPTG. Albinism was highly expressed on BPTG medium, i.e. for 66.67% of the plantlets, while it appeared for only 16.67% on C17. Among all the genotypes experimented here, only bread wheat cultivars were able to regenerate plantlets, durum wheat remained a recalcitrant genotype to regenerate plantlets, confirming the impact of species and cultivars on embryos induction and regeneration.

Keywords: *in vitro* culture, androgenesis, *Triticum durum*, *Triticum aestivum*, chlorophyllian plants, albinism

INTRODUCTION

Les biotechnologies végétales offrent des outils très précieux pour l'amélioration variétale. Les techniques d'haplodiploïdisation, permettent ainsi l'obtention de lignées homozygotes (ou fixées) en un temps plus bref que celui nécessaire aux générations classiques d'autofécondations. Alors, l'utilisation de lignées produites par culture *in vitro* de cellules gamétophytiques mâles (androgénèse) ou femelles (gynogénèse) permet une accélération des programmes de sélection. On souligne aussi que chez les haploïdes doublés (HD), théoriquement, l'expression de tous les gènes peut être enregistrée, qu'ils soient dominants ou récessifs ; ceci permet un choix plus sûr des parents d'entrée en sélection, pour la création de nouvelles variétés (Picard *et al.*, 1994). Qu'ils soient issus d'androgénèse ou de gynogénèse, les HD présentent l'avantage d'une homozygotie totale, a priori, ce qui leur permet aussi des utilisations élégantes dans la recherche en génétique (Serghini, 2006), telle la cartographie des diverses espèces de céréales (Tanhuanpää *et al.*, 2008).

Ainsi que proposé dès les années 1970 par Demarly (1977), sous l'effet du stress lié au prélèvement et aux conditions de culture *in vitro*, la microspore (contenue dans les anthères), ou les cellules du sac embryonnaire, passent de la voie gamétophytique vers une voie sporophytique puis embryogène, aboutissant ainsi à un embryon, et à une plante haploïde ou haploïde doublée (Demarly, 1977; Demarly *et al.*, 1989; Shariatpanahi *et al.*, 2006). En fait, après les premières plantes haploïdes obtenues dans les années 1960 par culture *in vitro* des anthères de *Datura innoxia* (Guha & Maheshwari, 1964), les premiers haploïdes de blé tendre issus d'androgénèse furent publiés en 1973, par Picard et De Buyser (1973), et aussi, simultanément, par Ouyang *et al.* (1973).

Cependant l'efficacité d'établissement de ces techniques s'avère liée à l'espèce et au génotype (Foroughi-Wehr *et al.*, 1982; Larsen *et al.*, 1991; El Haddoury *et al.*, 1993). Chez les céréales, les premières à être opérationnelles ont été le blé tendre (Lashermes *et al.*, 1991; Chlyah *et al.*, 1999; Amara *et al.*, 1999; Dagüstü, 2008), l'orge (Sibi & Fakiri, 2000; Hassawi, 2004; Wiethölter *et al.*, 2008), les triticales (Marciniak *et al.*, 2003), l'avoine (Ślusarkiewicz-jarzina & Ponitka, 2007), le riz (Talebi *et al.*, 2007), mais la réussite a été beaucoup plus tardive chez le blé dur qui avait été qualifié de « récalcitrant ».

Ainsi, après les balbutiements obtenus par Aïssa (1977) et les résultats isolés sur *T. turgidum* (Ghaemi *et al.*, 1993), il a fallu attendre 1998 pour obtenir chez *T. durum* des plantes gynogénétiques chlorophylliennes en quantité exploitable (Shekafandeh, 1998; Sibi & Shekafandeh, 1999; Sibi *et al.*, 2001; Manssouri *et al.*, 2005). Il est à souligner que chez certaines graminées, l'albinisme représente aussi quelquefois un obstacle majeur lors de la

régénération (Marchand *et al.*, 2008) ; ce phénomène, généralement associé à l'androgenèse, semble pouvoir être quelquefois évité par la gynogenèse (Shekafandeh, 1998; Sibi & Shekafandeh, 1999; Sibi *et al.*, 2001; Manssouri *et al.*, 2005; Wiethölter *et al.*, 2008).

Par ailleurs, des facteurs tel le développement de la plante mère, les conditions de culture *in vitro* et la composition des milieux de culture (Collins, 1977) interviennent aussi dans la réussite.

