

Effet de quelques facteurs physico-chimiques sur la gynogenèse *in vitro* de trois variétés de Blé dur

[Effect of some physico-chemical factors on *in vitro* gynogenesis of three varieties of durum wheat]

Sonia Mansouri¹, Leila Radhouane¹, Hugues Nzeingui², and Sadok Bouzid³

¹Institut National de la Recherche Agronomique de Tunis, Ariana 2049, Tunisia

²ENSAIA/INPL, 54505, France

³Faculté des Sciences de Tunis, Campus Universitaire, 1060, Tunisia

Copyright © 2015 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: Use of doubled haploïdes allows to shorten considerably the cycle of classic selection and to obtain quickly a stable homozygotie. However, regeneration of albino plants, particularly for cereal, constitutes the major problem of this approach. Obtaining haplodiploïdes by *in vitro* culture of not fertilized ovaries is determined by numerous factors biological as physical or chemical. Our work concerned the optimization of the answer gynogenetique of three varieties of durum wheat (Cocorit, Isly, Jori) cultivated on two different media (M₁ et M₂) and subjected to a cold pre-treatment at 4 ° C for 7, 11 and 15 days. This work has demonstrated that genotypes interact strongly with pre-treatment duration and with induction medium composition. Thus, a beneficial effect of thermal pre-treatment was noted on the induction of embryos and production of callus, and also on the quality of regenerating. For the regeneration of green plants, the response of genotypes varied with the induction medium composition and with cold pre-treatment period. Indeed, M₁ medium was favourable for Cocorit and Jori varieties but with different incubation duration. For cons, M₂ medium gave better results with Isly genotype for 7 days incubation.

KEYWORDS: Breeding, *Triticum durum*, Doubled haploid plant production, Callus, Tunisia.

RESUME: L'utilisation des lignées haploïdes doublées permet de raccourcir considérablement le cycle de sélection classique et d'obtenir rapidement une homozygotie stable. Toutefois, la régénération de plantes albinos, particulièrement chez les céréales, constitue le problème majeur de cette approche. La technique d'obtention des haplodiploïdes par une culture *in vitro* d'ovaires non fécondés est déterminée par de nombreux facteurs aussi bien biologiques que physiques ou chimiques. Notre travail a porté sur l'optimisation de la réponse gynogénétique de trois variétés de blé dur (Cocorit, Isly, Jori) cultivées sur deux milieux différents (M₁ et M₂) et soumises à un prétraitement au froid à 4°C pendant 7, 11 et 15 jours. Ce travail a permis de montrer que les génotypes interagissent fortement avec la durée de prétraitement et avec la composition du milieu d'induction. Ainsi, un effet bénéfique du prétraitement thermique a été noté sur l'induction d'embryons et la production de cals, et aussi, sur la qualité des régénérants. Pour la régénération de plantes chlorophylliennes, la réponse des génotypes a varié avec la composition du milieu d'induction et la durée de prétraitement au froid. En effet, le milieu M₁ a été favorable aux variétés Cocorit et Jori mais avec des durées d'incubation différentes. Par contre, le milieu M₂ a donné de meilleurs résultats avec le génotype Isly pour une durée de 7 jours.

MOTS-CLEFS: Amélioration génétique, Blé dur, Haplodiploidisation, Cal, Tunisie.

1 INTRODUCTION

En Tunisie, le secteur céréalier est un secteur stratégique. En effet, la superficie emblavée annuellement se situe en moyenne autour de 1,45 Million d'ha [1] dont 697.000 ha en blé dur [2]. De plus, la consommation moyenne du tunisien en céréales est parmi les plus élevées au monde (181kg/personne/an) dont 51% de blé dur. L'importance que revêt ce secteur et le fossé important qui existe entre la production et la consommation fait que de nombreuses recherches pour la création et l'amélioration de nouveaux génotypes sont entamées et ont abouti à l'enregistrement de plus de 50 variétés [3]. Toutefois, le rendement de ces variétés demeure relativement faible et irréguliers [4] car les régions cérésières sont particulièrement sises dans des zones arides et semi-arides et sont soumises à de fréquentes sécheresses suite à une mauvaise distribution des précipitations [5].

Face à ces conditions contraignantes, il est impératif de faire appel à des variétés adaptées à de telles situations. La réalisation de tels objectifs ne peut se faire que via deux voies: soit par la prospection et la collecte de génotypes locaux adaptés aux différents stress, soit par des programmes génétiques qui assurent l'amélioration et l'incorporation de nouveaux caractères génétiques. Or, les programmes génétiques basés sur des méthodes classiques sont longs et onéreux ([6], [7]); alors que nouvelles voies biotechnologiques, telle les techniques d'haplodiploïdisation, permettent un gain de temps appréciable puisque les lignées pures sont ainsi fixées en une seule génération [8]. Cette méthode rapide qui permet l'obtention, sans fécondation, de plantes haploïdes à partir de gamétophytes mâles ou femelles permet d'observer l'expression aussi bien des gènes récessifs que des gènes dominants chez ces haploïdes doublés ce qui est particulièrement intéressant en sélection pour la création de nouvelles variétés. En effet, l'avantage principal de l'haplodiploïdisation réside dans la fixation des différentes recombinaisons possibles entre les caractéristiques des lignées parentales et aussi dans la production de lignées homozygotes parfaites stables et durables en une génération et ceci en éliminant les nombreux cycles de sélection nécessaires au cours d'un programme d'amélioration conventionnelle [9].

