

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mentouri Constantine

Département de Biologie

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

THESE

Présentée pour obtenir le Diplôme de

Doctorat d'Etat

Spécialité : Biotechnologie Végétale

Par

Zelikha LABBANI

Thème

**Réorientation androgénétique des microspores de *Triticum turgidum subsp.durum* (Desf) Husn.
L'albinisme peut-il être partiellement maîtrisé ?**

Soutenue publiquement le: 13 mai 2007

Devant le jury:

Président	Mr. Douadi Khelifi	Pr. Université Constantine, Algérie
Directeur de Thèse	Mr. Emmanuel Picard	Mc. Université Paris XI, France
Examineurs:	Mme Dalila Satta	Pr. Université Constantine, Algérie
	Mr. Jacques de Buyser	Mc. Université Paris XI, France
	Mr. Jean-Marie Jacquemin	Dr. CRAW Gembloux, Belgique
	Mr. Patrick du Jardin	Pr. FUSA Gembloux, Belgique
Membre Invité:	Mme Meriem Kaid-Harche	Pr. Université Oran, Algérie

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de **Morphogenèse Végétale Expérimentale Haploïde** (MVEH), **Université de Paris Sud XI, Orsay, France**.

Cette thèse n'aurait vu le jour sans la confiance, la patience et la générosité de mon Directeur de Thèse, Monsieur **Emmanuel Picard**, Maître de Conférences, Directeur des Etudes L1BCST à l'Université de Paris Sud XI et Directeur du Laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale Haploïde.

Que puis-je dire à mon Directeur de thèse ? Comment pourrais-je suffisamment le remercier ? Difficile en quelques mots de vous exprimer toute ma reconnaissance et mon estime.

La pleine confiance que vous m'avez accordée dès mon premier jour dans votre laboratoire, m'a permis d'élaborer un plan de thèse personnel et propre à mes aspirations. Je voudrai vous remercier d'avoir cru en mes capacités et de m'avoir fourni d'excellentes conditions logistiques et financières.

Pendant mes séjours à Orsay, vous avez su affûter et polir ma méthode scientifique en invoquant des questions et des problèmes de taille. Vous avez su garder mon intérêt en androgenèse en me faisant toujours réfléchir aux réponses à mes propres questions avant d'y répondre. Au laboratoire, vous m'avez démontré l'importance du travail sérieux et précis qu'est la science. Vous avez su me conseiller efficacement tout en me laissant travailler très librement. Je vous remercie pour m'avoir communiqué votre enthousiasme contagieux envers la recherche avec un sujet passionnant et pour m'avoir aidé à développer mon raisonnement par vos conseils judicieux et des discussions stimulantes au possible.

Jamais je n'aurai pu réaliser cette recherche doctorale sans le support indéfectible de Monsieur **Emmanuel Picard**. Les remerciements exprimés ici ne seront jamais à la hauteur de votre implication dans ce travail de thèse. Je vous exprime ici toute ma reconnaissance.

Je vous dois de m'avoir rendu possible cette passionnante aventure intellectuelle «ma thèse».

Monsieur Douadi Khelifi, Professeur au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri Constantine m'a fait l'honneur d'accepter d'être président de mon jury de thèse je lui exprime ma profonde gratitude.

Mes plus sincères remerciements vont également à Monsieur Jacques de Buyser Maître de Conférences à l'Université de Paris Sud XI, Orsay, France, d'avoir bien voulu accepter de m'encadrer et de m'initier aux techniques de la CMI. Je n'oublierai jamais le jour où vous m'avez montré comment tenir un épi sous la hotte à flux laminaire. Votre patience et votre calme m'ont été d'un grand profit. Vos conseils précieux sur les manipulations techniques et théoriques de cette étude et vos suggestions ont été fort judicieux et appréciés, ... de participer à la révision de certains éléments de ma thèse, d'avoir bien voulu être membre de mon jury.....

Merci Jacques

J'ai toujours eu un profond respect au Professeur Patrick du Jardin de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (FUSAGx), Belgique et suis forte honorée que celui-ci ait accepté de siéger à la soutenance de ma thèse doctorale.

Je suis très reconnaissante au Docteur Jean-Marie Jacquemin du Département de Biotechnologie, Centre de Recherches Agronomiques de Wallonie (CRA-W), Gembloux, Belgique, qui a accepté d'agir à titre d'examineur externe dans le cadre de la soutenance de mon doctorat et de me faire l'honneur de participer au jury.

J'aimerais remercier Madame Dalila Satta, Professeur au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri Constantine pour l'opportunité qu'elle m'a offerte en acceptant de juger mon travail Doctoral.

J'offre mes sincères remerciements au Professeur Meriem Kaid-Harche du Département des Biotechnologies, Université des Sciences et de la Technologie Mohamed Boudiaf USTO, Oran, responsable de Post-graduation et chef de projet CNEPRU et projet environnement pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

J'aimerais par ailleurs souligner la contribution importante de Monsieur Bruno Lascaux, Technicien de laboratoire au Bâtiment 360, à l'Université de Paris Sud XI, Orsay, qui s'est profondément impliquée tout au long du processus de cette recherche. Votre aide a été d'un précieux recours.

Merci Bruno

Je tiens à remercier Aline, Annick, Jean Louis, l'ensemble du personnel de la serre par leurs conseils, leurs suggestions, la mise à ma disposition, dans les instances dont ils ont la responsabilité, m'ont aidé à mener à son terme ce travail de recherche... Sans eux, la tâche eût sans doute été insurmontable...

Je désire remercier Madame Jeanne Belghaib Directrice de la résidence Universitaire, Orsay de m'avoir accueilli et m'hébergé dans sa résidence. Je la remercie pour sa gentillesse et sa grande compréhension, sans elle la tâche serait plus difficile pour moi

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur Djamel Hamana Professeur au Département de Physique, Faculté des Sciences Exactes et Ex Doyen de la Faculté des Sciences, à Monsieur Salah Eddine Bouaoud, Professeur au Département de Chimie, Faculté des Sciences Exactes et Vice Recteur Chargé de la Recherche, Université Mentouri Constantine pour l'aide qu'ils m'ont apporté et pour leurs compréhensions.

Je sais que j'oublie des gens. Mais un fait est certain. Bien que je demeure le principal artisan de cette thèse de doctorat, je ne peux pas ignorer que la réalisation de celle-ci n'aurait jamais été possible sans la contribution de ces dizaines voire même de ces centaines de personnes. Merci à toutes et à tous!

Je termine par un grand remerciement à ma famille, de m'avoir supporté et aidé.

Je suis très reconnaissante d'avoir reçu une formation de première qualité à l'Université de **Paris Sud XI, Orsay, France**. Suite à ce travail, je me sens entièrement préparée à poursuivre mes recherches post doctorales.

Résumé. Réorientation androgénétique des microspores de *Triticum turgidum subsp. durum* (Desf.) Husn. L'albinisme peut-il être partiellement maîtrisé?

La culture *in vitro* d'anthères de blé dur (*Triticum turgidum subsp.durum* (Desf.) Husn.) donne habituellement un très fort taux d'albinisme chez les plantes régénérées, ce qui limite considérablement son utilisation. Seules la méthode de culture *in vitro* d'ovaires immatures ou celle du croisement intergénérique avec le maïs permettent d'obtenir des plantes vertes haploïdes et des haploïdes doublés d'origine gynogénétique. Notre étude concerne une autre méthode d'obtention d'haploïdes doublés, d'origine androgénétique: la culture *in vitro* de microspores isolées (CMI).

Notre travail a eu pour but d'améliorer l'induction d'embryons androgénétiques chez le blé dur via la CMI afin d'obtenir le plus grand nombre d'embryons donnant par la suite des plantules chlorophylliennes. L'objectif principal de cette étude était donc de développer un protocole de CMI chez le blé dur applicable à la plupart des génotypes, protocole qui devait apporter une solution à l'albinisme.

Cette étude a été réalisée sur deux génotypes de blé dur (Cham 1 et Jennah Khetifa (JK)) choisis pour leur grande différence de comportement *in vitro*. Par la suite, nous avons tenté d'étudier d'autres génotypes.

Nous avons comparé l'effet de plusieurs prétraitements et montré, pour la première fois, qu'il était possible d'améliorer significativement l'obtention d'embryons et de plantes androgénétiques chlorophylliennes chez le blé dur (*Triticum turgidum subsp.durum* (Desf.) Husn.). Pour cela nous avons utilisé de nouveaux prétraitements appliqués aux microspores dans leurs épis avant leur isolement et leur mise en culture. Les deux prétraitements qui ont donné un bon résultat sont le froid de longue durée et le mannitol 0,3M pendant 7j au froid. Ainsi pour un prétraitement au froid de 5 semaines, 5 300 embryons androgénétiques ont été obtenus à partir de 2 470 000 microspores des deux variétés de blé dur (Cham1 et JK) : 1 850 ont été repiqués et ont donné 89 plantes chlorophylliennes, soit 9 plantes vertes pour 100 anthères (les deux variétés comprises). De même avec le mannitol 0,3M, une durée de 7j au froid a donné pour la variété JK une fréquence de 2,31% de régénération chlorophyllienne, soit 9 plantes vertes pour 100 anthères. Signalons enfin un autre résultat original, jamais obtenu en androgénèse *in vitro*, l'obtention de plantes chlorophylliennes régénérées à partir d'embryons très âgés.

En résumé, notre étude montre que les deux prétraitements: froid de longue durée et mannitol 0,3M (7j) sont prometteurs pour la régénération chlorophyllienne chez le *Triticum turgidum subsp. durum* (Desf.) Husn.

Mots clés: CMI, *Triticum turgidum subsp. durum* (Desf.) Husn., Prétraitements, Mannitol, Froid, Induction androgénétique, Embryogenèse *in vitro*, Régénération chlorophyllienne *in vitro*, Albinisme.

Sommaire

	Pages
Remerciements	
Résumé en français	
Abréviations	
Introduction	01
Chapitre préliminaire	06
I. Le blé	
I.1. Présentation botanique.....	07
I.2. Origine et histoire.....	07
I.3. Données économiques.....	08
II. Haplodiploïdisation	
II.1. Introduction.....	09
II.2. Intérêt de produire des plantes haploïdes doublées.....	10
III. Méthodes d'obtention d'haploïdes	
III.1. Androgenèse par culture d'anthères <i>in vitro</i>	11
* Facteurs influençant la réussite de l'androgenèse <i>in vitro</i>	
a. Génotype et cytoplasme.....	14
b. Etat physiologique de la plante mère.....	15
c. Stade et état des microspores mises en culture <i>in vitro</i>	
* Rappel sur les gamétogenèses mâle et femelle chez le blé	
1. Gamétogenèse mâle.....	16
a. Microsporogenèse.....	16
b. Palynogenèse	
b.1. La microspore.....	17
b.2. Le grain de pollen.....	18
2. Gamétogenèse femelle	
a. La mégasporogenèse.....	19
b. La formation du sac embryonnaire ou mégagamétogenèse.....	19
3. Fécondation et formation de l'embryon.....	20
d. Conditions de culture <i>in vitro</i> des anthères.....	21
III.2. Culture <i>in vitro</i> des microspores isolées	21
*Conditions de réussite.....	24
III.3. La Gynogenèse ou culture d'ovaires <i>in vitro</i>	24
III.4. Les croisements interspécifiques et intergénériques	25

IV. Comparaison des différentes méthodes d'haplodiploïdisation décrites	26
V. La question des marqueurs de l'embryogenèse haploïde et de la production d'embryons	27
VI. Marquage de l'aptitude à l'haploïdie	28
VII. Y a-t-il un rôle de la mort programmée cellulaire durant l'androgenèse ?	28
VIII. Les limites de l'androgenèse	
VIII.1. Le cas des espèces récalcitrantes.....	29
VIII.2. Aptitude à l'androgenèse.....	30
VIII.3. L'albinisme.....	30
IX. Comment maximiser la réussite de l'androgenèse et diminuer l'albinisme ? Rôle des Prétraitements.....	33

Matériel et méthodes

I. Le matériel génétique	37
II. Les méthodes	
II.1. Conditions de culture des plantes mères	38
II.2. Prélèvement des talles	39
II.3. Coloration au rouge carmin acétique	40
II.4. Prétraitements appliqués aux talles avant l'isolement des microspores ...	40
II.5. Extraction des microspores	46
II.6. Culture des microspores isolées	46
II.7. Repiquage des embryons	47
II.8. Développement des plantules	47
II.9. Comptage des plantes.....	48
II.10. Les paramètres d'appréciation des résultats obtenus en culture <i>in vitro</i> des microspores isolées.....	48
II.11. Observations cytologiques	48
II.11.1. Le Di Acétate de Fluorescéine: D.A.F.....	48
a. Préparation de la solution	48
b. Observation au microscope inversé	49
II.11.2. Le 4', 6 Di Aminido-2-Phényl Indole: D.A.P.I	49
a. Préparation de la solution	49
b. Observation au microscope inversé	49
II.11.3. Possibilité d'associer les deux colorants pour une seule	

Observation	
a. Préparation.....	50
b. Observation au microscope inversé.....	50
II.12. Fertilité et niveau de ploïdie des plantes obtenues	50
II.13. Tests statistiques	50
II.13.1. Test de comparaison de pourcentage	52
II.13.2. Analyses de variances	54
II.13.3. Calcul des écarts-types	56

Résultats

Chapitre 1 Effet des prétraitements en culture *in vitro* de microspores isolées chez le blé dur

I. Introduction	57
II. Résultats	
II.1. Production d'embryons	57
II.2. Régénération et conversion des embryons en plantes	59
II.3. Rendement théorique global chlorophyllien	62
II.4. Comportement des génotypes vis-à-vis des différents prétraitements appliqués	63
II.5. Observations cytologiques	64
III. Analyse statistique	
III.1. Embryogenèse	65
III.1.1. Effet prétraitement	65
III.1.1.1. Effet du froid	65
III.1.1.2. Effet du mannitol ou du stress osmotique	66
III.1.1.3. Effet de la combinaison froid et mannitol ou mannitol et froid	66
III.1.2. Effet génotype	67
III.1.3. Effet interaction : variété x prétraitement	67
III.2. Régénération ou conversion des embryons en plantes	68

Chapitre 2 Effet du mannitol sur la culture *in vitro* de microspores isolées chez le blé dur