Le but de cette étude consistera donc à mettre en évidence l'importance du génotype et de facteurs physiques ou chimiques, à savoir, d'une part, un prétraitement des épis au froid à 4°C pendant 14 jours, et d'autre part, la nature du milieu de base, sur la réponse androgénétique de quelques variétés de blé tendre *Triticum aestivum* L. (allohexaploïde : $2n = 6x = 42$) et de blé dur *Triticum turgidum* L. subsp *durum* (Desf.) (allotétraploïde : $2n = 4x = 28$).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériel végétal

Cette étude a donc été menée sur trois cultivars de blé tendre *Triticum aestivum* (Aguilal, Amal et Arrehane) et trois cultivars de blé dur *Triticum durum* (Karim, Carioca et Sarif) dont les semences ont été fournies par l'INRA (CRRA de Settat, Maroc).

Semis et conditions de culture de la plante mère

Les semis des plantes mères sont effectués au sein de la faculté des Sciences et Techniques de Settat. Les plantes se développent en conditions naturelles, sans aucun traitement par pesticides ou agents fertilisants.

Stade de prélèvement des épis

La récolte des épis doit avoir lieu lorsque les microspores sont au stade uninucléé, vacuolisé ; la précision de ce stade est un facteur essentiel à la réussite de la culture *in vitro* d'anthères (El Haddoury *et al.*, 1993; Fakiri, 1995).

Le repérage peut en être fait au travers du critère phénotypique que représente la distance entre les deux dernières feuilles au dessous de l'épi, ou encore, par la hauteur de l'épi par rapport la longueur de la gaine qui le contient, critères établis par Picard et De Buyser (1973). Cependant, ces paramètres peuvent changer sensiblement d'un génotype à l'autre et selon la saison; alors, l'observation cytologique s'avère indispensable pour déterminer précisément le stade adéquat de prélèvement des épis. Pour ce faire, les anthères scindées de l'épillet sont écrasées dans une goutte de carmin acétique entre lame et lamelle, puis observées au microscope optique. Cette étude cytologique montre que le stade uninucléé recherché coïncide avec le stade 49 de l'échelle de Zadoks (Soltner, 2005).

Prétraitement des épis, mise en culture des anthères et régénération de plantes

Les talles sont prélevées avec l'épi enfermé dans sa gaine foliaire, puis enroulées dans du papier ; leur tige est ensuite plongée dans de l'eau ; elles sont maintenues au réfrigérateur à 4°C pendant 14 jours à l'obscurité.

Pour la mise en culture des anthères, les épis sont d'abord dégagés de leur gaine et excisés, puis débarrassés de leurs barbes. Ils sont ensuite désinfectés dans la hotte à flux laminaire stérile, par immersion dans l'eau de javel à 20% pendant 10 minutes, et suivie de trois rinçages (3 minutes pour chaque bain) à l'eau distillée stérile. Les glumes et glumelles sont alors éliminées stérilement, et les anthères sont prélevées, puis déposées sur le milieu gélosé stérile, contenu dans les boîtes de Pétri (Ø 100 mm), à raison de 100 anthères par boîte. Les boîtes ensemencées sont scellées avec du film étirable, puis incubées à l'obscurité dans une étuve à 28°C.

Les anthères, enfermées dans les boîtes de Pétri, sont alors contrôlées régulièrement sous la loupe binoculaire. Toute formation sur les anthères, ou en leur sein, est repérée ; les embryons et/ou les cals suffisamment développés sont repiqués en tube, sur le milieu de régénération. Le stockage de ces derniers a lieu dans une salle du laboratoire, à la lumière du jour et à une température $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Les plantules régénérées développent spontanément des racines et n'exigent donc pas de traitement particulier à cet égard.

Milieux de culture

Pour la phase d'induction, trois milieux ont été utilisés :

- milieu MS (Murashige & Skoog, 1962), (1mg/L d'ANA et 0,5mg/L de Kinétine), pH=5,7;
- milieu C17 (Wang & Chen, 1986), (2mg/L de 2,4-D), pH=5,8;
- milieu BPTG (De Buyser & Henry, 1980), (extrait de pomme de terre, 2mg/L de 2,4-D et 0,5mg/L de Kinétine), pH=5,8.

Pour la phase de régénération, le milieu R9 (Picard et De Buyser, 1977) fut utilisé, avec apport d'une modification (1mg/L d'AIA, 1mg/L de Kinétine et 10mg/L de Proline), pH=5,8.