Bien que ces techniques d'haplodiploïdisation aient largement évoluées au cours de ces dernières années et aient donné des résultats fiables chez certaines espèces céréésières tel que le blé tendre ([10], [11], [12], [13]) et l'orge ([14], [15], [16], [17]), le blé dur est resté, en revanche, une espèce récalcitrante à l'androgenèse *in vitro*[18] . En effet, cette céréale présente une faible production d'embryons, une régénération difficile et très faible en plantes chlorophylliennes [19] ainsi qu'un taux de production élevé de plantes albinos ([20],[21]).

Pour parer à ces difficultés et assurer la production de lignées haploïdes doublées chez une espèce aussi importante que le blé dur, la gynogenèse a été proposée comme la technique d'haploïdisation la plus efficace car elle permet d'étendre l'obtention d'haploïdes à un plus grand nombre de génotypes [22], [23],[24],[25]). Cependant, la régénération d'un nombre important d'haploïdes doublés chlorophylliens chez cette espèce nécessite la maîtrise de nombreux facteurs notamment, le génotype [26] les conditions de développement de la plante mère [27], la durée du prétraitement au froid des épis [28], le stade cytologique des microspores au moment du prélèvement des épis [29], ainsi que la composition des milieux de culture [30].

Dans le but de répondre à certaines de ces questions et aussi de participer à l'optimisation de ces paramètres, nous avons entamé une série de recherches physico-chimiques concernant l'effet de plusieurs durées de prétraitement au froid et l'effet de la composition du milieu d'induction en relation avec la variabilité génétique du matériel végétal utilisé. A cet effet, trois variétés de blé dur, deux milieux de culture et différents traitements physiques ont été testés afin d'améliorer significativement l'obtention de plantes gynogénétiques vertes.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL

Cette étude a été menée sur trois variétés de blé dur (*Triticum durum*) adaptées au climat méditerranéen : Cocorit (sélectionné par le Cimmyt en 1971), Isly (INRA Maroc, 1988) et Jory (INRA Maroc, 1982). Ces dernières sont choisies pour leur très courte durée de vernalisation (moins d'une quinzaine de jours).

2.2 TECHNIQUES ET CONDITIONS DE CULTURE DE LA PLANTE MERE

Les grains sont désinfectés et vernalisés pendant une à deux semaine à 4°C et à l'obscurité. A leur sortie, ils sont mis à germer à la température ambiante du laboratoire et à l'obscurité. Lorsque leur coléoptile atteint 3 à 4 cm de long, les plantules obtenues sont individuellement mises en pot dans un mélange de terreau/terre franche (1v/1v) et placées dans un

phytotron où règnent une photopériode de 12h et une température alternative de 14°C le jour et 9°C la nuit. Ces plantules sont arrosées une fois par semaine avec une solution nutritive SN₁ (Tableau 1).

Au stade trois talles, les plantes sont transplantées dans des pots de 15 cm de diamètre et placées de nouveau dans le phytotron où elles sont arrosées une fois par semaine avec une solution SN₂ (Tableau 1).

Pour obtenir des épis pouvant être utilisés pour le prélèvement des ovaires, les plantes sont placées, au stade montaison, dans des conditions contrôlées: photopériode 16h et température 25°C le jour et 18°C la nuit. Au bout de sept à neuf semaines de séjour dans ces dernières conditions, les plantes donnent des ovaires fertiles.

2.3 STADE DE PRELEVEMENT DES EPIS

Les épis sont récoltés en fonction des stades de leurs microspores. Ainsi, avant que la fécondation n'ait lieu et lorsque, la majorité des microspores sont au stade binucléé, les prélèvements des talles portant les épis destinés à la culture d'ovaires sont faits. Cette étape ne peut être réalisée que si des observations microscopiques sont réalisées sur des anthères prélevées de la partie médiane des épis et écrasées dans une goutte de carmin acétique entre lame et lamelle puis observées au microscope optique. Ce stade est repéré sur la base de critères morphologiques qui correspondent au stade cytologique recherché [31].

Les talles ont subi par la suite trois prétraitements (P₁, P₂, P₃) afin de sélectionner le plus approprié permettant de changer le développement gamétophytique en développement sporophytique. Elles sont ensuite mises dans des bocaux contenant de l'eau et placées dans un réfrigérateur à l'obscurité.