I. Résultats de la première série d'expériences sur l'effet de la concentration du mannitol	69
I.1. L'embryogenèse et la production d'embryons	69
I.2. Régénération	69
I.3. Effet de la concentration du mannitol sur un autre génotype	70
II. Résultats de la deuxième série d'expériences sur l'effet de la durée du prétraitement au mannitol	71
II.1. Cas de cv. JK	71
II.1.1. Effet de la durée du prétraitement au mannitol 0,3M sur l'embryogenèse	71
II.1.2. Effet de la durée du prétraitement au mannitol sur la régénération ou la conversion des embryons en plantes	72
II.2. Cas des autres cultivars	73
III. Effet du mannitol sur l'âge des embryons transférés sur le MS0	77
IV. Analyse statistique	
1. Embryogenèse	
1.1. En absence de cv. JK	78
1.1.1. Effet variété	78
1.1.2. Effet durée	79
1.1.3. Effet interaction : variété x prétraitement	79
1.2. En présence de cv. JK	79
2. Régénération ou la conversion des embryons en plantes	80

Chapitre 3 Tentatives d'amélioration du protocole de culture *in vitro* de microspores isolées chez le blé dur

I. Cv. Cham1	
I.1. Mannitol 0,3M	81
I.2. Froid	
I.2.1. Froid de courte durée	82
I.2.2. Froid de longue durée	
* Froid 5 semaines	83
* Froid 6 semaines	83

* Froid 7 semaines	84
* Froid 9 semaines	85
* Froid 11 semaines	85
I.3. Combinaison : Froid + mannitol (Froid et mannitol)	86
I.4. Méthode de Liu	86
II. Cv. JK	86
II.1. Mannitol 0,3M	87
II.2. Froid	
II.2.1. Froid de courte durée	87
II.2.2. Froid de longue durée	88
* Froid de 5 semaines	88
* Froid de 6 semaines	89
* Froid de très longue durée	
* Froid de 7 semaines	90
* Froid de 9 semaines	90
* Froid de 11 semaines	91
II.3. Combinaison Froid + mannitol 0,3M / mannitol 0,3M + Froid	91
II.4. Méthode de Liu	92
III. Cv. Bidi 17	92
IV. Cv. Hedba 03	93
V. Cv. Mohamed Ben Bachir (MBB)	94
VI. Cv. Oued Zenati 368 (OZ)	96
VII. Autres variétés de blé dur	97
VIII. Cv. Pavon 76	97
VIII.1. Mannitol 0,3M	97
VIII.2. Froid à 4°C	98
VIII.2.1. Froid de courte durée	98
VIII.2.2. Froid de longue durée	98
VIII.3. Méthode de Liu	100
Discussion	103
Conclusions et perspectives	125
Références bibliographiques	130
Annexes	
Résumé en arabe	

Résumé en anglais

Abridged English version

Publications récentes

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
AIA	acide indole acérique
ANA	acide naphthalène acétique
ANOVA	analyse de variance (analysis of variance)
Anthocyan	anthocyanées
ARN	acide ribonucléique
B	broyage lent (vitesse maintenue en plaçant le variateur sur la position 2 soit 18000 RPM).
BAP	6-benzylaminopurine
BCM	broyage lent, centrifugation lente et gradient de maltose 0,58M
C	centrifugation lente (g = 57)
C50	centrifugation lente (g = 50)
CA	culture <i>in vitro</i> d'anthère
CHB3 1990	milieu d'induction Chu (modifié par addition de 90g/l de maltose) Chu <i>et al.</i> ,
cl	classique
CM	moyenne des carrés
CMe	moyenne des carrés résiduelles
CMI	culture <i>in vitro</i> de microspores isolées.
CYMMIT	International Maize and Wheat Improvement Center
cv.	cultivar
cvs.	cultivars
DAF	Di Acétate de Fluoresceine
DAPI	4', 6 Diaminido-2-Phénylindole
ddl	degré de liberté
2,4-D	acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
Emb	embryons
Ep	épillets
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organization)
FGH	milieu d'induction modifié par Olsen (1987)
Fr	froid
HD	haploïde doublé. Désigne tout génotype homozygote issu d'une technique quelconque d'aploïdisation

2 HNA	acide 2 hydroxynicotinique (2 hydroxynicotinic acid)
ICARDA	Centre International de Recherches Agronomiques en Zones Arides (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas)
j	jour
JK	Jannah Khetifa
M	mole
Mal	maltose
Man	mannitol
MBB	Mohamed Ben Bachir
MS	milieu de régénération de Murashige et Skoog (1962)
MS0	milieu de régénération de Murashige et Skoog sans hormones
MVEH	laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale Haploïde
Nbr	nombre
OZ	Oued Zenati 368
P	plantes
PAA	Acide phényl acétique (phenylacetic acid)
PEG	polyéthylène glycol
PPDS	plus petite différence significative
r	nombre de répétitions.
Rubisco	ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/oxygénase
S	semaines
SC	somme des carrés
Test F	test de Fisher
V/A	rapport entre plantes vertes et plantes albina
V1	broyage lent (vitesse régulée en plaçant le variateur sur la position 1)

Introduction

Depuis l'indépendance (en 1962), les différentes politiques et interventions de l'Etat dans le secteur agricole avaient pour but d'améliorer le niveau de production des céréales, en général, et du blé dur en particulier. Pourquoi un tel intérêt pour les céréales? Les céréales sont les cultures annuelles les plus importantes pour l'agriculture algérienne. Dans ce secteur, les céréales occupent annuellement presque 50% en moyenne de la superficie agricole utile. D'après le Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, les céréales (essentiellement les blés) représentent près de 60% des apports énergétiques (calories) de la ration alimentaire algérienne moyenne, 70% des protéines totales et 88% des protéines végétales. Cependant, malgré cette large suprématie dans le secteur agricole et au plan de la consommation, la production nationale des céréales demeure insuffisante et ne couvre pas plus de 25 à 30% des besoins domestiques. Parmi toutes les espèces céréalières, le blé dur représente la part alimentaire la plus importante pour une large partie de la population. Pour cela, l'Etat est toujours intervenu dans le marché pour assurer à tous les citoyens un accès équitable à cet aliment. Pour l'année 2004/2005, la production nationale en blé dur est estimée à 1,3 millions de tonnes, alors que celle du blé tendre est de 700 000 tonnes ([d'après une publication dans le journal national sur les travaux du Colloque international, Alger novembre 2005](#)). Connaissant le niveau de production nationale évoquée plus haut, des importations massives de graines de céréales, principalement de blé dur et tendre, sont annuellement opérées par le gouvernement au niveau du marché mondial. En ce sens, le gouvernement a eu à mobiliser annuellement des milliards de dollars pour assurer les importations alimentaires. Les deux grands pays exportateurs du blé (dur et tendre) vers l'Algérie sont la France et le Canada. Pour l'année 2004/2005, l'Etat algérien a importé 646 000 tonnes de blé dur français, alors que l'importation totale est estimée à 1,7 millions de tonnes. Pour le blé tendre, l'exportation française vers l'Algérie est estimée à 1,8 millions de tonnes. Cependant l'importation totale est estimée à 3,3 millions de tonnes ([d'après une publication dans le journal national sur les travaux du Colloque international, Alger novembre 2005](#)). Toujours d'après les mêmes références, la consommation Algérienne en blé dur et tendre pour l'année 2004/2005 est estimée à 7 millions de tonnes : 3 millions de tonnes pour le blé dur et 4 millions de tonnes pour le blé tendre. Comme la production nationale est de 2 millions de tonnes, il en découle un déficit de 5 millions de tonnes, couvert par les importations. Il est utile de rappeler que pour l'année (2005), l'Etat a mobilisé une enveloppe de 1,5 milliards de dollars pour couvrir la totalité des besoins domestiques en blé (les deux espèces confondues) dont 500 millions de dollars sont consacrées uniquement pour couvrir les importations du blé français (les deux espèces confondues): ce qui représente le tiers des

importations totales en blé. Pour ce dernier, l'Algérie est devenue le premier importateur dans le monde.

La culture du blé dur en Algérie est encore difficile à maîtriser car elle est confrontée à plusieurs contraintes (aléas climatiques, faible maîtrise de l'itinéraire technique,.....). La principale difficulté en céréaliculture en Algérie est la limitation en eau, aggravée par l'irrégularité des précipitations, les hautes températures et les maladies, sans compter les contraintes imposées par l'environnement socio-économique. Tous ces facteurs font que la production dans ce secteur est un labeur quotidien aux bien maigres résultats. Cette situation engendre une production en blé très faible. Le rendement moyen est de 14 quintaux à l'hectare (blé dur ou blé tendre, d'après la FAO, statistiques 2004), d'où un déséquilibre alarmant entre l'offre et la demande qui exacerbe la dépendance du pays sur le plan alimentaire vis-à-vis de l'extérieur. Alors que les besoins nationaux ne cessent d'augmenter à cause de l'accroissement démographique de la population, la production du blé dur continue à stagner avec des rendements bas. De ce fait, le pays continue d'importer massivement du blé dur de l'étranger pour couvrir la totalité des besoins domestiques. Si, par le passé, la production de blé dur a répondu à la demande, de nos jours, elle ne couvre que 40% des besoins. L'objectif est donc de combler un déficit de 60% de la consommation nationale pour ce produit stratégique. La faiblesse de la production de blé dur en Algérie découle en majeure partie des faibles rendements (14 quintaux à l'hectare). Il est donc impératif d'accroître les rendements à l'hectare, car il n'est plus possible d'étendre les superficies consacrées aux céréales. Au contraire, ces superficies sont menacées par l'avancée du béton armé et peuvent être diminuées dans un futur prochain par l'accroissement démographique de la population et son besoin en urbanisme. Le recours à l'irrigation est très coûteux et parfois difficile à mettre en œuvre. C'est pourquoi il apparaît plus judicieux de développer de nouvelles variétés plus résistantes au manque d'eau et produisant plus de graines. La création variétale doit viser la valorisation et l'intégration du patrimoine génétique national dans des programmes d'amélioration tenant compte des contraintes locales. Cet objectif ne sera concrétisé que si les orientations actuelles en matière de création et de sélection variétale changent, et si les méthodes d'obtention de nouvelles variétés sont bien maîtrisées et menées dans le cadre d'une stratégie répondant aux préoccupations et aux besoins d'une sécurité alimentaire. Des lors et à l'aube du nouveau millénaire, l'Algérie doit plus que jamais mobiliser son énergie et déployer son effort pour atteindre l'autosuffisance alimentaire. L'augmentation des rendements et de la production apparaît donc comme un point de passage obligé pour tenter d'atténuer notablement la dépendance alimentaire et relever ce grand défi. Cet objectif nécessite le

déploiement d'approches et de stratégies nouvelles. Assurer l'accessibilité du consommateur aux semoules et au pain même lorsque la demande connaît des variations considérables constitue un objectif organisationnel et un enjeu sociopolitique majeur. Face à ce constat, il demeure urgent de procéder à des actions concrètes de promotion de la production de blé, par une restructuration des outils de production, l'introduction de nouvelles techniques, par le remplacement des vieilles méthodes de travail de la terre, de labour, et principalement la sélection de nouvelles variétés plus adaptées et à meilleur rendement.

Les méthodes d'améliorations variétales classiques sont relativement longues. La culture *in vitro* par la méthode d'haplodiploïdisation permet de contourner ces difficultés. Il suffit après l'obtention des haploïdes de doubler les chromosomes ce qui a comme conséquence de dupliquer du même coup toute l'information génétique de chacun des chromosomes et d'obtenir ainsi, en une étape, l'équivalent de plus de dix années d'autofécondation de lignées complètement homozygotes (lignées pures). Elle permet une fixation rapide du matériel génétique recherché par le sélectionneur. Ceci apporte un gain de temps considérable dans le processus de sélection. L'haplodiploïdisation permet donc au sélectionneur d'obtenir plus rapidement ces lignées pures dont il a besoin dans ses programmes, de juger leur valeur agronomique avec une meilleure précision et, en fin de compte, d'obtenir plus aisément de nouvelles variétés «lignées pures ». Il n'y a pas d'effet de biais dû à l'hétérosis, comme c'est le cas en F2 ou en F3. Les gènes, qu'ils soient récessifs ou dominants, s'expriment tous; aucun n'est masqué. Plus particulièrement, la maîtrise des méthodes conduisant à l'obtention des plantes haploïdes doublées chez le blé dur (*Triticum turgidum subsp.durum* (Desf) Husn.) est un objectif d'une importance capitale pour l'Etat algérien en vue de l'amélioration variétale de cette espèce.

Nous apportons dans ce travail notre contribution à l'optimisation de l'une des méthodes de production d'haploïdes *in vitro*, la méthode de culture *in vitro* de microspores isolées chez le blé dur. Ce choix a été motivé par deux raisons.

- d'une part, le blé dur est l'une des espèces cultivées de la famille des Poacées la plus récalcitrante à l'androgénèse *in vitro*. La régénération de plantes vertes reste cependant le problème majeur de la réussite de l'androgénèse *in vitro* chez le blé dur. De ce fait, il représente un bon matériel pour toutes recherches visant à lever cette barrière : la récalcitrance.
- d'autre part la culture de microspores isolées chez le blé dur est la méthode qui a déjà permis chez d'autres Poacées comme l'orge ou le blé tendre est d'optimiser le pourcentage de régénération de plantes androgénétiques chlorophylliennes.

Notre recherche se situe dans le cadre des travaux antérieurs menés au laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale Haploïde d'Orsay, France (M.V.E.H).

Chez le blé, la culture des anthères est couramment utilisée pour la production de plantes haploïdes. Toutefois, la culture des microspores isolées offre de plus grandes perspectives au sélectionneur. Cependant, de sérieuses contraintes ne permettent pas l'adoption à grande échelle de cette méthode. Il était important de travailler sur l'optimisation des prétraitements conduisant à la production des plantes haploïdes.

Optimiser la méthodologie de culture *in vitro* de microspores isolées chez le blé dur est l'objectif primordial de cette thèse.

Le présent travail relate l'étude comparative de l'effet de plusieurs prétraitements et montre, pour la première fois, comment il a été possible d'améliorer significativement l'obtention d'embryons et de plantes androgénétiques vertes chez le blé dur en utilisant de nouveaux prétraitements des microspores dans leurs épis avant leur isolement et leur mise en culture.