Analyses statistiques et traitement des données

Dans ce travail les paramètres enregistrés comme marqueurs de l'androgenèse sont les suivants :

- Nombre total d'anthères mises en cultures (A);
- Nombre d'anthères réactives (A*), nombre d'embryons produits, nombre total d'anthères callogènes et/ou embryogènes dénombrées pendant 15 jours, à partir des premiers embryons et/ou cals apparus (pour chaque lot de boîtes de même date d'incubation);
- Taux d'induction (T) = nombre d'anthères réactives (callogènes et/ou embryogènes) sur le nombre des anthères mises en culture x 100 ;
- Taux de régénération (R) = nombre total de plantes (P) obtenues (chlorophylliennes et albinos) / nombre d'anthères mises en culture x 100 ;
- Taux d'albinisme (TA) = nombre de plantes albinos (P.Alb) / nombre de plantes totales régénérées.

L'analyse statistique a été faite avec le logiciel SPSS version 17. Dans ce type d'expérimentations, en général, vu les faibles effectifs de réussite (plantes entières régénérées), le test χ^2 est utilisé comme critère de comparaison des données (Sibi & Fakiri,

1994). Cependant, dans cette étude, un test proche, le test G (test du rapport de vraisemblance), a été mis en œuvre car selon Pichon et Gayral (1979) il semble préférable au précédent, tant sur le plan théorique que pour son efficacité (Sokal & Rohlf, 1969). Ce test suit une loi de χ^2 à un degré de liberté v ($v = (r-1)(c-1)$).

Le test G est représenté par la relation suivante :

$$G = 2 \sum E_c \ln (E_c/E_{th}),$$

avec E_c = effectifs constatés
 E_{th} = effectifs théoriques
 r et c étant le nombre de paramètres estimés

La transformation logarithmique permet de corriger les distributions dissymétriques et de réduire ainsi l'influence des valeurs extrêmes (Baccini *et al.*, 2005).

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Dans ce travail, l'observation des « formations » a eu lieu après 26 à 28 jours d'incubation des boîtesensemencées. Pour tous les génotypes, ces formations obtenues sur les différents milieux se répartissent en formations « embryogènes » ou « callogènes » (Figure 1). Seuls les milieux C17 et BPTG ont réussi à les induire. Pour le milieu MS, aucune formation n'a été obtenue sur les anthères, toutefois il est à noter l'existence de cals sur les filets ; ces cals repiqués n'ont régénéré que des racines.

La phase de régénération est marquée par l'obtention des plantules chlorophylliennes et albinos, pour cette phase seul le génotype blé tendre a pu régénérer des plantules (Figure 2).

Les résultats issus des conditions de milieu (MS) ou de traitements (série sans prétraitement au froid) qui n'ont donné aucune réaction n'ont généralement pas été intégrés dans certains traitements des données. Cette situation sera précisée à chaque fois où elle apparaîtra.

Effet du prétraitement au froid

Les résultats obtenus (Tableau 1) montrent que le témoin sans prétraitement thermique présente un taux d'induction nul. Par contre pour la série « 14 jours à 4°C », pour laquelle le taux moyen d'induction est de 0,86%, tous milieux confondus, ces taux diffèrent selon le génotype ; le cultivar Aguilal présente le taux le plus élevé (1,63%) alors que le taux le plus bas est exprimé par le cultivar Karim (0,14%). Les taux d'induction après prétraitement au froid se démarquent donc clairement des valeurs du témoin. Ceci est confirmé par le test G (Tableau 2), la différence d'induction pour le même génotype (témoin et prétraité) est hautement significative ($P < 0,001$) pour Aguilal et pour Amal, très significative ($P < 0,01$) pour Sarif, et significative ($P < 0,05$) pour Arrehane, alors qu'elle est non significative ($P > 0,05$) pour Karim et Carioca.



Photo par Y. EL GOUMI
Aguilal : embryon sur milieu BPTG



Photo par Y. EL GOUMI
Arrehane : embryon sur milieu C17



Photo par Y. EL GOUMI
Aguilal : polyembryons sur milieu BPTG



Photo par Y. EL GOUMI
Aguilal : cal sur milieu BPTG



Photo par Y. EL GOUMI
Amal : embryon sur milieu BPTG



Photo par Y. EL GOUMI
Carioca : embryon sur milieu BPTG



Photo par Y. EL GOUMI
Karim : embryon sur milieu C17



Photo par Y. EL GOUMI
Sanif : embryon sur milieu BPTG

Figure 1. Différentes formations obtenues en phase d'induction.