- P₁: prétraitement au froid à 4°C pendant 7 jours
- P₂: prétraitement au froid à 4°C pendant 11 jours
- P₃: prétraitement au froid à 4°C pendant 15 jours

2.4 MISE EN CULTURE DES OVAIRES NON FECONDES

Les épis ainsi prétraités sont dégagés de leur gaine, débarrassés de leurs barbes, puis désinfectés sous la hotte à flux laminaire stérile et réservés dans une boîte de Pétri avant le prélèvement des ovaires. Les glumes et les glumelles sont aussi supprimées. Les ovaires sont ensuite déposés à raison de 18 unités par boîte de Pétri contenant le milieu d'induction. Les boîtes de Pétri sont incubées à l'obscurité dans la chambre de culture régulée à 25±1°C le jour et 20±1°C la nuit avec une photopériode de 16 h. Les ovaires prétraités au froid sont déposés sur deux milieux d'induction différents M₁ et M₂ (tableau 2). Ces milieux d'initiation sont supposés activer la formation de cals à partir des cellules haploïdes du sac [32]. La régénération des plantes est obtenue après transfert sur trois milieux de cultures successifs:

- M₃: milieu de différenciation qui permet l'initiation des bourgeons à partir des cals
- M₄: milieu de développement, à partir duquel les bourgeons se développent en plante
- M₅: milieu d'enracinement qui favorise la formation de racines et le développement de vitroplants après mise en tubes.

Les milieux M₃ et M₄ ont la même base que le milieu M₁ mais sont dépourvus de substances de croissances. Pour le milieu M₅, la base est diluée de moitié.

A la suite du premier repiquage sur le milieu d'enracinement, la séparation des pseudo-talles est effectuée régulièrement. Ces pseudo-talles sont fragmentées dans leur partie basale où se trouve l'amas des cellules qui est à l'origine de la formation des bourgeons. Elles sont ensuite repiquées dans des tubes contenant le milieu M₅. Lors des différents cycles de repiquages, des pseudo-talles ont été sorties du milieu d'enracinement et sont ensuite transférées dans des pots contenant un mélange terreau/sable. Les vitroplants sont placés et entretenus en phytotron dans les mêmes conditions que celles appliquées aux plantes-mères. Au stade 2-3 talles, le traitement à la colchicine est effectué pour doubler le stock chromosomique des vitroplants. Ils sont à nouveau transférés dans un substrat terreau/sable. A la sortie des barbes, les épis sont protégés sous sachet en cellophane pour assurer l'autofécondation et obtenir par conséquent leurs descendances. Les paramètres mesurés sont:

- La capacité d'induction de cals
- Le nombre d'ovaires réactifs (callogènes et/ou embryogènes)
- Le taux d'induction = (le nombre d'ovaires gonflés / le nombre total d'ovaires cultivés) * 100
- Le nombre total de plantes obtenues

- Le taux de régénération = (Le nombre total de plantes haploïdes doublées obtenues / Le nombre total d'ovaires mis en culture) * 100
- Le rendement théorique = (Le nombre total d'haploïdes doublées obtenues / Le nombre total d'ovaires réactifs) * 100
- Le taux d'albinisme = (Le nombre de plante albinos / Le nombre d'ovaires mis en culture) * 100

Tableau 1 : Composition des solutions nutritives utilisées

	Macroéléments	Dose (g/L)		Macroéléments	Dose (g/L)
Solution Nutritive 1	MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,300	Solution Nutritive 2	Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	1,180
	Ca (NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	0,650		KH ₂ PO ₄	0,130
	KNO ₃	0,400		MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,490
	NH ₄ H ₂ PO ₄	0,130		KNO ₃	0,500
	FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,050		Micro-éléments	Dose (mg/L)
	Micro-éléments	Dose (mg/L)		MnSO ₄ . 4H ₂ O	1,530
	KI	0,050		ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,220
	H ₃ BO ₃	0,400		CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,079
	MnSO ₄ . 4H ₂ O	1,500		H ₃ BO ₃	0,286
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,600		Na ₂ MoO ₄ . H ₂ O	0,025
	Na ₂ MoO ₄ . H ₂ O	0,015			
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,001		Fe-EDTA	36,700
	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,001		Ca (NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	1,180

3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de quelques facteurs physiques et chimiques susceptibles d'influencer la capacité des ovaires non fécondés de trois variétés de blé dur à générer des plantes haplodiploïdes chlorophylliennes.

3.1 CAPACITÉ D'INDUCTION DES CALS

Après 4 à 6 semaines d'incubation, 512 ovaires réactifs ont donné des cals en quantité et en qualité variable à partir d'un total de 3011 ovaires mis à incuber sur les deux milieux d'induction soit un taux de réussite de 17%. Un taux d'induction similaire a été obtenu par [33] sur des variétés de blé dur algériennes.

Il est à noter que les cals régénérés peuvent être embryogènes (figure 1b) ou amorphes, à aspect translucide, qui ne donnent aucune régénération. Ces résultats sont corroborés par ([34], [35]).