En premier lieu, nous présentons une synthèse bibliographique touchant les principaux aspects de notre recherche. Ensuite, dans le chapitre matériel et méthodes, nous donnons une description détaillée du matériel génétique utilisé et les méthodes retenues. Le cœur de notre travail tentera de faire connaître les résultats obtenus chez le blé dur grâce à une des méthodes d'obtention des haploïdes doublés, l'androgenèse *in vitro*. Chez cette céréale, la première difficulté est d'obtenir ces plantes car le phénomène est rare. Pour cela, nous avons mis au point une méthodologie qui s'appuie sur la méthode de culture de microspores isolées *in vitro*. Nous avons utilisé la variabilité génétique de l'espèce en ce qui concerne le comportement de ses microspores *in vitro* et leurs aptitude à donner des plantes «haploïdes».

Le premier chapitre est consacré à l'étude des effets des prétraitements de quelques jours à plusieurs semaines, au froid seul ou au froid avec du mannitol. Au chapitre 2, nous achevons l'application d'un nouveau prétraitement. Ce chapitre permet de se rendre compte d'un certain nombre de difficultés posées par les variétés de blé dur d'origine algérienne. Ainsi, c'est l'idée de faire des modifications dans certaines techniques bien précises portées dans le protocole de [de Buyser et al., \(2002\)](#) qui nous a amené à introduire des contributions qui font l'objet du chapitre 3. Nous y étudions l'influence des prétraitements associées à des modifications soit au niveau du broyage, de la centrifugation, ou autre..... Dans le chapitre discussion, nous avons été amené à analyser les résultats obtenus et essayer de donner une explication scientifique en s'appuyant sur les derniers résultats publiés dans le domaine de l'androgenèse *in vitro* et plus particulièrement chez les espèces récalcitrantes. En guise de [conclusion](#), nous mettons l'accent sur les principaux résultats obtenus dans cette recherche, suivie par une liste

de références bibliographiques des auteurs mentionnée dans notre étude. Nous lançons quelques questions ouvertes dont nous pensons qu'elles constituent des voies de recherche à explorer dans le domaine de l'androgénèse *in vitro* chez les espèces récalcitrantes. Enfin, nous donnons en annexe les conditions expérimentales et le protocole suivi pour la culture de microspores isolées, avec des tableaux décrivant la composition des milieux d'induction et de régénération.

Chapitre préliminaire

Voici les points essentiels de ce chapitre accompagné de données bibliographiques. Dans la première partie, nous présenterons l'état actuel des connaissances sur les caractéristiques botaniques et phylogéniques du blé, sur son histoire depuis sa domestication par l'*Homo sapiens sapiens* jusqu'à nos jours. Nous situerons la dimension économique du blé. Dans la partie suivante, nous traiterons les aspects concernant la biotechnologie après un aperçu sur le concept d'haplodiploïdisation. Nous présenterons par la suite les principales méthodes d'obtention des haploïdes doublés en conditions artificielles en soulignant leur importance en tant que fournisseurs de nouveaux outils aux mains des sélectionneurs. Un rappel sur les connaissances élémentaires des gamétogenèses mâle et femelle chez le blé sera précisé. Nous évoquerons dans les deux dernières parties, le problème de l'albinisme et comment maximiser la réussite de l'androgenèse *in vitro*. Nous aborderons principalement l'impact des prétraitements dans les stratégies d'amélioration de la réponse androgénétique chez le blé dur.

I. Le blé

I.1. Présentation botanique

Le blé est une plante herbacée, annuelle, monocotylédone, appartenant au genre *Triticum* et à la famille des Poacées (anciennement appelée «Graminées»). Les deux espèces qui dominent aujourd'hui la production sont le blé tendre et le blé dur. Plusieurs autres espèces existent, toutefois elles ne sont cultivées qu'en faibles quantités, tel l'épeautre.

Le blé est une céréale à paille haute de 50 à 150 cm, à inflorescence en épi d'épillets terminal dense, et cultivée pour ses grains ou caryopses (figure 1). On distingue le Blé tendre ou Blé froment et le Blé dur. Ce dernier est une plante à taille haute (80 à 150 cm), présentant un faible tallage, à épis barbus et à gros grains. Ces grains sont destinés à la semoulerie pour la fabrication de pâtes alimentaires et à la biscuiterie pour les gâteaux.

Dans le genre *Triticum*, on distingue trois groupes en fonction du niveau de ploïdie. Les *Triticum* diploïde ($2n=AA=14$), les *Triticum* tétraploïde ($2n=AABB= 28$) et les *Triticum* hexaploïde ($2n=AABBDD= 42$) (figure 2).

I.2. Origine et histoire

Le blé est né au Moyen-Orient de la fusion (hybridation naturelle) entre une plante de culture, l'amidonnier (*Triticum dicoccum*) et une herbe (*Triticum tauschii*).

Les premières espèces de blé cultivé apparaissent il y a 18 000 ans dans le Croissant Fertile. Il s'agit de l'en grain et de l'amidonnier.

- L'en grain (*Triticum monococcum*) est diploïde et porte 7 paires de chromosomes.

- L'amidonnier (*Triticum dicoccum*) est tétraploïde et porte 14 paires de chromosomes.

Le blé dur (*Triticum turgidum subsp.durum* (Desf) Husn.) descend de l'amidonnier, et est également tétraploïde. On en fait de la semoule et des pâtes alimentaires. Il n'est pas panifiable.

Le froment ou blé tendre (*Triticum aestivum subsp. aestivum*) est hexaploïde. Il résulte d'une hybridation entre l'amidonnier (tétraploïde) et une variété de blé diploïde (*Triticum tauschii*).

Les blés cultivés de nos jours sont le résultat des efforts d'amélioration empirique ou consciente au cours des siècles par sélection.

Depuis plus de 10 000 ans, à partir des plaines du Croissant Fertile, l'histoire de la civilisation humaine et celle de la culture des blés ont évolué conjointement. Les premières cultures de blé sont apparues au VII^{ème} siècle av. J.C en Mésopotamie et dans les vallées du Tigre et de l'Euphrate.

Les Poacées, espèces dont font partie les céréales à paille, sont apparues au Crétacé (période s'étendant de -136 à - 65 millions d'années). L'homme moderne est apparu vers 50 000 à 40 000 ans av. J.C. Jusqu'à 12 000-10 000 ans, l'humanité était constituée de peuples chasseurs-cueilleurs, pour diverses raisons. A partir de cette époque, certains groupes humains commencent à collecter systématiquement des céréales sauvages, notamment dans la région constituée par le triangle Turquie - Iran,-Ethiopie, pour ce qui est des blés et de l'orge. Ces pratiques, ont précédé celle du semis qui marque le passage à l'agriculture.

La fin de la dernière glaciation, produite il y a environ 12 000 à 10 000 ans avant J.C, marque un tournant dans l'évolution de certaines communautés humaines qui commencent à se sédentariser à certaines périodes de l'année pour collecter des céréales sauvages. D'après les connaissances actuelles jusqu'à cette date, toute l'humanité vivait de pêche, de chasse et de cueillette depuis le Pléistocène. La domestication du blé remonte à 18 000 ans avant Jésus-Christ dans la zone du Croissant fertile au Proche-Orient (actuels Liban, Syrie, Irak, Iran, Palestine et Sud de la Turquie). C'est à cette époque que nos ancêtres ont commencé à collecter une plante sauvage de la famille des Graminées proche du blé actuel. La première espèce domestiquée est l'amidonnier: *Triticum dicoccum* dérivant de l'espèce sauvage *Triticum dicoccoides* (figure 2) qui provient d'une hybridation entre *Aegilops speltoides* et *Triticum urartu*. En fait, l'ancêtre direct du blé dur est *Triticum dicoccum* qui donnera après de multiples mutations naturelles cette nouvelle espèce, il y a environ 4 000 ans. C'est également *Triticum dicoccum* qui après hybridation spontanée vers 7 000 ans avant J.C avec une graminée apparentée, *Aegilops tauschii*, sera à l'origine de *Triticum aestivum* dont on ne connaît pas de formes sauvages.

I.3. Données économiques

La production de blé a été marquée par plusieurs évolutions. Après avoir été cultivé en petites quantités pendant des milliers d'années le blé a connu une culture extensive avec l'introduction de la machine et de nouvelles techniques. Il existe un très grand nombre de variétés de blé. Ce sont les sélectionneurs qui font le choix des variétés les mieux adaptées en fonction de la nature du sol et du climat de la région, afin d'obtenir le meilleur rendement possible. Il existe plus de vingt mille (peut-être même plus!) variétés de blé et chaque année des centaines de nouvelles sont créés.

Le blé est la première ressource alimentaire humaine. C'est la première espèce cultivée dans le monde en terme de superficie et de quantité, destinée à l'alimentation humaine. Le blé reste, avec le riz, le principal aliment de base des populations humaines. Plus de la moitié de

la planète est nourrie par du blé ou du riz. La plus grande ressource en protéines, loin devant toutes les protéines animales est le blé et la plus grande ressource de calories provient du riz (Harlan, 1971). Depuis la fin des années 1950, le blé a vu progresser ses ventes de façon importante. Aujourd'hui, cette céréale est la plus échangée à l'échelle mondiale; près de 18% de la production totale transite entre zone excédentaire et zone déficitaire. Les plus grands producteurs de blé dans le monde sont l'Union Européenne (25), la Chine, l'ex U.R.S.S, l'Inde et les Etats-Unis (Source FAO statistiques 2004).

✓ l'Union Européenne (25):	136 840 433 tonnes
✓ la Chine:	91 330 265 tonnes
✓ l'ex U.R.S.S:	87 445 442 tonnes
✓ l'Inde:	72 060 000 tonnes
✓ les U.S.A:	58 737 800 tonnes

Actuellement, 580 millions de tonnes de blé sont produites chaque année dans le monde, c'est-à-dire près de 100 kg par habitant, pour l'ensemble de la population mondiale. Les rendements mondiaux ont évolué rapidement durant la deuxième moitié du XX^{ème} siècle, principalement sous l'impulsion des progrès techniques et des innovations apportées au niveau des méthodes de production (automatisation, engrais...).

II. Haplodiploïdisation

II.1. Introduction

L'homme a commencé à améliorer les plantes lorsqu'il s'est sédentarisé, il y a 10 000 ans. C'est le début de l'agriculture. Il cultive les plantes pour son alimentation et pratique alors une sélection en choisissant de manière empirique, de ressemer les plus beaux grains des plantes les plus intéressantes. A la fin du 19^{ème} siècle, l'homme réalise les premiers croisements de parents choisis. L'amélioration des céréales à paille a débuté à la fin du XVIII^{ème} siècle, pour prendre son véritable essor en 1856 avec le principe de la sélection généalogique (de Vilmorin 1856). Depuis, la création variétale des espèces céréalières s'est graduellement enrichie de l'avancée des connaissances en génétique et en biologie. L'avancée des connaissances et les progrès technologiques ont depuis permis l'évolution des méthodes de sélection. Ceci s'est traduit plus récemment par l'intégration des biotechnologies dans les programmes de sélection. Ce sont des outils supplémentaires à la disposition du sélectionneur pour repousser certaines limites rencontrées par les voies classiques de l'amélioration des plantes.

Ainsi l'intégration des méthodes de micropropagation *in vitro*, d'haplodiploïdisation, de marquage moléculaire et de transformation génétique dans les stratégies de sélection ouvre

aujourd'hui de nouvelles perspectives à l'industrie semencière et aux agro-industries. L'intérêt de ces nouveaux outils est particulièrement évident chez le blé dur (*Triticum turgidum subsp.durum* (Desf) Husn.).

Pour des raisons principalement d'ordre alimentaire, l'homme recherche sans cesse le moyen de multiplier les plantes dont il a besoin et de créer de nouvelles variétés. Dans les programmes classiques d'amélioration des plantes annuelles, pour créer une nouvelle variété il faut compter de 8 à 15 ans selon l'espèce.

Avec l'haplodiploïdisation, on peut obtenir directement, c'est à dire en une étape, l'homozygotie et donc multiplier à l'infini (à volonté) ces lignées pures, réduisant ainsi le temps de création variétale et le coût de production d'une nouvelle variété. Elle repose sur l'obtention de plantes haploïdes (n) à partir des organes mâles ou femelles puis sur le doublement du stock chromosomique. Ainsi, le sélectionneur va disposer de plantes diploïdes (2n) homozygotes où l'ensemble du génome est fixé.

II.2. Intérêts de produire des haploïdes doublés

L'haplodiploïdisation est considérée comme l'une des biotechnologies susceptibles d'apporter une contribution très significative à l'amélioration des plantes. L'haplodiploïdisation est non seulement une méthode de fixation rapide des recombinants mais également une méthode très utile pour augmenter l'efficacité de la sélection. Cette technologie permet, en effet, l'obtention plus rapide de lignées pures (en une seule étape au lieu de 7 à 8 générations); le choix de ces lignées est simplifié en raison de l'absence du biais dû à l'hétérozygotie et la réponse à la sélection est accrue. L'haplodiploïdisation permet également de simplifier certaines analyses en génétique quantitative et se révèle être un outil efficace en marquage moléculaire. De plus, cette méthode permet d'observer l'expression aussi bien des gènes récessifs que des gènes dominants. Le choix des lignées haploïdes doublées (HD) est alors moins aléatoire. Ceci est particulièrement intéressant en sélection. Les lignées haploïdes doublées présentent un intérêt certain pour l'amélioration variétale et ce, grâce à leur homozygotie stable et à l'absence de toute interaction allélique.

L'haplodiploïdisation est largement utilisée chez l'asperge, le blé, le colza, l'orge, l'aubergine et le piment. La variété Florin (de Buyser *et al.*, 1987) est l'une des toutes premières variétés au monde qui provient de cette méthode. Elle a été inscrite en 1985, 7 ans après le croisement de départ entre les deux parents. Le blé Florin est encore cultivé actuellement en Belgique. Il est bien adapté au froid et aux terrains lourds. Les haploïdes doublés peuvent aussi servir de matériel de base en vue de faire de l'embryogenèse somatique. Ils peuvent être croisés avec

des plantes diploïdes, on obtient alors des organismes monosomiques qui peuvent avoir certains avantages. Enfin ils peuvent être utilisés pour la transformation génétique en permettant d'obtenir une descendance à 100% transformée. Son utilisation pratique nécessite en premier lieu la maîtrise parfaite des processus d'obtention de ces lignées haploïdes doublées.