Suite :											
BPTG	Carioca	Témoin	131	0	0	0	0	0	0	####	
		14 Jours	200	1	0,5	0	0	0	0	####	
	Sarif	Témoin	200	0	0	0	0	0	0	####	
		14 Jours	240	6	2,5	0	0	0	0	####	
	Aguilal	Témoin	227	0	0	0	0	0	0	####	
		14 Jours	242	3	1,24	3	1,24	0	3	100	
	Amal	Témoin	200	0	0	0	0	0	0	####	
		14 Jours	600	15	2,5	3	0,5	2	1	33,3 3	
	Arrehane	Témoin	200	0	0	0	0	0	0	####	
		14 Jours	100	1	1	0	0	0	0	####	
				2618	26	1,73	6	0,4	2	4	66,7 *
	MS	Karim	Témoin	100	0	0	0	0	0	0	0
14 Jours			400	0	0	0	0	0	0	0	
Carioca		Témoin	100	0	0	0	0	0	0	0	
		14 Jours	190	0	0	0	0	0	0	0	
Sarif		Témoin	200	0	0	0	0	0	0	0	
		14 Jours	410	0	0	0	0	0	0	0	
Aguilal		Témoin	100	0	0	0	0	0	0	0	
		14 Jours	120	0	0	0	0	0	0	0	
Amal		Témoin	200	0	0	0	0	0	0	0	
		14 Jours	212	0	0	0	0	0	0	0	
Arrehane		Témoin	100	0	0	0	0	0	0	0	
		14 Jours	494	0	0	0	0	0	0	0	
			2626	0	0	0	0	0	0	0 *	

Codage : * : somme ou valeur moyenne ; A : anthères mises en cultures; A* : anthères réactives; I : taux d'induction en %; P : plantes régénérées totales; R : taux de régénération en %; P.Chl : plantes chlorophylliennes obtenues; P.Alb : plantes albinos obtenues; TA : taux d'albinisme en % ; #### : une division/0 (valeur n'est pas prise en considération).

Ces différences montrent l'intérêt du prétraitement de 14 jours au froid à 4°C pour les cultivars Amal, Aguilal, Sarif et Arrehane ; cet effet bénéfique sur l'induction androgénétique a été déjà observé sur diverses céréales par nombreux auteurs, et, entre autres, par Fakiri (1995), Shekafandeh (1998), mais aussi par Labbani *et al.* (2005), et par Shariatpanahi *et al.* (2006).

Pour la phase de régénération, le milieu MS, n'ayant donné aucun résultat, n'a pas été pris en considération. Tous milieux confondus, les résultats obtenus (Tableau 1) montrent l'effet positif du prétraitement au froid sur le taux de régénération. Le test *G* a une valeur très significative ($P < 0,01$) pour Aguilal, alors que pour les autres cultivars les valeurs restent non

significatives (Tableau 2). Le taux le plus élevé est manifesté par Aguilal (1,14%), tandis qu'Arrehane et Amal présentent des valeurs respectives de 0,29% et 0,27%, et celles de Karim, Carioca et Sarif sont nulles.

Effet du milieu d'induction

Ici encore, les résultats du milieu MS et des conditions témoins n'ont pas été pris en considération puisque aucune réponse n'a été décelée. Tous génotypes confondus, le taux d'induction des embryons et/ou des cals sur le milieu BPTG présente une valeur moyenne élevée (1,73%) par rapport à celle du milieu C17 (1,03%), comme pour les travaux d'El Haddoury *et al.* (1993). Sur milieu C17 le taux le plus élevé apparaît pour Aguilal (2,79%), et le plus bas pour Amal (0,33%). Sur milieu BPTG la valeur la plus forte est obtenue pour Sarif et Amal (2,50%) et la plus faible pour Carioca (0,5%), le cultivar Karim ayant une valeur nulle (0%) (Tableau 1).

Le test *G* permet de déceler, pour Amal, des différences très significatives ($P < 0,01$) de la réponse d'induction embryogène et/ou callogène, ce qui met en évidence l'effet du milieu sur ces critères. Cet effet n'a pas été mis en évidence pour les autres cultivars (Tableau 2).

Tous génotypes confondus, et seul le prétraitement de 14 jours pris en considération, les milieux d'induction montrent des taux de régénération proches, soit, 0,39% pour C17 et 0,40% pour BPTG (Tableau 1). Le test *G* non significatif ($P > 0,05$) confirme l'absence de différence d'effet de ces milieux sur le taux de régénération. En effet, le milieu d'induction n'a pas d'effet visible sur le nombre des plantules régénérées, mais présente un effet sur la qualité des plantules régénérées. On souligne que les embryons provenant du milieu C17 régénèrent plus de plantules chlorophylliennes que ceux provenant du milieu BPTG. Cet effet est détaillé dans le paragraphe albinisme.

Effet du génotype

L'effet génotypique testé vis-à-vis de l'induction lors du prétraitement, le témoin n'étant pas pris en considération, montre un test *G* hautement significatif ($P < 0,01$) confirmant, comme pour El Haddoury *et al.* (2000), que la réponse sur l'induction diffère selon le génotype.