A la suite du repiquage sur le milieu de différenciation, les cals embryogènes présentent des bourgeons qui se développent en ébauches foliaires (figure 1c).

3.2 EFFET DU PRETRAITEMENT SUR L'INDUCTION ET LA DIFFERENCIATION DES OVAIRES NON FECONDES

Pour la formation de cals, les réponses gynogénétiques des trois variétés étudiées ont montré des différences significatives en fonction de la durée du prétraitement à 4°C et de la composition du milieu d'induction.

L'effet du prétraitement au froid et du milieu de culture sur les capacités d'induction et de différenciation relatives aux trois génotypes sont résumés dans les tableaux 3, 4 et 5.

L'analyse statistique a montré que l'impact de la durée du prétraitement au froid sur le taux d'induction de cals dépend de la variété de blé dur. Ainsi, une courte durée (7 j) est suffisante pour la variété Isly, alors qu'un séjour de 11 jours au froid assure une meilleure réponse gynogénétique pour les deux génotypes Cocorit et Jori. Un tel résultat a été signalé par ([36], [37]). Toutefois, il faut signaler que la durée de prétraitement favorable à une induction n'est pas obligatoirement celle nécessaire à une régénération. En effet, Cocorit présente un taux de régénération maximal soit 15,4% en plantes chlorophylliennes avec 15 jours de prétraitement, alors que le taux d'induction est maximal soit 16,6% avec 11 jours. Pour la variété Jori, la réponse maximale à une induction (27,2%) conduisant à un fort taux de régénération d'haplodiploïdes vertes (19,4%) correspond à un prétraitement au froid de 11 jours (tableau 3).

Les résultats révèlent une différence significative entre les trois prétraitements au froid pour les trois variétés étudiées. En ce qui concerne la variété Cocorit, le prolongement de la durée de 7 à 15 jours améliore la capacité de régénérer des

plantes chlorophylliennes. Le meilleur taux de régénération des plantes vertes a été observé avec un prétraitement au froid de 15 jours. En revanche, le prolongement de durée d'exposition des épis au froid affecte négativement la régénération des plantes.

3.3 EFFET DU MILIEU DE CULTURE SUR L'INDUCTION ET LA DIFFERENCIATION DES OVAIRES NON FECONDES

La réactivité des ovaires fécondés des trois variétés a été évaluée sous l'effet de deux milieux de culture. Les résultats de cette analyse sont représentés dans les tableaux 3, 4 et 5.

Les taux de régénération des différents génotypes présentés en fonction des milieux M_1 et M_2 montrent qu'ils sont en relation avec le génotype pour un milieu donné. Cet effet a été mis en évidence par plusieurs auteurs ([38], [39], [40]). Il semble que le génotype est un facteur capital pour l'induction des embryons et la régénération de plantes chlorophylliennes ([41], [42]). En effet, Cocorit et Jori expriment un effet variétal pour les mises en culture sur le milieu M_1 avec la régénération respective de 15,4 et 19,4% de plantes; contre 0,7 et 2,3% sur milieu M_2 .

La variété Isly interagit fortement avec le prétraitement P_1 et le milieu d'induction M_2 pour donner un taux important de régénération des plantes chlorophylliennes de 22,5% . Par contre, le milieu M_1 combiné au prétraitement P_3 donne 14,1% d'ovaires réactifs pour la variété Cocorit où chacun d'eux génère une plante ou plus. En effet, le taux de régénération est de 15,4%. Quant au rendement théorique, c'est-à-dire le nombre de plantes vertes obtenues par ovaire réactif, il est de 109%.

Pour Isly et Cocorit, il s'avère que le milieu a un effet plus déterminant que le prétraitement au froid sur la réponse de la culture *in vitro* des ovaires non fécondés ([43], [44]).

L'effet de la composition des milieux de culture sur la capacité à régénérer des plantes chlorophylliennes pour tous les génotypes confondus a révélé une variation significative de la réponse des ovaires mis en culture. En effet, sur le milieu M_1 on a pu régénérer 110 plantes chlorophylliennes à partir de 1513 ovaires non fécondés (7.27%) alors que sur M_2 , le taux est de 4.54%. Ainsi, le milieu d'induction M_1 a donné la meilleure réponse gynogénétique qui s'est exprimé au niveau du nombre des plantes chlorophylliennes obtenues.

3.4 EFFET DU GENOTYPE SUR L'INDUCTION ET LA DIFFERENCIATION DES OVAIRES NON FECONDES

L'effet génotypique testé vis-à-vis de l'induction et de la différenciation est hautement significatif ($p < 0.01$) ce qui confirme, comme pour [41] que la réponse sur la réaction des ovaires et sur la régénération des plantes chlorophylliennes diffère selon le génotype.