Les haploïdes doublés (HD) trouvent aujourd'hui des applications potentielles dans de très nombreux programmes de recherches, en particulier chez les céréales à paille. Les techniques de culture *in vitro* sont souvent utilisées pour produire dans un premier temps des plantes haploïdes puis pour régénérer des lignées haploïdes doublées, qui demeurent en principe génétiquement stables au cours du temps (Powell *et al.*, 1992). Ceci offre une plus grande sécurité dans l'évaluation des effets environnementaux et la possibilité de répéter une expérience de manière réellement comparative sur plusieurs années.

L'amélioration des méthodes de production d'haploïdes doublées est donc importante sur le plan stratégique tant en sélection qu'en génétique plus fondamentale. Ainsi à côté d'une haploïdie spontanée mais rare chez les plantes, il existe aujourd'hui un certain nombre de méthodes, faisant appel aux techniques de culture *in vitro*. Parmi ces méthodes nous avons: l'androgenèse *in vitro*, la gynogenèse *in vitro*, les croisements interspécifique et intergénérique. Toutefois, malgré cette diversité de méthodologies, le blé dur, contrairement au blé tendre, reste encore une espèce récalcitrante à l'haplodiploïdisation.

III. Méthodes d'obtention d'haploïdes

III.1. Androgenèse par culture d'anthères *in vitro* (les plantes "sans mère").

C'est la régénération de plantes entières à partir de culture *in vitro* de cellules sexuelles mâles (grains de pollen immatures), soit par culture de pollen isolé, soit par culture d'anthères.

Les cultures d'anthères (sacs des étamines contenant le pollen) *in vitro*, découvertes il y a maintenant plus de 40 ans (méthode la plus connue) ou androgenèse *in vitro*, sur milieux solides ou en milieux liquides et celles des microspores isolées *in vitro* qui ont vu le jour quelques années plus tard sont les méthodes les plus utilisées dans l'obtention des haploïdes et les plus prometteuses puisque potentiellement chaque microspore pourrait donner un haploïde. Cette dernière - la culture de microspores isolées- beaucoup développée récemment, permet au-delà d'une application plus efficace de l'haplodiploïdisation en sélection, d'envisager de mettre au point des systèmes cellulaires haploïdes élégants ouvrant la voie à des expériences de sélection *in vitro* ou de manipulations génétiques avec des chances de réussite accrues par rapport aux autres méthodes disponibles.

L'androgénèse *in vitro* est une méthode de production d'haploïdes à partir de la culture *in vitro* d'anthères et /ou de microspores isolées. Elle consiste en la prolifération des microspores en embryons puis en plantes haploïdes c'est-à-dire qui ne possèdent qu'un seul jeu de chromosomes, au lieu de deux selon les normes chez les végétaux supérieurs. Ces individus haploïdes sont stériles car, naturellement, ils ne peuvent produire de cellules sexuelles. Un traitement à la colchicine permet cependant de doubler le nombre de leurs chromosomes. On obtient alors des plantes normales, diploïdes fertiles et parfaitement homozygotes. Le doublement du jeu de chromosomes conduit en effet à donner pour chaque gène de la plante deux allèles identiques. Cela permet d'obtenir une lignée pure d'un seul coup, en quelques mois au lieu de passer par huit à dix générations sur des années par les procédés classiques de sélection. Ceci apporte un gain de temps considérable pour le processus de sélection. Bien que les taux de réussite de ces opérations soient encore très bas, le sélectionneur dispose là d'un moyen qui l'autorise à fixer rapidement les produits de son hybridation.

Jusqu'au début des années 1960, la production de plantes haploïdes dans des conditions artificielles était resté impossible. En 1964, [Guha et Maheshwari](#) en Inde, sont arrivés à produire les premières plantes haploïdes de *Datura innoxia* Mill à partir de culture d'anthères sur un milieu artificiel contenant du lait de noix de coco, du miel et quelques éléments minéraux. Ils ont abouti à la régénération de plantes d'origine exclusivement paternelle et ouvrirent ainsi la voie à la production de plantes haploïdes. Un peu plus tard, [Bourgin et Nitsh \(1967\)](#) ont réussi à obtenir des haploïdes de tabac à partir de cultures d'étamines. Et, en particulier, grâce aux travaux de ces deux chercheurs français, la méthode a pu être appliquée à diverses espèces comme le blé, l'orge, le poivron, l'aubergine, le colza, l'asperge, etc...Etant donné l'intérêt de l'haplodiploïdisation pour la production de plantes homozygotes, plusieurs équipes, à travers le monde, se sont alors lancées dans des recherches pour tenter de mettre au point les conditions expérimentales permettant l'obtention *in vitro* d'haploïdes. En 1968, [Nijzeki et Oono](#) réussirent à induire des plantes de riz haploïdes à partir de culture d'anthères. Plus tard, à partir de 1973, plusieurs rapports parurent sur la régénération des céréales : [Picard et de Buyser, \(1973\)](#), [Kasha, \(1974\)](#), [Fedak, \(1977\)](#), [Chen, \(1976\)](#). C'est en 1973 que furent obtenues les premières plantules haploïdes de blé ([Picard et de Buyser, 1973](#)) et en 1975 les premières plantules haploïdes doublées ([Picard et de Buyser, 1975](#)). Depuis lors, de nombreux articles ont paru. En 1985, la première variété androgénétique de blé fut inscrite au catalogue officiel français. Une étude établie par [Picard \(1988\)](#) fait le point sur les résultats obtenus par l'androgénèse, qui offre l'avantage d'une

fixation très rapide du matériel en sélection et par conséquent permet une diminution très sensible du temps dévolu à la création d'une variété. Comme nous l'avons déjà souligné plus haut, le blé Florin (de Buyser *et al.*, 1987) fut une première mondiale initiée par le laboratoire d'Amélioration des Plantes d'Orsay (Dirigé par Mr Demarly) et la première variété haploïde doublée inscrite au catalogue officiel français. Aujourd'hui, de nombreux cultivars, de diverses espèces, issus de ces méthodes d'haplodiploïdisation, sont déposés chaque année sans que personne ne sache s'il s'agit d'un haploïde doublé. Cela signifie que chez les espèces où ça fonctionne cette biotechnologie est devenue un outil routinier.

Le processus d'androgenèse *in vitro* comporte, classiquement, trois phases: l'initiation du phénomène, l'embryogenèse ou la callogenèse et la régénération de plantes entières chlorophylliennes, albina, chimériques ou anthocyaniques. L'ensemble de ces étapes, depuis la mise en culture des explants jusqu'à l'obtention de plantes, prend environ 6 à 10 semaines suivant les espèces. Le rendement androgénétique est exprimé en pourcentage d'embryons et/ou de cals ou de plantes chlorophylliennes par rapport au nombre d'anthères mises en culture. Différents autres paramètres d'appréciation de l'efficacité ont été mis au point par plusieurs auteurs comme le rapport de plantes vertes régénérées (V) sur le rapport de plantes albina régénérées (A) : V/A. Le rendement, (nombre de plantes viables/100 anthères cultivées) est souvent dépendant du cultivar. Certaines variétés de céréales produisent un grand nombre de plantes albina, donc non viables.

Depuis sa découverte chez *Datura innoxia*, l'androgenèse *in vitro* n'a été réussie que chez un nombre relativement réduit d'espèces (200) mais celles ci couvrent en fait une grande partie des espèces cultivées. Mais à l'intérieur d'une espèce l'effet du génotype fournissant les anthères est déterminant dans la réponse androgénétique. Les chromosomes portant des gènes impliqués dans le contrôle de cette réponse ont pu être identifiés. C'est ainsi que des études menées sur le blé tendre ont montré l'existence sur le chromosome 4A de la variété du printemps «Chinese», des gènes qui inhibent l'haploïdie (Shimada et Makino, 1975). D'autres études se sont succédées pour identifier les chromosomes porteurs des gènes contrôlant l'embryogenèse haploïde et la régénération totale (plantes vertes et albina). La réussite de l'androgenèse dépend de nombreux facteurs dont les plus importants sont le génotype, à l'intérieur d'une même espèce, le cytoplasme, l'état physiologique de la plante mère, le stade et l'état des microspores mises en culture et les conditions de culture *in vitro*.

*. Facteurs influençant la réussite de l'androgenèse *in vitro*

a. Génotype et cytoplasme

Comme nous venons de l'annoncer, au sein d'une même espèce, il est fréquent d'observer une grande variabilité génotypique pour l'aptitude à produire des haploïdes. Chez le seigle [Gresshoff et Doy, 1974](#) ont montré que seules 3 lignées sur 43 étudiées répondaient. Chez le riz, ([Guha et Mukherjee, 1973](#)) ont constaté que certains cultivars répondaient mieux que d'autres. Chez le colza, la culture d'anthères donne lieu à des variations importantes des rendements en embryons pour cent anthères suivant le matériel génétique, allant de 0 à 400% ([Renard et Dosba, 1980](#)). De même, chez le blé tendre, ([Anderson et al., 1987](#)), sur une collection de près de 200 variétés et lignées scandinaves, et [Foroughi-Wehr et Zeller \(1990\)](#) sur une cinquantaine de cultivars adaptés également à l'Europe du Nord, ont mis en évidence des fluctuations du rendement androgénétique d'un cultivar à l'autre, avec une nette supériorité des cultivars «Sleipner» et «Florida» dont les génomes sont porteurs de la translocation 1BL/1RS (Blé/Seigle) connue pour son effet très positif sur le rendement androgénétique ([Henry et de Buyser, 1985](#)). [Moeini](#) a montré dans sa thèse publiée en 1997 une variabilité génétique très importante pour tous les paramètres androgénétiques étudiés chez plus de 55 génotypes de blé tendre. Chez le blé tendre ([Picard et de Buyser, 1977](#)) ont montré que les haploïdes doublés obtenus par androgenèse étaient souvent plus embryogènes que les génotypes mères dont ils étaient issus. Plus tard, on démontrait, toujours chez le blé, que l'aptitude à l'androgenèse est un caractère non seulement transmissible en croisement et en autofécondation, mais dont l'héritabilité est suffisamment élevée pour permettre une sélection ([Picard et al., 1990](#)). Elle est la résultante de plusieurs étapes qui sont l'aptitude à l'induction d'embryons, l'aptitude globale à la régénération et l'aptitude à la régénération chlorophyllienne, chacune d'entre elles semblant bien avoir un déterminisme polygénique indépendant. [Barloy et al., \(1989\)](#), [Guha et Maheshwari \(1964\)](#) ont d'ailleurs également démontré que, parmi les haploïdes doublés de maïs obtenus par androgenèse, on pouvait sélectionner des génotypes à haute fréquence de plantes androgénétiques, résultant de la fixation des gènes en cause.

L'aptitude à l'androgenèse est liée aussi à la constitution génétique du cytoplasme et donc à la variabilité génomique des mitochondries et des chloroplastes. [Picard et al., \(1978\)](#) ont démontré pour quelques variétés de blé, l'effet positif de la substitution du cytoplasme *aestivum* par le cytoplasme *timopheevi*, substitution qui aboutissait à une supériorité de rendement androgénétique. De même, [Sagi et Barnabas \(1989\)](#) ont mis en évidence la supériorité en androgenèse des lignées de blé tendre porteuses des cytoplasmes de *Triticum*

aegilopoides, de *Triticum bicornis*, de *Triticu. speltoides*, de *Triticum longissima*, de *Triticum variabilis* ou de *Triticum ventricosa*, par rapport aux lignées isogéniques porteuses du cytoplasme *Triticum aestivum*, ainsi qu'une forte interaction entre le génome nucléaire et le cytoplasme. Les travaux d'Ekiz et Konzak (1991) ne confirment cependant pas toujours ces faits et mettent en évidence des interactions nucléo-cytoplasmiques. Ces résultats sont également en accord avec ceux obtenus par Tsunewaki *et al.*, (1984).

b. Etat physiologique de la plante mère

Les conditions de culture des plantes mères affectent leur état physiologique. Plusieurs travaux ont démontré qu'au cours du processus d'androgenèse, l'état physiologique des plantes mères influence à son tour significativement le rendement en embryons et en plantes haploïdes (Lazar *et al.*, 1990). Les conditions de culture des plantes mères étudiées le plus souvent sont: la température, la photopériode et la nutrition. Ouyang *et al.*, (1983) et Lu *et al.*, (1991) ont constaté par exemple que le rendement androgénétique en plantes chlorophylliennes est meilleur chez les plantes de blé tendre cultivées au champ, quand cela est possible, que chez celles cultivées en serre ou en chambre de culture.

Les conditions de croissance des plantes mères doivent être ajustées de manière très précise pour la réussite de l'androgenèse *in vitro*. Chez les céréales étudiées, les conditions de croissance des plantes mères varient suivant les espèces et aucune règle générale ne peut être dégagée. Cependant, l'influence de la température et de l'intensité lumineuse est un des facteurs les plus importants. Chez le blé, pour le cultivar Jinhong 5, Ouyang *et al.*, (1989) ont démontré que les meilleurs rendements sont obtenus lorsque les plantes mères se développent à une température de 32°C. Bruins et Snijders (1995) obtiennent des résultats satisfaisants avec 3 cultivars croissant sous serre avec une photopériode de 14h de jour/10h de nuit et sous une température de 15°C le jour et 10°C la nuit. Chez le maïs, Mac Donald (1992) a démontré l'impact positif d'une faible température pendant la croissance de l'épi (10°C) sur la production d'embryons haploïdes.

c. Stade et état des microspores mises en culture *in vitro*

*** Rappel sur la gamétogenèse mâle et femelle chez le blé**

Nous rappelons ici les principes d'une gamétogenèse mâle et femelle chez le blé.

1. Gamétogenèse mâle

Deux phases peuvent être distinguées dans le développement des gamétophytes mâles: la microsporogenèse et la palynogenèse. La première comprend le cycle méiotique et la formation des microspores individualisées, tandis que la seconde correspond à la transformation de la microspore en grains de pollen tricellulé. Chez d'autres espèces, il est bicellulé.

Dans sa phase juvénile, l'anthère est formée d'un petit massif de cellules méristématiques entouré d'un épiderme. Les cellules sous-épidermiques qui constituent les archéspores produisent par division péricline une cellule pariétale sous-épidermique et une cellule sporogène interne. Les cellules sporogènes se multiplient par des mitoses successives qui vont augmenter la taille de l'anthère. Elles sont à l'origine des microsporocytes ou cellules mères des microspores.

a. Microsporogenèse

Au cours de la préméiose, les microsporocytes ont une structure de cellules méristématiques. Au cours de cette phase, l'activité métabolique des microsporocytes est très intense ([Souvré *et al.*, 1987](#)). Le cytoplasme synthétise tous les composés biochimiques majeurs, mais peut aussi commencer à accumuler les glucides insolubles. Cette période d'activité biochimique intense est sensible aux stress et le cas échéant la formation du pollen peut être altérée ([Dickinson, 1992](#)).