Seuls les cultivars de blé tendre ont régénéré des plantules et l'effet génotypique est nettement marqué (Labani *et al.*, 2005) sur le milieu C17, pour lequel le test *G* est très significatif ($P < 0,01$) (Tableau 2), avec un taux de régénération maximal pour le cultivar Arrehane (2%) et minimal pour le cultivar Aguilal (1,59%). Le génotype est donc un facteur capital pour l'induction des embryons et la régénération de plantes chlorophylliennes (Chlyah *et al.*, 2001; Cherkaoui *et al.*, 2001).

Albinisme

En général, les cellules des plantes régénérées albinos (par exemple pour le blé, l'orge ou le riz) contiennent des plastides auxquels il manque certaines des séquences de leur génome (Day & Ellis, 1985; Zubko & Day, 2002). L'albinisme peut donc être le résultat d'une altération ou suppression de séquences de l'ADNcp de la microspore à l'origine de la plante (Dunford & Walden, 1991).

TABLEAU 2
Analyse Statistique des Différents Facteurs Étudiés

Effet	Paramètres	Phase d'induction			Phase de régénération			Albinisme		
		G	ddl	valeur p	G	ddl	valeur p	G	ddl	valeur p
#g/p	14jours	17,023	5	0,004 **	22,763	5	0,0004 ***	2,921	5	0,712 ns
#p/g	Karim	1,140	1	0,286 ns	----	----	----	----	----	----
	Carioca	2,639	1	0,104 ns	----	----	----	----	----	----
	Sarif	8,278	1	0,004 **	----	----	----	----	----	----
	Aguilal	14,590	1	0,0001 ***	10,195	1	0,001 **	0,000	1	1 ns
	Amal	20,454	1	0,0000 ***	3,818	1	0,051 ns	0,000	1	1 ns
	Arrehane	4,109	1	0,043 *	2,738	1	0,098 ns	0,000	1	1 ns
#g/Mil	C17	9,321	5	0,097 ns	17,979	5	0,003 **	0,908	5	0,970 ns
	BPTG	10,088	5	0,073 ns	8,194	5	0,146 ns	3,819	5	0,576 ns
#Mil/g	Karim	0,961	1	0,327 ns	----	----	----	----	----	----
	Carioca	0,132	1	0,716 ns	----	----	----	----	----	----
	Sarif	3,130	1	0,077 ns	----	----	----	----	----	----
	Aguilal	1,533	1	0,216 ns	0,111	1	0,739 ns	5,062	1	0,024 *
	Amal	6,975	1	0,008 **	2,438	1	0,118 ns	0,000	1	1 ns
	Arrehane	0,345	1	0,557 ns	2,793	1	0,095 ns	0,000	1	1 ns

#g/p : différents génotypes pour chaque prétraitement; #p/g : différents prétraitements pour chaque génotype;

#g/Mil : différents génotypes pour chaque milieu; #Mil/g : différents milieux pour chaque génotype ;

ddl= degré de liberté; ns= non significatif ; *= significatif (au seuil 5%) ; **= significatif (au seuil 1%) et ***= significatif (au seuil 1%).

NB : ici seul #g/p pour le prétraitement au froid de 14 jours est présenté, le contrôle sans prétraitement n'apparaît pas car inefficace.

Tous génotypes et milieux confondus, les résultats montrent un taux d'albinisme élevé 41,67% (Tableau 1). Le génotype Aguilal révèle le taux le plus élevé (57,14%), suivi par Amal (33,33%) tandis que Arrehane ne présente pas de plantes albinos. Dans cette étude, le test G est non significatif ($P>0,05$) (Tableau 2) quant à l'effet du prétraitement au froid sur l'ensemble des génotypes. Ici encore, le témoin (sans prétraitement au froid) n'a pas été pris en considération. Quant à l'effet du génotype relativement à chaque milieu de culture, le Tableau 1 montre un taux d'albinisme élevé, pour le cultivar Aguilal (100%) avec le milieu BPTG, et le taux plus bas pour le cultivar Arrehane (0%) avec le milieu C17. Le test G est non significatif ($P>0,05$) pour les deux milieux C17 et BPTG (Tableau 2). Seul le cultivar Aguilal montre un effet marquant du milieu, avec un test G significatif ($P<0,05$) (Tableau 2). Tous génotypes confondus, le milieu BPTG montre un taux d'albinisme élevé (66,67%) par rapport à celui du milieu C17 (16,67%) (Tableau 1). Il y a donc davantage de plantes albinos régénérées à partir des embryons induits sur le milieu BPTG, et le maximum de plantes chlorophylliennes dérive des embryons induits sur le milieu C17 et cette conclusion coïncide avec celle de El Haddoury *et al.* (1993).