La variété Isly présente une forte capacité d'induction et peut dans certaines conditions montrer une bonne capacité de régénération (22.5%) et dans d'autres elle n'a pas pu régénérer aucune plantes. Ce même phénomène est observé chez la variété Cocorit. En effet, cette dernière présente des taux d'induction qui varie de 6.9% à 16.6%, alors que la capacité de régénérer des plantes haploïdes reste très faible sauf pour les ovaires prétraités au froid pendant 15 jours et cultivés sur le milieu de culture M_1 .

Seul le génotype Jori, a eu un comportement relativement stable pour l'ensemble des paramètres gynogénétiques mesurés et elle présente une bonne capacité gynogénétique traduite par un rendement théorique assez important.

Tableau 2: Compositions des milieux de cultures utilisés

Composants	M1	M2	M3	M4	M5
NH ₄ NO ₃	0,160	0,160	0,160	0,160	0,080
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,440		0,440	0,440	0,220
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O		0,500			
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,370	0,072	0,370	0,370	0,185
KH ₂ PO ₄	0,170	0,170	0,170	0,170	0,085
KNO ₃	1,900	1,000	1,900	1,900	0,950
KI	0,83	0,75	0,83	0,83	0,42
H ₃ BO ₃	6,20	1,60	6,20	6,20	3,10
MnSO ₄ , H ₂ O	8,45	4,90	8,45	8,45	4,23
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8,60	7,90	8,60	8,60	4,30
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,25		0,25	0,25	0,125
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025		0,025	0,025	0,012
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025		0,025	0,025	0,012
myo-inositol	100	100	100	100	50
acide nicotinique	1		0,5	1	
pyridoxine, HCl	1		0,5		
thiamine, HCl	1		0,1	5	
pyruvate, Na				5	
glutamine	750		146	146	
hydrolysate de caséine		250			
glycine			2	2	
FeEDTA	40	40	40	40	20
maltose	60	90			
saccharose			30	30	20
2,4-D	2	2	1		
ANA			1		
AA				1	
kinéine	0,5				
BAP				2	
2AiP			0,1		
AIB					0,05

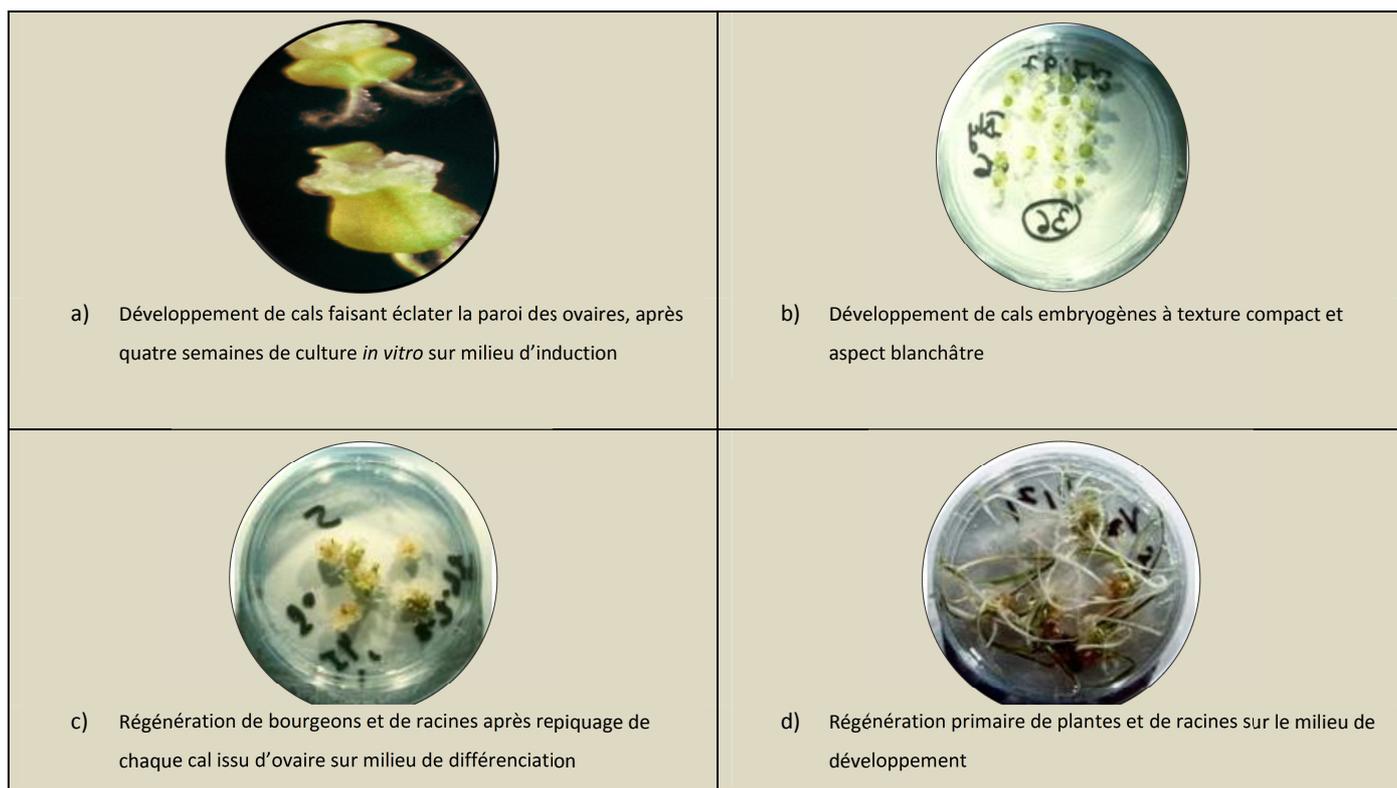


Figure 1. Expression morphogénétique de la culture d'ovaires des trois variétés de blé dur