Dès le début de la méiose, entre la paroi pecto-cellulosique qui va bientôt disparaître et le plasmalemme, une paroi spéciale essentiellement de nature callosique (β 1-3 glucanes s'édifie graduellement et va isoler les cellules mères des microspores). C'est à l'intérieur de cette paroi caractéristique de la méiose chez les plantes supérieures que le microsporocyte va se diviser.

Chez la plupart des Monocotylédones, la première division méiotique conduit à la formation d'une dyade ([figure 3](#)) dont les deux éléments sont séparés par une plaque cellulaire I et la seconde division qui forme la tétrade conduit à la mise en place des plaques cellulaires II. Les plaques cellulaires I et II rattachées à la paroi spéciale sont également de nature callosique.

La formation de tétrades de microspores à la fin de la méiose marque le début de la phase gamétophytique chez les plantes supérieures.

Lorsque la jeune exine est formée autour de chaque future microspore, la paroi callosique se dégrade sous l'influence d'une callase et les jeunes microspores sont alors libérées dans le sac pollinique (Albertini *et al.*, 1987). Chez les Poacées, (comme le blé) elles resteront rattachées au tapis par un pôle. Dès la libération des jeunes microspores, on peut observer les apertures (zone où l'exine est très mince ou incomplète) ou zone germinative du tube pollinique. Chez les Poacées, les microspores ont une seule ouverture sous la forme d'un pore.

b. Palynogenèse

b.1. La microspore

Les microspores fraîchement libérées ont un cytoplasme dense et un noyau central. Depuis ce stade jusqu'à la première mitose pollinique, des petites vacuoles vont se former puis le noyau de la microspore va se déplacer dans le cytoplasme. Il prend tout d'abord une position latérale suite à la fusion des petites vacuoles en une grande vacuole qui repousse le noyau à un pôle de la microspore. Dans la phase terminale, sous l'exine qui devient plus dense consécutivement à de nouveaux dépôts de sporopollénine, la seconde partie du sporoderme, l'intine se met en place. Celle-ci est essentiellement formée de composés pecto-cellulosiques auxquels s'associent des protéines. Selon la position du noyau et l'état de la vacuolisation, la microspore est dite :

- microspore uninucléée jeune lorsque le noyau est central;
- microspore uninucléée moyenne lorsque le noyau prend une position plus latérale. Chez le blé la vacuolisation débute à ce stade (He et Ouyang, 1984) ou,
- microspore uninucléée tardive lorsque le noyau atteint le pôle de la microspore. Chez le blé il s'agit du pôle opposé au pore; la vacuole occupant une grande partie de la microspore (He et Ouyang 1984). Par la suite la grande vacuole se divise en petites vacuoles qui se situent au pôle opposé au noyau. Ce stade est également nommé stade uninucléé tardif par ces auteurs, il précède de peu la première mitose pollinique.

b.2. Le grain de pollen

A la maturité le noyau haploïde subit la première mitose pollinique qui conduit à la formation de noyau végétatif et du noyau reproducteur. Elle est suivie d'une cytokinèse asymétrique. Une paroi transitoire se construit entre les deux noyaux. Elle isole ainsi une petite cellule reproductrice (figures 3 et 4) de la cellule végétative qui occupe la majeure partie de l'ancienne microspore. Le gamétophyte mâle ou grain de pollen est alors formé. Ce stade est parfois appelé microspore binucléée jeune.

Sangwan et Sangwan-Norreel, (1987) soulignent que, contrairement aux espèces récalcitrantes, chez les espèces présentant une bonne aptitude à l'androgenèse, les jeunes grains de pollen sont riches en proplastides et dépourvus d'amyloplastides; ces derniers se formeront seulement après la seconde mitose pollinique. Dans le même temps, la jeune cellule reproductrice va subir de nombreux changements. La paroi qui sépare la cellule reproductrice de la cellule végétative va se lyser et se détacher de l'intine. La cellule reproductrice va alors migrer dans le cytoplasme végétatif et les plasmalemmes des deux cellules ne seront alors séparés que par un mince espace. La cellule reproductrice qui flotte dans la cellule végétative prend alors une forme sphérique qui rapidement évolue vers une forme ovoïde parfois allongée et en croissant. Ce stade est parfois appelé microspore binucléée tardive.

Chez le blé comme chez toutes les Poacées, le noyau de la cellule reproductrice va dupliquer rapidement son ADN et subir la seconde division pollinique (mitose spermiqque). Les deux cellules spermiqques de forme allongée ou en croissant (cellules gamétiques ou gamètes) restent à proximité du noyau végétatif (figure 4). L'ensemble forme l'unité germinale mâle. Le grain de pollen termine sa maturation avant l'ouverture de l'anthère. Quelques jours avant la déhiscence, l'anthère n'est plus alimentée du fait de la nécrose des tissus conducteurs du filet de l'étamine. La maturation de l'anthère s'accompagne d'une perte d'eau et de la déshydratation du pollen; simultanément les parois radiales de l'endothélium s'épaississent. L'association des deux phénomènes conduit à la rupture de la paroi de l'anthère et à la libération du pollen (Cresti *et al.*, 1992). Lorsqu'il est émis à l'extérieur de la loge pollinique, le pollen a une durée de vie qui, certes, dépend des conditions atmosphériques, mais est généralement relativement courte (de l'ordre de quelques heures).

2. Gamétogenèse femelle

a. La mégasporogenèse

Au début du développement de l'ovule, une cellule du nucelle, l'archéspore, se divise en une cellule pariétale située du côté du micropyle, qui va dégénérer rapidement, et en une cellule sporogène plus interne qui subit la méiose.

La cellule sporogène se transforme rapidement en mégasporocyte (encore appelée cellule mère des mégaspores). Elle est de grande taille avec une forme allongée, un cytoplasme dense et un noyau proéminent. La méiose conduit le plus souvent à la formation d'une tétrade alignée (figure 4), formée des 4 mégaspores haploïdes enfermées dans une paroi mince de callose apparue au début de la méiose, similaire à celle observée autour du microsporocyte, lorsque les caryocinèses sont immédiatement suivies de cytokinèse. On observe une dédifférenciation- redifférenciation des organites cytoplasmiques un peu similaire à celle notée chez les microsporocytes.

b. La formation du sac embryonnaire ou mégagamétogenèse

La première division de la mégaspore sépare la cellule en deux domaines; le domaine micropylaire et le domaine opposé ou chalazien, les deux domaines seront ensuite séparés par une vacuole. Après les trois cycles de division et une augmentation de taille importante, chaque pôle du sac embryonnaire juvénile contient quatre noyaux de part et d'autre et une grande vacuole centrale. La cellularisation conduit à la formation du mégagamétophyte qui comprend :

- trois petites cellules au pôle chalazien, les antipodes,
- une large cellule centrale contenant deux noyaux, les noyaux polaires et
- trois petites cellules au pôle micropylaire

Les trois cellules micropylaires vont se différencier pour former l'appareil femelle (l'oosphère ou gamète femelle et deux synergides) et dans le même temps les noyaux polaires, tendent à fusionner et se rapprochent de l'oosphère (figure 5). L'ensemble oosphère, synergides et cellule centrale constituant selon plusieurs auteurs (Huang et Russell, 1992) l'unité germinale femelle analogue de l'unité germinale mâle.

3. Fécondation et formation d'embryon

Après la déhiscence de l'anthère, le grain de pollen est transporté par différents moyens (par le vent dans le cas du blé). Lorsque le grain de pollen est sur le stigmate, il germe après s'être rapidement réhydraté au contact des composés stigmatiques. La cellule végétative assure la croissance du tube pollinique dans les tissus femelles jusqu'au sac embryonnaire. Le tube pollinique pénètre dans une synergide et son extrémité éclate libérant les cellules spermiques. Le noyau végétatif pollinique dégénère rapidement. Les cellules spermiques prennent alors une forme plus sphérique avant de migrer vers l'oosphère pour l'une et vers la cellule centrale pour l'autre. Un phénomène de reconnaissance cellulaire entre les plasmalemmes est vraisemblablement impliqué dans l'orientation des cellules spermiques. Les membranes vont fusionner et les noyaux spermiques injectés dans l'oosphère et la cellule centrale vont finalement fusionner avec les noyaux de ces cellules: c'est la caryogamie de la double fécondation caractéristique des Angiospermes (figure 6). L'oosphère fécondée forme l'œuf principal ou zygote (2n) et la cellule centrale fécondée forme l'albumen (3n).

De très nombreux travaux ont montré que le stade de la gamétogenèse pour la mise en culture des anthères est un facteur important pour la réussite de l'androgenèse. Chez la majorité des espèces, le stade optimal des microspores pour la mise en culture des anthères correspond au stade microspore uninucléé vacuolisée. Cependant, des variations par rapport à ce stade existent. Chez quelques espèces comme *Nicotiana tabacum* le stade optimal correspond au début du stade binucléé (Heberle-Bors et Reinert 1977, 1979), ou encore chez *Brassica napus* le stade optimum est le stade uninucléé tardif. Pour les céréales, le bon stade de mise en culture des anthères est toujours le stade microspore uninucléé vacuolisée (Ouyang *et al.*, 1973; Wang *et al.*, 1973; Picard et de Buyser, 1977; Pan et Kao, 1978; Foroughi-Wehr *et al.*, 1982; Wei, 1982; He et Ouyang, 1984; Mejza *et al.*, 1993; Ouyang *et al.*, 1993; Touraev *et al.*, 1996b). Chez le maïs, les épis sont prélevés lorsque les anthères contiennent des microspores au milieu du stade uninucléé (Barloy et Beckert, 1993) ou au stade uninucléé tardif (Pace *et al.*, 1987). En 1993, Daniel a démontré une large influence du génotype chez le maïs et recommande le stade binucléé précoce pour un certain nombre de génotypes.

Le stade des microspores, au moment de leur mise en culture, conditionne aussi le niveau de ploïdie des plantes androgénétiques produites chez plusieurs espèces comme, par exemple, chez *Nicotiana tabacum* (Engvild 1974), chez *Hyoscyamus niger* (Corduan 1975), chez le blé et le triticales (Hassawi et Liang, 1990), chez le pétunia et le blé tendre (Raquin *et al.*, 1982).

A part l'effet du stade, le phénomène du dimorphisme pollinique a fait l'objet de nombreuses investigations pour établir une corrélation entre ce phénomène et le rendement androgénétique. Le dimorphisme pollinique est caractérisé par la présence, au sein des anthères, de deux populations de grains de pollen (microspores) dont l'une est composée de pollens normaux et l'autre de pollens anormaux cytologiquement reconnaissables, appelés «P-grains». Ces derniers ont été suspectés de correspondre à la population apte à l'androgenèse (Sunderland 1974). Les «P-grains» sont observables chez les anthères matures (Dale 1975, Horner et Street, 1978, Sunderland 1974). Des travaux sur le tabac ont montré que le passage par la culture *in vitro* n'augmente pas la fréquence des «P-grains» (Heberle-Bors 1985). Les «P-grains» représentent donc une forme particulière de stérilité mâle provoquée par une gamétogenèse anormale des cellules mères des microspores. Mais une corrélation nette entre les fréquences de «P-grains» et le nombre d'embryons obtenus *in vitro* n'a pas été établie. Par contre, on a pu proposer leur présence, chez le blé, comme critère d'aptitude à l'androgenèse (Picard *et al.*, 1990).

d. Conditions de culture *in vitro* des anthères

Tous les milieux de culture d'anthères contiennent des éléments inorganiques et des éléments organiques. Depuis, un grand nombre de combinaisons de ces éléments ont été essayées et de nombreux travaux ont été réalisés sur l'influence des éléments inorganiques tels que, les ions NO_3^- ou NH_4^{++} ou les éléments organiques tels que les sucres, les acides aminés; les acides organiques, les vitamines. Comeau *et al.*, (1992) ont travaillé avec des milieux composés de plus d'une cinquantaine de produits différents. D'autres facteurs tels que l'état physique du milieu qui peut être solide, semi-liquide ou liquide, son pH, la température d'incubation, la luminosité, le photopériodisme, l'humidité relative de la chambre de culture ont tous été étudiés et on a pu démontrer leur influence sur les processus *in vitro*.

III.2. Culture *in vitro* des microspores isolées

La culture *in vitro* des microspores isolées (ou jeunes grains de pollen) est actuellement la méthode la plus utilisée pour l'obtention d'haploïdes chez plusieurs espèces.

Les méthodes de cultures de microspores isolées, initialement mises au point chez le tabac (Nitsch 1974; Nitsch et Gautheret, 1974; Heberle-Bors et Reinert, 1979) et le colza (Chuong et Beversdorf, 1985), ont fait l'objet des recherches les plus actives. Ces méthodes conduisent à l'établissement de cultures de microspores obtenues après diverses techniques de broyage

des anthères, suivies de filtrations et de centrifugations. D'autres études (Mejza *et al.*, 1993) ont montré qu'une production plus importante de plantes vertes était possible, en obtenant des HD à partir de microspores de blé isolées et cultivées en milieu liquide.

L'androgenèse par culture *in vitro* d'anthères a été la première voie d'obtention d'haploïdes *in vitro*. Plus tard la culture *in vitro* de microspores isolées a été mise au point chez des espèces comme le colza, l'orge et le blé tendre chez lesquelles différentes études ont permis d'optimiser la plupart des paramètres de culture pour permettre l'obtention d'un grand nombre de plantes vertes (Hu *et al.*, 1999; Jahne-Gartner *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002). Le blé dur reste par contre l'une des espèces cultivées de la famille des Poacées la plus récalcitrante à l'androgenèse *in vitro*, avec une faible induction en embryons haploïdes, une régénération difficile des plantules à partir des embryons mis en culture sur le milieu de régénération MS sans hormones et un taux de plantes albina très élevé (Ghaemi *et al.*, 1993; Saidi *et al.*, 1997; Picard *et al.*, 1998; J'Aiti *et al.*, 2000). Concernant la culture *in vitro* de microspores isolées de blé dur, peu de recherches ont été publiées.