CONCLUSION

Les résultats de ces expérimentations proviennent de la mise en culture de près de 8708 anthères, tous génotypes confondus. Plus de la moitié de cet effectif a subi un prétraitement de 14 jours à 4°C, dont 2419 anthères de blé tendre, et 2463 anthères de blé dur. Quel que soit le génotype, le prétraitement au froid de 14 jours à 4°C exprime son impact positif, sur la culture *in vitro* d'anthères, aux différentes étapes. Ainsi, seules les anthères venant des épis prétraités montrent une induction embryogène et/ou callogène, mais aussi, on constate un effet sur le taux de régénération avec une valeur de test G très significative ($P<0,01$) pour le cultivar Aguilal ($P=0,001$).

On souligne ici que seuls les embryons des génotypes de blé tendre ont régénéré des plantes (Figure 2) qui sont, soit chlorophylliennes, soit albinos. Chez le blé, l'albinisme présente un obstacle important dans la culture *in vitro* d'anthères. Le taux d'albinisme obtenu pour les différents génotypes a été très variable et le cultivar Aguilal en présente un taux élevé (57,14%).

Par ailleurs, seuls les milieux d'induction C17 et BPTG ont pu initier des embryons et/ou des cals. En effet, tous génotypes confondus, le milieu BPTG a donné plus d'embryons et/ou de cals (26 unités) que le milieu C17 (16 unités), correspondant à 13 unités pour le blé dur et 29 pour le blé tendre. L'effectif de plantes chlorophylliennes (sept plantes) est faible et ne provient que des cultivars de blé tendre. En fait, on constate ici que malgré le développement d'embryons, contrairement au blé tendre, le blé dur s'est montré récalcitrant quant à la régénération de plantes.

L'effet « génotype » reste donc un facteur primordial de la réussite de l'androgenèse, de même que le milieu d'induction. Pour Arrehane, seuls les embryons induits sur le milieu C17 ont donné des plantes (deux unités chlorophylliennes). Pour Amal, seuls les embryons induits sur le milieu BPTG se sont développés en plantes (deux chlorophylliennes et une albinos). Tandis que pour Aguilal, les embryons induits sur le milieu C17 ont régénéré trois plantes chlorophylliennes et une albinos, alors que les embryons induits sur le milieu BPTG n'ont donné que des plantes albinos (trois plantes). Malgré le faible taux de réussite, pour ces génotypes, les réponses permettent d'en obtenir des haploïdes, mais cette réussite

reste propre à chacune des situations de culture des plantes-mères, des laboratoires. De nouvelles recherches devraient être mises en place, faisant appel à des techniques de biologie moléculaire, et des améliorations apportées aux différentes étapes, afin de comprendre les obstacles de cette technique d'haplodiploïdisation.

On souligne ici, que l'obtention des plantes chlorophylliennes par androgenèse dans cette étude reste un travail complètement original. Des travaux en cours dans ce laboratoire viseront l'application progressive d'un stress salin sur des embryons issus d'androgenèse afin d'obtenir de nouvelles variétés tolérantes à la salinité.

Chez le blé, la gynogenèse, de même que les croisements interspécifiques et intergénériques (blé x maïs) (Fakiri, 1995; Picard et De Buyser, 1977) ouvriront aussi d'autres voies permettant de compléter la réponse androgénétique et permettant la production d'un grand nombre de plantes chlorophylliennes, relativement à des génotypes diversifiés.