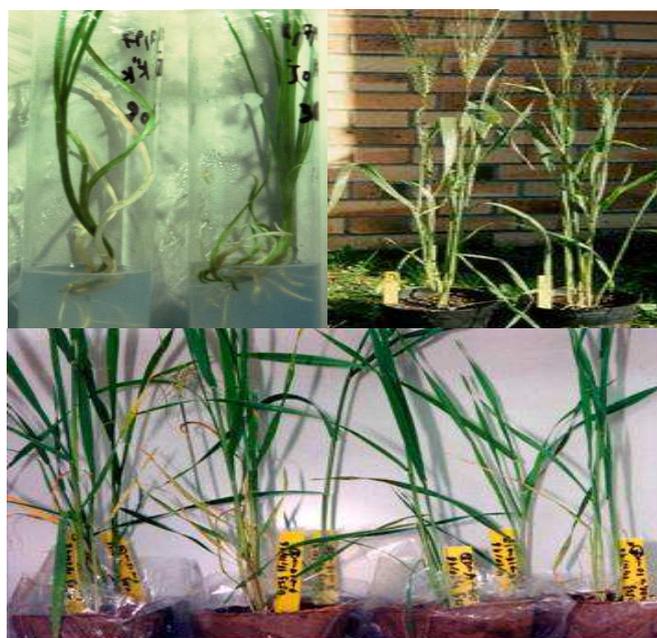


Figure 2. Régénération des plantes chlorophylliennes

Tableau 3. Effet de différents prétraitements et du milieu d'induction sur les paramètres gynogénétiques chez la variété Cocorit

Milieu d'induction	Prétraitement	Nombre d'ovaires mis en culture	Nombre d'ovaires réactifs	Taux d'induction	Nombre total de plantes	Taux de régénération	Rendement théorique
M1	P1	180	27	15	3	1,6	11,1
	P2	198	33	16,6	2	1	6,1
	P3	156	22	14,1	24	15,4	109
M2	P1	166	16	9,6	0	2,4	0
	P2	202	18	8,9	1	1,5	5,5
	P3	144	10	6,9	0	0,7	0

P₁: prétraitement au froid à 4°C pendant 7 jours; P₂: prétraitement au froid à 4°C pendant 11 jours; P₃: prétraitement au froid à 4°C pendant 15 jours; M₁: milieu 1; M₂: milieu 2

Tableau 4. Effet de différents prétraitements et du milieu d'induction sur les paramètres gynogénétiques chez la variété Isly

Milieu d'induction	Prétraitement	Nombre d'ovaires mis en culture	Nombre d'ovaires réactifs	Taux d'induction	Nombre total de plantes	Taux de régénération	Rendement théorique
M1	P1	195	53	27,2	2	1	3,7
	P2	120	31	25,8	3	2,5	9,6
	P3	105	23	21,9	0	0	0
M2	P1	173	45	26,1	39	22,5	86,6
	P2	134	26	19,4	0	0	0
	P3	162	18	11,1	7	4,3	38,8

P₁: prétraitement au froid à 4°C pendant 7 jours; P₂: prétraitement au froid à 4°C pendant 11 jours; P₃: prétraitement au froid à 4°C pendant 15 jours; M₁: milieu 1; M₂: milieu 2

Tableau 5 : Effet de différents prétraitements et du milieu d'induction sur les paramètres gynogénétiques chez la variété Jori

Milieu d'induction	Prétraitement	Nombre d'ovaires mis en culture	Nombre d'ovaires réactifs	Taux d'induction	Nombre total de plantes	Taux de régénération	Rendement théorique
M1	P1	180	42	23,3	31	17,2	73,8
	P2	195	53	27,2	38	19,4	71,7
	P3	184	34	18,5	7	3,8	20,6
M2	P1	176	31	17,6	17	9,6	54,9
	P2	172	13	7,5	4	2,3	30,8
	P3	169	17	10,1	0	0	0

P₁: prétraitement au froid à 4°C pendant 7 jours; P₂: prétraitement au froid à 4°C pendant 11 jours; P₃: prétraitement au froid à 4°C pendant 15 jours; M₁: milieu 1; M₂: milieu 2

4 CONCLUSION

La réponse et les rendements gynogénétiques ainsi que la régénération de plantes chlorophylliennes à partir de trois variétés de blé dur a montré que les génotypes interagissent fortement avec la durée de prétraitement et avec la composition du milieu d'induction.