La culture de microspores isolées est une des méthodes de production de plantes haploïdes et de lignées haploïdes doublées (HDs). Ces dernières sont des outils précieux en sélection et en recherche fondamentale (Picard *et al.*, 1994). La culture de microspores isolées est la méthode la plus performante et celle qui a le plus de potentialités (Souvré *et al.*, 1995). Plusieurs auteurs ont signalé l'importance de la culture de microspores isolées dans la production de plantes haploïdes doublées après dédoublement de leur stock chromosomique, principalement en gain de temps et en coût (Hu *et al.*, 1986; Hu, 1997).

Les méthodes de culture de microspores isolées se sont développées au cours des années 1990. Les principaux avantages des microspores isolées peuvent être résumés comme suit. Ce sont des systèmes de cultures monocellulaires (free-living cell), haploïdes et à faible polymorphisme. Les microspores ne sont plus soumises aux contraintes des parois des anthères et, de ce fait, sont soustraites à une partie des effets dus à la plante mère. Les microspores constituent un matériel de choix pour le transfert de gènes (Jähne *et al.*, 1995). En général, cette méthode donne de meilleurs résultats que la culture d'anthères. Sur le plan pratique, la culture de microspores isolées réduit donc les coûts de production des HDs par un allègement substantiel de la phase de mise en culture. Elles sont largement appliquées chez le colza, l'orge (Jahne-Gartner *et al.*, 1999), le blé tendre (de Buyser *et al.*, 1998). Chez le blé dur cette méthode est en cours d'étude et fait l'objet de notre thèse (Picard *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1999; Holme *et al.*, 1999; J'Aiti *et al.*, 2000; Labbani *et al.*, 2004; Labbani *et al.*, 2005; Labbani *et al.*, 2006; Labbani *et al.*, 2007 «*in press*»).

Chez le maïs, les premières cultures de microspores isolées ont été réalisées par Nitsch en 1977. Les premiers succès de régénération de plantes par ce système ont été obtenus par Coumans *et al.*, (1989) et par Pescitelli *et al.*, (1989).

Chez le riz, de nombreux travaux ont été entrepris à partir de culture d'anthères ou de microspores isolées (Chen 1986; Cho et Zapata, 1988; Matsushima *et al.*, 1988; Raghavan 1988; Xie *et al.*, 1995). Dans tous les cas, le taux d'embryogenèse est très faible et le nombre de plantes albina est très élevé. Ainsi, dans cette espèce, le type de culture ne semble pas influencer clairement la régénération de plantes chlorophylliennes.

Chez le seigle, l'utilisation de culture de microspores isolées a permis l'obtention de plantes androgènes albina et chlorophylliennes pour le génotype SC35; alors que la culture d'anthères n'a produit que des plantes albina (Rakoczy-Trojanowskz *et al.*, 1997). Dans cette espèce, malgré le faible nombre de travaux, il semble donc que la culture de microspores isolées est plus adaptée.

Chez l'orge, les deux systèmes ont été développés en parallèle, bien que la culture de microspores soit privilégiée par certains auteurs pour des raisons d'efficacité (Hoeskra *et al.*, 1992; Davies et Morton, 1998).

D'autre part, en ce qui concerne la recherche, les techniques de microspores isolées permettent de placer celles-ci dans des conditions beaucoup plus uniformes de nutrition par rapport au milieu que dans l'anthère où il était fréquent d'observer des effets position. En conséquence, le modèle «microspores isolées» est celui qui rendra possible des expériences de sélection *in vitro* sans ambiguïté pour des caractères exprimés précocement *in vitro* au stade gamétophytique. Un autre avantage, en recherche, est que les microspores isolées ouvrent la voie à des études cellulaires, cytologiques et moléculaires des processus de réorientation des microspores et d'induction androgénétique (Touraev *et al.*, 1995; Touraev *et al.*, 1996a,b,c). Enfin, le modèle «microspores isolées», très analogue aux modèles de «cellules isolées» ou «protoplastes» devrait faciliter les expériences de transformation génétique des plantes au niveau haploïde, par la voie balistique ou par électroporation, tout en évitant une phase trop longue de conversion des embryons en plantes entières, génératrice de vitro-variations somaclonales (on parle de "gamétoclonales" dans ce cas) (Creissen *et al.*, 1990). Celles-ci sont en effet couramment observées dans le cas où on est obligé d'établir au préalable des souches embryogènes pour avoir des protoplastes ou des massifs cellulaires aptes à la régénération et donc à la transformation. Par ailleurs, l'insertion du transgène ne se fait pas en situation hémizygote puisque la cible est haploïde. On pourra par ailleurs fixer par doublement du nombre chromosomique le site transformé.

*. Conditions de réussite

Un nombre important de paramètres entrent en jeu pour la réussite de la culture de microspores isolées, comme par exemple les conditions de croissance des plantes mères, le stade de développement des microspores au moment de leur extraction, les conditions de culture (densité des microspores, milieu, hormones). Le stade des microspores est souvent le même que celui observé pour les cultures d'anthères comme, par exemple, chez les céréales (Datta et Wenzel, 1987; Kasha *et al.*, 1990). On a démontré aussi qu'il existait une sensibilité des microspores, au cours des 24 premières heures de culture, vis-à-vis d'éléments toxiques sécrétés par elles-mêmes dans le milieu de culture.

Les comparaisons entre culture d'anthères et culture de microspores isolées ne sont possibles que si on a traduit le nombre d'anthères mises en culture par un nombre correspondant de microspores contenues dans celles-ci. Hoeskra *et al.*, (1992) ont montré ainsi, au cours d'une étude comparative entre les deux méthodes: culture d'anthères (CA) et culture de microspores isolées (CMI), menée chez le cultivar «Igri» (*Hordeum vulgare* L.), qu'il était possible d'obtenir 6,5 fois plus d'embryons et une amélioration de 40 à 50% du taux de régénérations chlorophylliennes avec la méthode des microspores isolées. Chez l'orge, (Ziauddin *et al.*, 1990; Kasha *et al.*, 1990) obtiennent 0,12 à 0,4 % d'efficacité des CMI en plantes en supposant que les anthères contiennent 2 500 microspores, ce qui est 4 à 5 fois supérieur à la CA. Chez le maïs, les pourcentages en CA ou CMI sont sensiblement les mêmes: 0,02 à 0,36 % des microspores sont induites (Gaillard *et al.*, 1991; Pescitelli *et al.*, 1990) et 10 % des embryons régénèrent une plante. Récemment Liu *et al.*, (2002), ont montré l'efficacité de l'obtention des plantes chlorophylliennes chez le blé tendre par l'utilisation de la méthode de culture de microspores isolées.

III.3. La Gynogenèse ou culture d'ovaires *in vitro* (plantes "sans père").

Elle consiste à mettre en culture *in vitro* des ovaires ou des ovules non pollinisés, pour la production de plantes haploïdes. Pour la première fois en 1976, le laboratoire d'amélioration des plantes d'Orsay obtient chez l'orge des plantes haploïdes qui étaient uniquement d'origine maternelle (culture d'ovaires d'orge non fécondés), (San Noeum, 1976). Depuis, d'autres plantes haploïdes issues de la gynogenèse ont été produites chez d'autres espèces par exemple chez le tabac et le blé tendre (Zhu et Wu, 1979; Zhu *et al.*, 1981), chez le riz (Asselin de Beauville 1980; Kuo, 1982), chez la maïs (Yang et Zhou, 1982), le Gerbera (Cagnet-Sitbon, 1980), la laitue, le tournesol, la pastèque, le pommier, le triticale, la betterave à sucre.....

Cette méthode est moins utilisée. Elle est souvent utilisée chez les espèces qui sont récalcitrantes à l'androgénèse car ce processus ne donne qu'un très faible taux de régénération albina, du fait que les plantes haploïdes régénérées sont d'origine uniquement maternelle.

III.4. Les croisements interspécifiques et intergénériques: (est une technique de gynogénèse).

L'hybridation interspécifique constitue une autre méthode de production des HD. Elle a été découverte par [Peloquin](#) (d'après [Picard et al., 1994](#)). Le premier haploïde de céréale a été observé en 1926 à Cambridge par [Gains et Aase \(1926\)](#). Il provenait d'un croisement interspécifique entre *Triticum compactum* et *Aegilops cylindrica*.

On peut obtenir des haploïdes après croisements entre espèces ou entre genres. En fécondant un ovule d'une espèce donnée par le pollen d'une autre espèce, souvent sauvage et proche, il y a fécondation, mais les chromosomes incompatibles du parent pollinisateur sont rejetés naturellement. On observe le développement d'un embryon haploïde. Une phase de sauvetage d'embryons *in vitro* est ensuite généralement nécessaire, sinon l'embryon dégénère et meurt car il n'y a pas d'albumen fonctionnel dans le grain, parce qu'il n'y a pas eu de double fécondation. Mis en culture sur des milieux particuliers, l'embryon haploïde va se développer, les tissus vont se différencier pour donner des plantes haploïdes. Le plus bel exemple d'utilisation de cette méthode qui a déjà rendu de grands services à la sélection, est sans doute le croisement interspécifique de l'orge avec l'orge bulbeuse (*Hordeum bulbosum*). Découvert partiellement en France par [Cauderon et Cauderon \(1956\)](#) au cours de croisements *Hordeum bulbosum* x *Hordeum secalinum* donnant des secteurs haploïdes, le phénomène d'élimination chromosomique dû au croisement avec *Hordeum bulbosum* ne sera élucidé que plus tard. Il faut attendre en effet les travaux de [Lange \(1968\)](#), puis de [Kasha et Kao \(1970\)](#) pour que soit mise en évidence la possibilité d'obtenir de nombreux haploïdes à partir du croisement *Hordeum vulgare* x *Hordeum bulbosum*.

C'est une méthode largement utilisée chez l'orge, (*Hordeum vulgare* X *Hordeum bulbosum*) ([Kasha et Ko, 1970](#)), mais également chez le blé et la pomme de terre (*Solanum tuberosum* X *Solanum phureja*). Cette méthode a un taux de réussite bien meilleur que l'androgénèse et est moins difficile à mettre en œuvre. Elle a conduit, après doublement du stock chromosomique, à l'obtention de variétés d'orge qui sont maintenant sur le marché. Mais très souvent la réussite du croisement se heurte à la difficulté, pour l'embryon de se développer dans l'ovaire. Les travaux de [Laurie et Bennett \(1988\)](#), ont fait apparaître une autre manière de produire des HD chez le blé, par croisement interspécifique avec le maïs.

IV. Comparaison des différentes méthodes d'haplodiploïdisation décrites

L'androgénèse (culture *in vitro* d'anthères et /ou culture *in vitro* de microspores isolées) est la méthode la plus utilisée car elle offre un effectif élevé d'unités (microspores) par fleur, à raison de 3 000 microspores par anthère soit 9 000 microspores par fleur chez le blé. Ainsi au sein d'une fleur de blé pour un sac embryonnaire (contenant une oosphère), on aura 9 000 microspores, ce qui confère à cette technique un potentiel de production de plantes haploïdes par fleur nettement supérieur à celui de la gynogénèse ou des croisements interspécifiques ou intergénériques pour une quantité de travail guère supérieure. Chez les Solanacées et les Crucifères, ceci est encore plus vrai, puisque le nombre de microspores par anthère est de plusieurs dizaines de milliers.

Les croisements interspécifiques ou intergénériques et la gynogénèse nécessitent la même expertise en culture *in vitro*. Mais, l'effectif de plantes produites par ces méthodes est obligatoirement limité par le nombre d'ovules et donc de sacs embryonnaires disponibles par fleur ou inflorescence. La gynogénèse est un processus plus simple que l'élimination chromosomique qui nécessite plus de travail, car il faut entretenir, à la fois, le parent mâle et le parent femelle, faire les croisements avec tous les problèmes d'incompatibilité ou de viabilité pollinique que cela pose. Toutes les plantes issues des méthodes de gynogénèse *in vitro* ou induites par des croisements interspécifiques ou intergénériques sont pour la plus grande majorité haploïdes et chlorophylliennes. Cependant, quelques plantes obtenues en croisement intergénérique peuvent avoir intégré une partie du génome du parent mâle, ce qui pourrait entraîner, dans les descendances, des anomalies cytogénétiques. Donc, théoriquement, la gynogénèse *in vitro* est une méthode plus intéressante que les croisements interspécifiques ou intergénériques. Mais, comme dans la pratique elle est peu maîtrisée, ce sont les méthodes conduisant à l'élimination chromosomique qui sont le plus employées quand l'androgénèse ne fonctionne pas. Cependant, chez certaines espèces comme *Allium cepa*, il est apparu intéressant de provoquer une gynogénèse *in vivo* par pollinisation par du pollen irradié, puisqu'il n'existe pas d'autres méthode d'haplodiploïdisation (Doré et Marie 1993).

En ce qui concerne le niveau de ploïdie des plantes produites par ces différentes méthodes, le taux de plantes haploïdes est souvent égal à 100 % dans le cas de la gynogénèse, de l'ordre de 90 à 100% dans le cas des croisements interspécifiques et de l'ordre de 0 à 70 % dans le cas de l'androgénèse (Picard *et al.*, 1994). Dans le cas de l'androgénèse, les pourcentages de plantes diploïdes spontanées varient considérablement et on observe en plus un pourcentage de plantes aneuploïdes qui peut varier de quelques unités à plusieurs dizaines pour cent

plantes. Il faut donc procéder à des analyses cytologiques, telles que le comptage chromosomique ou l'observation de la taille des stomates, pour chaque plante, ce qui rend l'androgenèse plus lourde que les autres méthodes où on est sûr, a priori, du niveau de ploïdie des plantes (Picard *et al.*, 1994). Cependant, les techniques de cytométrie de flux permettent d'estimer de plus en plus rapidement le niveau de ploïdie et les méthodes de cultures de microspores isolées produisent plus de plantes haploïdes que les cultures d'anthères (Picard *et al.*, 1994).

L'androgenèse, avec notamment les méthodes de culture de microspores isolées, reste donc la voie de production de plantes haploïdes la plus utilisée, suivie des croisements interspécifiques ou intergénériques, et très loin derrière, arrive la gynogenèse *in vitro* et enfin, les systèmes inducteurs. Les cultures de microspores isolées, comme nous l'avons décrit, apportent, quant à elles, une simplification très sensible du processus de l'androgenèse.

Mais l'androgenèse n'est pas applicable à toutes les espèces. Pour pallier cette difficulté, on a eu recours à la gynogenèse.