RÉFÉRENCES

- Aïssa, K. 1977. *Obtention de plantes haploïdes chez Triticum durum par voie androgénétique in vitro*. Thèse de 3ème cycle, univ. Paris-Sud, 91405 Orsay, 132 p.
- Amara, S.H., Benzaghrou, S. et Lepoivre, P. 1999. Capacité androgénétique des variétés tunisiennes de blé dur. *Cahiers Agricultures*, 8(4): 334-338.
- Baccini, A., Besse, P., Déjean, S., Martin, P.G.P., Robert-Granié, C., et San Cristobal, M. 2005. Stratégies pour l'analyse statistique de données transcriptomiques. *Journal de la Société Française de Statistique*, 146: 5-44.
- Cherkaoui, S., Lamsaouri, O., Chlyah, B. et Chlyah, H. 2001. Amélioration de la régénération chlorophyllienne chez le blé dur : utilisation de la culture d'anthers après croisements interspécifiques. In : Hamon Serge (éd.). *Des modèles biologiques à l'amélioration des plantes*. Paris (FRA), IRD, AUF, Montréal, P. 289-303.
- Chlyah, H., Cherkaoui, S., Saidi, N., Lamsaouri, O., Mdarhi-Alaoui, M., Chlyah, O., Benkirane, H., Amail, O. et Chlyah, A.B. 2001. Production d'haploïdes chez le blé dur et sélection en milieu salin. In : Hamon Serge (éd.). *Des modèles biologiques à l'amélioration des plantes*. Paris (FRA), IRD, AUF, Montréal, P. 235-254.
- Chlyah, O., Amail, O., Saidi, N., Cherkaoui, S., Lamsaouri, O., Chlyah, A.B. et Chlyah, H. 1999. Haplodiploïdisation chez le blé dur par croisement intergénériques : blé dur x *Hordeum bulbosum* et blé x maïs. *Cahiers agricultures*, 8: 330-333.
- Collins, G.B. 1977. Production and utilization of anther-derived haploids in crop plants. *Crop Sci.*, 17:583-586.
- Dagüstü, N. 2008. Diallel analysis of anther culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 7(19): 3419-3423.
- Day, A. and Ellis, T.H.N. 1985. Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. *Curr. Genet.*, 9 : 671-678.
- De Buyser, J. and Henry, Y. 1980. Induction of haploid and diploid plants through *in vitro* anther culture of haploid wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 57: 57-58.
- Demarly, Y. et Sibi, M. 1996. *Amélioration des plantes et biotechnologies*. AUPELF-UREF, éds., collection Universités Francophones, Rome, London, Paris, John Libbey Eurotext, 2^{ème} édition, 151 p.
- Demarly, Y. 1977. *Génétique et amélioration des plantes*. Éds. Masson, Paris, 287 p.
- Dunford, R. and Walden, R.M. 1991. Plastid genome structure and plastid-related transcript levels in albino barley plants derived from anther culture. *Curr. Genet.*, 20: 339-347.

- El Haddoury, J., Amri, A., Baidani, A., Chlyah, H. et Nsarellah, N. 2000. Étude de la réponse à l'androgenèse *in vitro* des lignées de substitution disomique chez le blé dur. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences*, 323: 251-255.
- El Haddoury, J., Chlyah, H. et Picard, E. 1993. Étude de l'effet de quelques facteurs génotypiques et environnementaux de l'androgenèse *in vitro* chez des variétés de blé tendre adaptées au Maroc. In : *Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes?* AUPELF-UREF éd., J. Libbey Eurotext, Paris, p. 221-232.
- Fakiri, M. 1995. *Obtention chez l'orge (Hordeum vulgare) de régénération par androgenèse et gynogenèse in vitro en condition de stress salin. Application à trois génotypes marocains*. Thèse de Doctorat de INPL Sciences agronomiques, av. de la Forêt de Haye, 54505 Vandœuvre, 132 p.
- Foroughi-Wehr, B., Friedt, W. and Wenzel, G. 1982. On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 62: 233-239.
- Ghaemi, A., Sarrafi, A. et Alibert, G. 1993. Influence of genotype and culture conditions on the production of embryos from anthers of tetraploid wheat (*Triticum turgidum*). *Euphytica*, 65: 81-85.
- Guha, S. and Maheshwari, S.C. 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204: 497.
- Hassawi, D.S. 2004. Evaluation of Jordanian wheat and barley genotypes for anther culture response. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 2(1): 193-197.
- Labhani, Z., Richard, N., De Buyser, J. et Picard, E. 2005. Plantes chlorophylliennes de blé dur obtenues par culture de microspores isolées : importance des prétraitements. *C.R. Biologies*, 328: 713-723.
- Larsen, E.T., Tuveesson, I.K.D. and Andersen, S.B. 1991. Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Theoretical and Applied Genetics*, 82: 417-420.
- Lashermes, P., Engin, G. and Ortiz-Ferrara, G. 1991. Anther culture of wheat (*Triticum aestivum*) adapted to dry areas of West Asia and North Africa. *J. Genet. & Breed.*, 45: 33-38.
- Mansouri, S., Kobaissi, A., Nziengui, H., Fakiri, M., Shekafandeh, A. et Sibi, M. 2005. Gynogenèse *in vitro* chez quelques variétés de blé dur du Maghreb et du Moyen Orient (*Triticum durum* L.) pour l'obtention de régénérants chlorophylliens, en conditions de stress salins. *Geo-Eco-Trop*, 29: 77-88.
- Marchand, S., Fonquerne, G., Clermont, I., Laroche, L., Huynh, T.T. and Belzile, J.F. 2008. Androgenic response of barley accessions and F1s with Fusarium head blight resistance. *Plant Cell Rep.*, 27: 443-451.
- Marciniak, K., Kaczmarek, Z., Adamski, T. and Surma, M. 2003. The anther-culture response of triticale line x tester progenies. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 8: 343-351.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Ouyang, J.W., Hu, H., Chuang, C.C. and Tseng, C.C. 1973. Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. *Sci. Sinica*, 16: 79-95.
- Picard, E., De Buyser, J. 1973. Obtention de plantules haploïdes de *Triticum aestivum* L. à partir de cultures d'anthers *in vitro*. Paris, *C.R. Acad. Sci.*, 277 D: 1463-1466.
- Picard, E. and De Buyser, J. 1977. High production of embryos in anther culture of pollen derived homozygous spring wheats. *Ann. Amél. Plantes*, 27: 483-488.
- Picard, E., Crambes, E. et Mihamou-Ziyyat, A. 1994. L'haplodiploïdisation un outil multi-usage pour la génétique et l'amélioration des céréales. In : *Quel avenir pour*