RÉFÉRENCES

- [1]. Bachtta, M.S.; 2011. La céréaliculture en Tunisie. Une politique de régulation à repenser. Les notes d'analyse du CIHEAM, 64 :1-19.
- [2]. El Felah, M. et Gharbi, M.S.; 2014. Les céréales en Tunisie: Historique, contraintes de développement et perspectives. Journée Nationale sur la valorisation des résultats de la Recherche dans le domaine des Grandes Cultures Tunis, le 17 avril 2014. p: 1-7.
- [3]. Deghais, M.; Kouki, M.; Gharbi, M.S.; El Felah, M.; 2007. The cereal varieties grown in Tunisia. Minister of Agriculture and Water Resources Research and institution of higher agricultural education, Tunisian Republic, 445 p.
- [4]. Ammar, K.; Gharbi, M.S.; Deghais, M.; 2011. Wheat in Tunisia. In: The World Wheat Book. A History of Wheat Breeding. Bonjean, A.P.; William, J.; Van Ginkel, A.M. Editors. Vol 2: 443-465.
- [5]. Radhouane, L.; 2013. Climate change impacts on North African countries and on some Tunisian economic sectors. Journal of Agriculture and Environment for International Development, 107(1): 101-111.
- [6]. Doussinault, G.; 1995. Cent ans de sélection du blé en France et en Belgique. Quel avenir pour l'amélioration des plantes. Ed. AUPELF-UREF, John Libbey Eurotexte, Paris, 3-8.
- [7]. Ribaut, J.M., Jiang, C.; Gonzalez-de-Leon, V.; Edmeades, G.O.; Hoisington, D.A.; 1997. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. II. Yield components and marker assisted selection strategies. Theoretical and Applied Genetics, 75: 286-290
- [8]. Liu, W.; Zheng, Y.; Polle, E.; Konzak, C.F.; 2002. Highly efficient doubled haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. Crop Sci., 42: 686-692
- [9]. Serghini, M.A.; 2006. Apport des biotechnologies végétales. Congrès International de Biochimie, Agadir, Maroc, 09-12 Mai, p. 42-44.
- [10]. Amara, S.H., Benzaghrou, S.; Lepoivre, P.; 1999. Capacité androgénétique des variétés tunisiennes de blé dur. Cahiers Agricultures, 8(4): 334-338.
- [11]. 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.
- [12]. Pellegrineschi, A.; Reynolds, M.; Pacheco, M.; Brito, R.M.; Almeraya, R.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Hoisington, D.; 2004. Stress-induced expression in wheat of the Arabidopsis thaliana DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. Genome, 47 (3): 493-500.
- [13]. Dagüstü, N. 2008. Diallel analysis of anther culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). African Journal of Biotechnology, 7(19): 3419-3423.
- [14]. Castillo, A.M.; Egana, B.; Sanz, J.M.; Cistue, L.; 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. Plant Cell Rep., 17: 902-906
- [15]. Savaskan, C., Szarejko, I.; Toker, M.C.; 1999. Callus production and plant regeneration from anther of some Turkish barley cultivars. Turkish Journal Plant Botany, 23: 359-365.
- [16]. Szarejko, I.; 2003. Anther culture for doubled haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) . In: Maluszynsky, M.; Kasha, K.J.; Forster, B.P.; Szarejko, I. (Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual, Kluwer, Dordrecht/Boston/London, pp 35-42.
- [17]. Petrova, E.A.; Goroshkevich, S.N.; Politov, D.V. 2006. Distribution of genetic diversity in Siberian Stone Pine (*Pinus sibirica* Du Tour): isozyme markers data. In: International conference on environmental observations, modeling and information systems 2. Tomsk, Russia. 1-8 July 2006. pp: 127-131.
- [18]. Hiei, Y.; Yuji Ishida, Y.; Komari, T.; 2014. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Frontiers in Plant Science, 5(628): 1-11
- [19]. Hadwiger, L. A.; Chang, M.M.; Parsons, M.A.; 1993. *Fusarium solani* DNase Is a signal for increasing expression of nonhost disease resistant response genes, hypersensitivity, and pisatin production. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal, 8(6): 871-879.
- [20]. Zhu, Z.W.H.; 1979. *In vitro* production of haploid plantlets from the unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* and *Nicotiana tabacum*. Acta Genetica Sinica, 2: 1-6.
- [21]. Labbani, Z.; Richard, N.; De Buyser, J.; Picard, E.; 2005. Plantes chlorophylliennes de blé dur obtenues par culture de microspores isolées: importance des prétraitements. C. R. Biologies, 328: 713-723.
- [22]. 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.
- [23]. Saidi, N.; Chlyah, O.; Chlyah, H.; 1998. Production of green haploid durum wheat plants by pollination of wheat with maize. Canadian Journal of Botany, 76 (4): 652-656
- [24]. Caredda, S.; Doncoeur, C.; Devaux, P.; Sangwan, R.S.; Clément, C.; 2000. Plastid differentiation during androgenesis in albino and no-albino producing cultivars of Barley (*Hordeum vulgare* L.). Sex Plant Reproduction, 13: 95-101.