V. La question des marqueurs de l'embryogenèse haploïde et de la production d'embryons

En dehors du colza, très peu d'études ont été réalisées chez les plantes y compris une comparaison avec le processus de l'embryogenèse zygotique (Yeung *et al.*, 1996).

La détermination précoce des marqueurs de la voie gamétophytique et de la voie sporophytique pourrait permettre de définir le processus d'activation et /ou d'inhibition de la réorientation du développement des microspores de la voie gamétophytique vers la voie sporophytique sous l'action des stress (Testillano *et al.*, 2000; Seguí *et al.*, 2003, 2005; Ramírez *et al.*, 2004).

L'étude de base du processus de l'embryogenèse *in vitro* chez les plantes de grand intérêt économique et plus particulièrement chez les espèces récalcitrantes est très limitée et demeure non définie jusqu'à nos jours (Barany *et al.*, 2005). La compréhension des événements cellulaires ayant lieu durant les premiers stades de l'induction embryonnaire est nécessaire pour augmenter la compréhension des mécanismes contrôlant la réorientation et la progression de l'embryogenèse. Ceci pourrait aider l'efficacité du processus constituant une stratégie directe principalement chez les plantes d'intérêt agronomique. La recherche des marqueurs cellulaires et moléculaires pendant les premiers stades de l'embryogenèse est d'une grande importance en recherche fondamentale principalement chez les espèces récalcitrantes.

VI. Marquage de l'aptitude à l'haploïdie

Devant la variabilité génétique et spécifique de l'aptitude à répondre *in vitro*, des hypothèses ont été émises par certains auteurs. Ainsi [Sangwan et Sangwan-Norreel \(1987\)](#) ont montré que le caractère récalcitrant ou favorable à l'androgenèse des espèces peut être marqué par la dédifférenciation plus ou moins précoce des proplastes en amyloplastes au cours de la gamétogenèse mâle. Les espèces connues comme étant favorables à l'haploïdie *in vitro* n'accumulent de l'amidon dans leur pollen qu'au stade bi-cellulé; alors que ceci se passe très précocement chez les espèces récalcitrantes, les amyloplastes étant observables pendant toute la gamétogenèse. Ces organites cytoplasmiques sont connus pour ne pas pouvoir se dédifférencier *in vitro*. Un autre exemple: chez le maïs, la corrélation entre la synthèse d'une protéine de 32 kd et l'aptitude à répondre en androgenèse a été mise en évidence ([Vergne et al, 1993](#)). Elle est induite par le prétraitement au froid des panicules avant leur mise en culture.

En raison de leur réponse positive en régénération en plantes haploïdes *in vitro*, l'orge (*Hordeum vulgare* L.), le colza (*Brassica napus* L.), le tabac (*Nicotiana* spp) et plus récemment le blé hexaploïde (*Triticum aestivum* L.) sont considérés comme des espèces modèles dans l'étude des mécanismes d'induction de l'androgenèse sous l'action des stress ([Touraev et al., 1997](#)). Ces espèces offrent la possibilité d'identifier des gènes impliqués dans l'induction de l'androgenèse *in vitro* et pour le développement des marqueurs moléculaires. Récemment des études moléculaires et morphologiques ont été faites chez d'autres espèces comme le maïs (*Zea mays*) [Magnard et al., \(2000\)](#) et le poivre (*Capsicum annum* L) [Barany et al., \(2001\)](#). Cependant seulement un faible nombre de gènes ont été identifiées jusqu'à présent ([Maraschin et al., 2005a](#)).

VII. Y a-t-il un rôle de la mort programmée cellulaire durant l'androgenèse ?

La mort programmée cellulaire est un mécanisme génétiquement contrôlé. Il concerne la destruction organisée ou spécifique de types de cellules ou de tissus ([Lam, 2004](#)). C'est un phénomène nécessaire au bon déroulement de l'organogenèse animale par exemple. Néanmoins le rôle de la mort programmée cellulaire durant l'androgenèse n'a été exploré que récemment. Les études faites sur l'androgenèse chez l'orge indiquent que la mort programmée cellulaire prend place à deux niveaux : au cours de l'induction de l'androgenèse sous l'effet de stress et au cours du développement des structures multicellulaires en embryons.

Pendant l'induction androgénétique, la mort programmée des cellules est stimulée chez les microspores non gonflées, cependant celles de grande taille sont amenées à l'induction de

divisions cellulaires. La plupart des stress déclenchant l'androgenèse peuvent induire la mort programmée (Lam, 2004).

VIII. Les limites de l'androgenèse

VIII.1. Le cas des espèces récalcitrantes

Malgré les résultats parfois spectaculaires de l'androgenèse ou des microspores isolées, il existe des espèces qui restent récalcitrantes à l'androgenèse ou dont la réussite est partielle ou faible, voire nulle. C'est le cas par exemple du blé dur. Chez cette espèce, la phase d'induction et de production des embryons se passe en général comme chez les espèces non récalcitrantes tout au moins pour certains génotypes comme pour le cultivar Jennah Khetifa (Labrani *et al.*, 2005; Labrani *et al.*, 2007 «*in press*») mais les problèmes apparaissent surtout pendant la phase de régénération où les embryons, pour la majorité des génotypes, ne régénèrent que des plantes albina ou des racines. Par exemple, seules une ou deux plantes vertes avaient été obtenues par Foroughi-Wehr et Zeller, (1990) sur quatre variétés de blé dur. Mihamou-Ziyyat (1992) sur une étude assez extensive (une collection de 127 lignées de blé dur), a montré qu'il n'existe néanmoins chez cette espèce qu'un petit nombre de lignées (environ 10 %) aptes à donner en androgenèse *in vitro* des plantes chlorophylliennes. Leurs performances sont alors tout à fait comparables à celles des génotypes de blé tendre embryogènes. Au total, plus d'une cinquantaine de plantes haploïdes vertes ont ainsi été produites. Mais avant que les méthodes d'androgenèse *in vitro* soient mises au point sur le blé dur, ce sont les méthodes faisant appel aux croisements intergénériques, notamment avec le maïs, qui permettront d'obtenir des haploïdes doublés chez cette espèce. Les premières études faites au laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale Haploïde d'Orsay (MVEH) ont montré un faible taux de régénération de plantes chlorophylliennes (résultats non publiés) chez l'espèce blé dur. Mais plus récemment des travaux réalisés sur des cultivars de (*Triticum turgidum subsp.durum* (Desf) Husn.) par la méthode de culture *in vitro* de microspores isolées ont montré par contre qu'on peut obtenir des plantes haploïdes chlorophylliennes sous l'action des prétraitements. Sur 100 embryons mis en culture, cinq plantes chlorophylliennes sont régénérées. Leurs performances sont alors tout à fait comparables à celles obtenues par le cultivar modèle hexaploïde (Labrani *et al.*, 2005).

VIII.2. Aptitude à l'androgénèse

Devant la variabilité génétique et spécifique de l'aptitude à répondre *in vitro*, des investigations ont été portées sur les possibilités de repérage à l'aide de marqueurs cytologiques ou moléculaires de cette aptitude. Ainsi Sangwan et Sangwan-Norreel (1987) ont montré que le caractère récalcitrant ou favorable à l'androgénèse des espèces peut être prévu par la différenciation plus ou moins précoce des proplastides en amyloplastides au cours de la gamétogenèse mâle. Les espèces connues comme favorables à l'haploïdie *in vitro* n'accumulent de l'amidon dans leur pollen qu'au stade bi-cellulaire, alors que ceci se passe très précocement chez les espèces récalcitrantes, les amyloplastides étant observables pendant toute la gamétogenèse. Ces organites cytoplasmiques sont connus pour ne pas pouvoir se différencier *in vitro*. Un autre exemple : chez le maïs, la corrélation entre la synthèse d'une protéine de 32 kd et l'aptitude à répondre en androgénèse a été mise en évidence (Vergne *et al.*, 1993). Elle est induite par le prétraitement au froid des panicules avant leur mise en culture. Egalement, chez une variété de blé tendre connue pour ses bonnes performances androgénétiques et cultivée *in vitro* dans deux conditions, l'une favorable et l'autre défavorable à l'haploïdie, Reynolds et Kitto (1992) ont pu mettre en évidence, grâce aux techniques de screening différentiel de banques d'ADNc, des clones spécifiques des toutes premières étapes de l'androgénèse.

VIII.3. L'albinisme

Le problème de l'albinisme est un problème majeur en androgénèse. C'est le cas notamment chez les céréales et plus particulièrement le blé dur. Il a été démontré, chez le blé tendre et l'orge, que les plantes albina issues de l'androgénèse présentent des délétions très importantes dans leur génome chloroplastique (Day et Ellis 1984, 1985). Dans le cas où les plantes sont chlorophylliennes, leurs génomes chloroplastiques ne sont pas affectés par le processus *in vitro* comme cela a été démontré par Rode *et al.*, (1985) chez le blé ou par Charmet *et al.*, (1985) chez le triticale. Tuveesson *et al.*, (1989) avaient montré par ailleurs, chez le blé tendre, que cet albinisme est sous contrôle de deux groupes de gènes nucléaires. Le premier est composé de gènes à effets principalement additifs contrôlant le pourcentage de régénérations chlorophylliennes à cause de leur effet sur l'aptitude globale du matériel à régénérer. Le deuxième groupe, composé de quelques gènes dominants ou à effets épistatiques, affecterait la fréquence à l'origine des structures chlorophylliennes.

La photosynthèse est contrôlée par une enzyme allostérique la Ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/oxygénase, ou Rubisco. C'est une protéine spécifique, contenue dans les plastides.

Elle est constituée de 2 sous-unités: 1 grande et 1 petite, chacune en 8 exemplaires dans la protéine native. La grande sous-unité est codée par un gène plastidial; alors que la petite est codée par un gène nucléaire. [Caredda et al., \(1999\)](#) ont identifiés chez l'orge par western blot la présence de 2 sous-unités de la Rubisco dans les plantules chlorophylliennes mais pas dans les plantules albina. De même, les 2 protéines ne sont pas présentes dans les embryons de 21 jours dans le cv. Igri (cultivar régénérant des plantes vertes) et dans le cv. Cork (variété donnant 100% des plantes albina). Ces chercheurs ont suggéré que le phénotype albina est lié à une déficience en protéine d'origine plastidiale et nucléaire, et que la Rubisco n'apparaît que pendant la phase de régénération.

Chez l'orge, une altération de l'ADN plastidial et nucléaire a été identifiée chez les plantes albina ([Dunford et Walden, 1991](#)), indiquant ainsi que chacun des génomes est impliqué dans l'apparition de l'albinisme.

Toujours, chez l'orge [Caredda et al., \(2004\)](#) ont mené un travail fondamental sur les plastes de la microspore durant les différentes phases de l'androgénèse. Ces auteurs ont montré que chez le cv. d'hiver Igri les plastes des embryons dérivés des microspores sont caractérisés par de nombreuses divisions, une différenciation des thylakoïdes, faible présence d'amidon et une forte teneur en ADN. Ces embryons donnant dans la plupart des cas des plantules vertes (88% de plantules chlorophylliennes régénérées). A l'inverse, au niveau des lignées de printemps testées, il y a peu de divisions et peu d'ADN dans les plastes des embryons dérivés des microspores. Ces derniers ont régénéré en plantes albina (100% d'albina régénérés). Les plastes des plantules albina sont dépourvus de thylakoïde, mais contiennent un corps prolamellaire et de nombreux plastoglobules ([Caredda et al., 1999](#)). Dans la microspore, au stade de prélèvement, les plastes ne présentent dans le stroma qu'un thylakoïde en moyenne et un grain d'amidon en cours de formation. Ces auteurs ont montré qu'il y a une corrélation étroite entre le manque d'ADN plastidial et l'absence de la division des plastes, entraînant ainsi une forte perturbation dans la physiologie des plastes des plantules androgènes albina.

Ces mêmes chercheurs ont suggéré que l'origine de l'albinisme androgénétique diffère selon les cultivars. Chez les cv d'hiver, une altération des plastes pourrait intervenir au moment de la phase de la régénération androgénétique. Au contraire, pour les cultivars d'orge de printemps, les plastes sont sérieusement affectés chez les microspores au moment de leur mise en culture, ce qui pourrait expliquer que ces lignées ne régénèrent que des plantules androgénétiques albina. Cette observation montre que l'albinisme n'est pas toujours initié au cours de la phase de régénération et qu'il pourrait très tôt s'installer pendant le processus de l'androgénèse. Cependant des études faites avant par ([Mouritzen et Holm, 1994](#)) toujours sur

le cultivar d'orge d'hiver Igri, ont montré que l'altération du génome plastidial impliqué dans la formation des plantes albina a eu lieu pendant la phase de régénération (Mouritzen et Holm, 1994). Probablement, chez l'orge, l'albinisme androgénétique peut avoir plusieurs origines pour des cultivars d'hiver et de printemps. Durant l'embryogénèse androgénétique, lors de la régénération de plantules chlorophylliennes, ces plastes suivent une voie de développement comparable à celle observée durant le développement de l'embryon zygotique. Lorsqu'une plante albina est régénérée, les plastes de la microspore demeurent indifférenciés durant tout le processus androgénétique (Caredda *et al.*, 1999).

En effet pendant le développement *in vivo* des grains de pollen, les plastes se différencient exclusivement en amyloplastes, accumulant de l'amidon lors de la maturation des grains de pollen. Il y a mobilisation de réserves amylicées pendant la croissance du tube pollinique (Mogensen, 1996). Pendant la maturation des grains de pollen, il y a dégradation de l'ADN plastidial dans la cellule végétative issue de la division mitotique (Mogensen, 1996; Nagata *et al.*, 1999a,b). Par ailleurs, Wang *et al.* (1999a) ont montré chez le cv Igri que la dégradation de l'ADN a eu lieu pendant le développement des microspores. Cette dégradation est stoppée par des prétraitements et l'ADN peut ainsi être restauré à la fin de prétraitement Wang *et al.* (1999b). Ces chercheurs ont, par ailleurs, montré que le phénotype ou bien le caractère albina est lié à une déficience en protéine d'origine plastidiale et nucléaire.

Chez les Poacées, la réussite de l'androgenèse est influencée par 3 facteurs contrôlés génétiquement (Knudsen *et al.*, 1989): l'induction de cals ou d'embryons à partir des microspores; conversion des embryons en plantes et enfin formation de plantes androgénétiques chlorophylliennes. Chaque céréale étudiée répond différemment au processus androgenétique. Chez ces espèces le prétraitement appliqué ne permet pas de réorienter le programme génétique de la microspore. D'autres ne sont pas en mesure de régénérer des plantes à partir d'embryons, comme chez certains cultivars du seigle (Rakoczy-Trojanowska *et al.*, 1997). Enfin de nombreuses Poacées régénèrent par androgenèse *in vitro* une proportion significative de plantes albina, hétérotrophe vis-à-vis du carbone et donc incapable de survivre.