- l'amélioration des plantes?* AUPELF-UREF, ed., John Libbey Eurotext, Paris, p. 355-369.
- Pichon, G. et Gayral, P. 1979. Comparaison nomocénologique de deux méthodes de piégeage des moustiques. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. Méd. et Parasitol.*, XVII(4): 243-247.
- Serghini, M.A. 2006. Apport des biotechnologies végétales. *Congrès International de Biochimie*, Agadir, Maroc, 09-12 Mai, p. 42-44.
- Shariatpanahi, M.E., Bal, U., Heberle-Bors, E. and Touraev, A. 2006. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127: 519-534.
- Shekafandeh, A. 1998. *Régénération par gynogenèse in vitro chez le blé dur (Triticum durum) et l'orge (Hordeum vulgare); obtention de plantes selon diverses modalités d'applications de stress salins*. Thèse de Doctorat de INPL Sciences agronomiques, av. de la Forêt de Haye, 54505 Vandœuvre, 155p.
- Sibi, M. et Fakiri, M. 1994. Gynogenèse chez des génotypes marocains d'orge (*Hordeum vulgare*). In : *Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?* AUPELF-UREF éd., John Libbey Eurotext, Paris: 337-344.
- Sibi, M. et Fakiri, M. 2000. Androgenèse et gynogenèse, source de vitrovariation et tolérance à la salinité chez l'orge *Hordeum vulgare* ? *Sécheresse*, 11 (2): 125-32.
- Sibi, M. et Shekafandeh, A. 1999. Gynogenèse *in vitro* du blé dur (*Triticum durum*) dans le cadre d'une création de tolérance à l'aridité: souches régénérant des plantes vertes. *C.R. 6èmes journées scientifiques du réseau biotechnologies -Génie génétique des plantes- "Biotechnologies, amélioration des plantes et sécurité alimentaire"*, Orsay, p. 556-557.
- Sibi, M.L., Kobaissi, A. and Shekafandeh, A. 2001. Chlorophyllian haploid plants and regenerating strains by *in vitro* ovaries culture in tetraploid wheat (*Triticum durum* Defs). *Euphytica*, 122: 351-359.
- Ślusarkiewicz-jarzina, A. and Ponitka, A. 2007. The effect of physical medium state on anther culture response in polish cultivated oat (*Avena sativa* L.). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, Poland*, 49(2): 27-31.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. 1969. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. San Francisco, W.H. Freeman and co., 776 p.
- Soltner, D. 2005. *Les grandes productions végétales*. Bressuire : Collection Sciences et Techniques Agricoles, 20ème Édition, 472p.
- Talebi, R., Rahemi, M.R., Arefi, M.N. and Bagheri, N. 2007. *In vitro* plant regeneration through anther culture of some Iranian local rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10 (12): 2056-2060.
- Tanhuanpää, P., Kalendar, R., Schulman, H.A. and Kiviharju, E. 2008. The firsts doubled haploid linkage map for cultivated oat Genome. *Pub INC Research Press*, 51: 560-569.
- Wang, P., and Chen, Y.R. 1986. A study on the application of C17 medium for anther culture. *Acta Bot. Sin.*, 28: 38-45.
- Wiethölter, P., Fernandes, M.I.B de M., Brammer, S.P., Minella, E. and Iorczeski, E.J. 2008. Genotypic differences in proembryoid development and green plantlets regeneration through androgenesis in barley varieties. *Ciência Rural, Santa Maria*, 38(1): 240-242.
- Zubko, M.K. and Day, A. 2002. Differential regulation of NEP transcribed genes, and DNA amplification within ribosomedeficient plastids in stable phenocopies of cereal albino mutants. *Mol. Gen. Genomics*, 267: 27-37.