- [25]. Cistué, L.; Romagosa, I.; Batlle, F.; Echavarri, B.; 2009. Improvements in the production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep.*, 28:727–735
- [26]. Vasil, I.K.; Vasil, V.; Lu, C.; Atkins, P.; Z. Haydu, Z.; Wang, D.; 1982. Somatic embryogenesis in cereals and grasses. Pages 3-21 in *Variability in plants regenerated from tissue culture*. E. Earle and Y. Demarly, eds. Praeger Press, New York.
- [27]. Vasil, I.K.; 2005. Tissue cultures of maize. *Maydica*, 50: 361-365
- [28]. El Goumi, Y.; Fakiri, M.; Lamsaouri, O.; Mounsif Bencheikroun, M.; Hassani, M.F.; 2014. Analyse de la capacité androgénétique de trois cultivars de blé dur (*Triticum durum*) et trois cultivars de blé tendre (*Triticum aestivum*). *Lebanese Science Journal*, 15 (1): 85-98.
- [29]. Collins, G.B. 1977. Production and utilization of anther-derived haploids in crop plants. *Crop Sci.*, 17:583-586.
- [30]. Zair, I.; Chlayeh, A.; Sabounji, K.; Tittahsen, M.; Chlayeh, H.; 2003. Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of in vitro selection pressure. *Plant Cell Tissue and organ culture*, 73: 237-244.
- [31]. Soltner, D.; 2005. Les grandes productions végétales. Bressuire : Collection Sciences et Techniques Agricoles, 20ème Édition, 472p.
- [32]. Sibi, M.L.; Kobaissi, A.; Shekafandeh, A.; 2001. Chlorophyllian haploid plants and regenerating strains by in vitro ovaries culture in tetraploid wheat (*Triticum durum* Defs). *Euphytica*, 122: 351-359.
- [33]. Ayolié, K.; El Yacoubi, H.; Rochdi, A.; 2007. Influence du 2,4-D et de l'explant embryonnaire sur la callogénèse du blé dur. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 146: 97-112.
- [34]. Ryschk, S.; U. Ryschk, U.; & J. Schulze, J.; 1991.- Anatomical studies on the development of somatic embryoids in wheat and barley explants. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 187 (1): 31-41.
- [35]. Mzouri, K.; Amssa, M.; Bouiamrine, H.; 2001. Embryogenèse somatique a partir d'embryons immatures de Blé tendre (*Triticum aestivum* L.): effet génotype. *Acta Bot. Gallica*, 148 (3): 215-225.
- [36]. Mdarhri-Alaoui, M.; Saidi, N.; Chlyah A, Chlyah, H.; 1998. Obtention par gynogenèse in vitro de plantes haploïdes chlorophylliennes chez le blé dur. *C.R. Acad. Sci.*, 321 : 25-30.
- [37]. Ayed, O.S.; De Buyser, J.; Picard, E.; Trifa, Y.; Slim Amara, H.; 2007. Effect of pre-treatment on isolated microspores culture ability in durum wheat (*Triticum turgidum subsp. durum* Desf.). *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 2(2): 30-38.
- [38]. Ou, G.; Wang, W.C.; Nguyen, H.T.; 1989. Inheritance of somatic embryogenesis and organ regeneration from immature embryo cultures of winter wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 78 (1): 137-142.
- [39]. Felfoldi, K.; Purnhauser, L.; 1992. Induction of regenerating callus cultures from immature embryos of 44 wheat and 3 triticales cultivars. *Cereals Research Communications*, 20(3-4): 273-277.
- [40]. Abid, N.; Maqbool, A.; Malik, K.A.; 2014. Screening commercial wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties for *Agrobacterium* mediated transformation ability. *Pak. J. Agric. Sci.*, 51: 83–89.
- [41]. Chlyah, H.; Cherkaoui, S.; Saidi, N.; Lamsaouri, O.; Mdarhi-Alaoui, M.; Chlyah, O.; Benkirane, H.; Amail, O.; 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.
- [42]. Cherkaoui, S.; Lamsaouri, O.; Chlyah, B.; 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.
- [43]. Karim, R.; Chlyah, H.; Badoc, A.; Douira, A.; 2005. Obtention de pieds néoformés suite à l'induction de cals embryogènes d'embryons zygotiques de blés par le borate de sodium et un extrait de *Fusarium graminearum*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 144: 195-210.
- [44]. Sivanesan, I.; Park, S.W.; 2014 The role of silicon in plant tissue culture. *Frontiers in Plant Science*, 5(571): 1-4.