L'albinisme constitue un obstacle et une limite certaine à l'exploitation de l'androgenèse chez les céréales en particulier (Jahne et Lorz, 1995). Afin de caractériser ce facteur, les chercheurs ont défini un rapport V/A (vertes / albina) (ou «G/A») donnant la proportion de plantes androgènes chlorophylliennes et albina. Ce rapport V/A varie suivant les espèces. Chez l'orge, le blé et le riz (Chu *et al.*, 1990; Orshinsky *et al.*, 1990; Jahne *et al.*, 1991; Xie *et al.*, 1995) certains génotypes régénèrent jusqu'à 100% de plantes albina en androgenèse *in vitro*.

IX. Comment maximiser la réussite de l'androgenèse *in vitro* et diminuer l'albinisme?

Rôle des Prétraitements

L'androgenèse est un processus où des cellules sexuelles mâles sont capables de germer *in vitro* sur un milieu artificiel et de donner des plantes. C'est une méthode très intéressante dans le développement des recherches en génétique, en sélection et en biotechnologie.

Cette méthode est réalisée à partir de culture d'anthères ou de jeunes grains de pollen isolés (microspores). La réussite de cette opération dépend de la prise en compte de plusieurs facteurs comme: les conditions de culture des plantes mères, le génotype de la plante mère, la position du bouton floral, ou le degré de maturation de l'anthère dans la fleur. De plus les traitements inducteurs de l'androgenèse doivent être adaptés à la plante considérée et ils peuvent être divers. Citons par exemple: l'action de basses températures sur les boutons floraux chez le triticale et le maïs, l'action de hautes températures pendant les premiers jours de culture chez le colza, le piment, l'aubergine et le chou, parfois un prétraitement gamétocide chez le blé. Les milieux de culture pour placer les organes reproducteurs *in vitro* doivent être également très judicieusement choisis, de cela dépend une issue positive de la culture.

La réussite de l'androgenèse (culture *in vitro* d'anthère et/ou de microspores isolées) est généralement freinée par l'albinisme, un véritable obstacle limitant son exploitation potentielle notamment chez les espèces récalcitrantes comme le blé dur. Plusieurs prétraitements appelés aussi "stress" ont été développés pour réorienter le programme gamétophytique vers un programme sporophytique (Touraev *et al.*, 1996a,c; 1997; Zhou et Konzak, 1997; Hu et Kasha, 1999). Ce processus peut alors être induit par plusieurs approches: prétraitements chimiques, prétraitements thermiques, choc osmotique,.... (Picard *et al.*, 1987; Liu *et al* 2002; Picard et de Buyser, 1975; Mentewab et Sarrafi, 1997; Jähne et Lörz, 1995; Roberts-Oëhlschlager et Dunwell, 1990; Höekstra *et al.*, 1997; Hu et Kasha, 1999, Caredda et Clément, 1999), comme aussi par une combinaison entre une carence en source de carbone et une température élevée (Toureaev *et al.*, 1996b). Plusieurs travaux ont souligné l'importance des prétraitements et leur rôle dans l'optimisation de la réponse androgénétique particulièrement au niveau de deux phases conditionnant la réussite à l'androgenèse, c'est-à-dire: induction et production des embryons et conversion des embryons en plantes chlorophylliennes.

Un autre facteur important est la viabilité pollinique. Les traitements physiques ou chimiques appliqués aux plantes mères qui féminisent les plantes en changeant leur balance sexuelle, ont été repérés comme ayant un effet inducteur positif sur l'androgenèse. Parmi les traitements physiques, on peut citer le froid, qui semble être l'un des traitements les plus efficaces

(Amssa *et al.*, 1980; Nitsch et Norreel, 1973). Parmi les traitements chimiques qu'on peut faire subir aux plantes avant de prélever leurs anthères, on trouve des traitements chimiques par des substances féminisantes chez le tabac (Heberle-Bors 1983, 1985) ou par l'ethrel chez le blé (Bennet et Hughes, 1972) et chez le riz (Hu *et al.*, 1978) ou par un gamétocide (Picard *et al.*, 1987). Ces traitements ont tous provoqué des augmentations significatives du rendement en haploïdes.

Le choc osmotique ou le prétraitement au mannitol utilisé pour la première fois par Roberts-Oehlschlager et Dunwell, (1990) est devenu chez les céréales le prétraitement le plus utilisé en culture *in vitro* d'anthères ou de microspores isolées (Ziauddin *et al.*, 1990; Höekstra *et al.*, 1992, 1996; Caredda *et al.*, 1999; Cistué *et al.*, 1999; Kasha *et al.*, 2001a). Ces mêmes auteurs ont rapporté qu'un prétraitement direct des anthères au mannitol allant de 0,1 à 1,5M pendant 3 à 4 jours à la place d'un prétraitement au froid seul pendant 4 semaines augmente considérablement l'embryogenèse aussi bien que la régénération chlorophyllienne chez l'orge par culture de microspores isolées. De nombreuses études chez les céréales telles que l'orge (Olsen 1991; Hoeskra *et al.*, 1992), le blé (Mejza *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 1995) et le riz (Ogawa *et al.*, 1994) ont montré qu'il est préférable d'utiliser un milieu de prétraitement carencé en source carbonée lors du prétraitement des anthères afin d'induire plus favorablement l'embryogenèse.

En 1996, Touraev *et al* (1996b) ont développé une méthode efficace pour induire la formation d'embryons en grande quantité chez le blé à partir de microspores isolées. Il s'agit de placer les anthères sur un milieu dépourvu de source carbonée et à la chaleur (37°C) pendant 8 heures. Cette technique a permis d'induire la formation d'embryons avec une fréquence plus élevée pour 9 génotypes autrichiens d'hiver, incluant des cultivars considérés jusqu'alors comme récalcitrants à l'androgénèse. En parallèle, l'efficacité du stress au froid, largement utilisé chez le blé, est actuellement discutée. Karimzadeh *et al.*, (1995) ont démontré que le prétraitement au froid n'est pas essentiel pour tous les génotypes. Dans cette étude, un prétraitement au froid à 4°C durant une semaine n'a pas d'effet significatif sur la régénération de plantes chlorophylliennes. De même, Ghaemi *et al.*, (1995) ont montré que le prétraitement au froid des épis (7 jours à 4°C) réduit le nombre d'embryons induits. Toutefois, Stöber et Hess (1997) ont remarqué que ce type de prétraitement favorise l'obtention d'embryons et de plantes vertes avec le génotype Nandu.

Chez le maïs, un prétraitement au froid de 7 à 14 jours à des températures variant de 4 à 14°C (Nitsch *et al.*, 1982; Genovesi et Collins, 1982; Dieu et Beckert, 1986; Krautwig et Lörz, 1995) influence l'embryogenèse. Chez le riz, un prétraitement au froid entre 4 et 8°C durant 7

jours est optimal pour induire l'embryogenèse pollinique (Daniel 1993). Chez le seigle, la phase de prétraitement (4°C) se termine par un passage des anthères à une température de 14°C pendant quelques jours pour augmenter la réponse des anthères (Deimling *et al.*, 1990; Flehinghaus *et al.*, 1991; Deimling et Flehinghaus-Roux, 1997). Chez l'orge, sans prétraitement aucune structure embryogène n'est formée à partir de culture de microspores isolées (Hoeskra *et al.*, 1996).

Sur des cultures d'anthères effectuées sur l'orge, Hoekstra *et al.*, (1997) sont arrivés à la conclusion, après une comparaison avec le prétraitement au froid de longue durée, que le mannitol utilisé à une concentration optimale améliore la production d'embryons et de plantes par rapport au prétraitement thermique de longue durée. De même il a été rapporté chez le blé (Hu et Kasha, 1999) que le prétraitement des épis dans une solution du mannitol à 0,4M maintenus au froid pendant 4 jours, retarde la division mitotique des noyaux et maintient toutes les microspores au même stade durant le prétraitement, conduisant ainsi à la formation d'un très grand nombre d'embryons. L'utilisation d'un prétraitement au froid pendant 6 ou 7 jours dans une solution de mannitol à 0,4M en présence des macro-éléments du milieu FHG (Hunter 1988) présentait un effet bénéfique sur l'embryogenèse et la production d'embryons et sur la régénération des plantes chlorophylliennes chez le blé par culture de microspores isolées (Hu *et al.*, 1995). Quant à Indrianto *et al.*, (1999), ils ont utilisé le choc thermique à haute température avec du mannitol et ils ont montré que cette nouvelle combinaison était bénéfique chez le blé.

En 2002, Liu *et al* ont montré l'efficacité d'un nouveau prétraitement chimique pour des cultures *in vitro* de microspores isolées chez le blé tendre. Les talles prélevées de la serre au stade uninucléé moyen à tardif ont été placées dans une fiole stérile contenant 50 ml du mélange 2-HNA (0-1 g/L) du 2,4-D (10^{-6} mol L⁻¹) et du BAP (10^{-6} mol L⁻¹). Ensuite les talles ont été placées dans une étuve régulée à 33°C pour une durée allant de 48 heures à 72 heures. Ces auteurs (Liu *et al.*, 2002) ont démontré l'efficacité du nouveau prétraitement chimique non seulement sur l'induction et la production d'embryons, mais aussi au niveau de la régénération des plantes chlorophylliennes et la production des plantes haploïdes doublées. Dans ces conditions optimales Liu *et al.*, (2002) ont obtenus des résultats très intéressants. En effet le nouveau prétraitement chimique a induit une forte production embryonnaire. Le rendement de production d'embryon était très élevé. Plus de 50% de microspores extraites ont été convertis vers le programme sporophytique conduisant à la formation des embryons. De même pour la régénération et la conversion des embryons en plantes. Cette dernière était très efficace, ainsi Liu *et al.*, (2002) ont pu avoir par épi entre 50 à 5500 régénérations en plantes

vertes. Cette grande efficacité du nouveau prétraitement chimique lancé par [Liu et al., \(2002\)](#) ouvre des opportunités dans l'amélioration de la réponse androgénétique chez le blé et par conséquent un nouveau système d'exploitation que ce soit dans le domaine des recherches comme dans le développement des nouveaux cultivars dans le programme de sélection chez le blé.

Une revue très intéressante établie par [Shariatpanahi et al., 2006](#) fait le point sur les stress appliqués et les résultats obtenus en embryogenèse *in vitro* chez différentes espèces.

Contrairement au blé hexaploïde (*Triticum aestivum*), peu de recherches en androgenèse *in vitro* sur les blés tetraploïdes (*Triticum turgidum*) ont été réalisées. Sachant que les travaux effectués sur le blé dur ont montré que cette espèce est récalcitrante, d'une part vu le nombre très faible d'embryons produits et d'autre part le faible rendement dans la conversion des embryons en plantes qui, dans la plupart des cas, ne donne que des albina ([Zhu et al., 1979](#); [Hadwiger et Heberle-Bors, 1986](#); [Foroughi-Wehr et Zeller, 1990](#); [Ghaemi et al., 1993](#)). Il est tout à fait clair qu'un protocole adéquat doit être mis en place pour cette espèce. Une optimisation des protocoles déjà existants devrait assurer une amélioration dans le rendement de la réponse androgénétique chez les espèces récalcitrantes.

L'objectif visé par le présent travail est d'optimiser le protocole déjà existant ([de Buyser et al., 2002](#)) adapté au laboratoire MVEH, d'Orsay pour la culture *in vitro* de microspores isolées chez le blé dur et de trouver le meilleur prétraitement sur la base de celui qui existe déjà tout en assurant la réorientation du programme gamétophytique vers le programme sporophytique (l'embryogenèse).

Plusieurs prétraitements ont été utilisés et appliqués sur des talles au moment où la majorité des microspores étaient au stade uninucléé vacuolisé. Le but principal de cette recherche est d'étudier les effets de chacun de ces prétraitements sur l'induction et la formation d'embryons et principalement sur l'optimisation du rendement en plantes chlorophylliennes.

Matériel et méthodes

I. Le matériel Génétique

Cette étude a été menée sur des variétés de blé dur (*Triticum turgidum subsp.durum* (Desf) Husn.) tétraploïde ($2n=4x=28$, AABB), et une variété de blé tendre de printemps (*Triticum aestivum subsp. aestivum*) hexaploïde ($2n=6x=42$, AABBDD), Pavon 76 hautement embryogène en culture de microspores isolées. Pavon 76 est utilisé ici comme témoin dans la mesure où jusqu'à présent aucun génotype de l'espèce *Triticum durum* ne pouvait servir de témoin dans le cadre d'expériences portant sur la culture *in vitro* de microspores isolées.

Pour le blé dur, deux génotypes ont été utilisés dans toutes les expériences effectuées dans ce travail (chapitre 1, 2 et 3). Il s'agit des cultivars Cham1 et Jennah Khetifa (dans ce texte «JK»). Ces deux variétés constituaient le matériel génétique de base dans le programme de recherche mené au laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale Haploïde (M.V.E.H) d'Orsay (France), sur la culture *in vitro* de microspores isolées chez le blé dur, auxquelles beaucoup de travaux ont été consacrées (Picard *et al.*, 1998, Jaiti *et al.*, 2000), sans oublier le nombre important de travaux non publiés. D'autres génotypes de blé dur issus de variétés d'origine algérienne ont été utilisés dans le but de tester l'efficacité des prétraitements utilisés. Le matériel a été fourni par la ferme expérimentale de l'Institut Technique des Grandes Cultures (I.T.G.C, El Khroub, Constantine, Algérie); il s'agit de blé alternatif à hiver : Bidi 17, Oued Zenati 368 (dans ce texte «OZ»), Hedba 03 et Mohamed Ben Bachir (dans ce texte «MBB») : ce sont des variétés cultivées jusqu'à présent. Ce choix a été défini pour répondre d'un côté à la valorisation et à l'intégration du patrimoine génétique national, de l'autre pour avoir une large variabilité génotypique de base. Pour ces études nous nous sommes servis de:

- deux cultivars de blé de printemps: Cham1 dans le cas du blé dur et Pavon 76 pour le blé tendre.
- un cultivar de blé alternatif: JK
- quatre cultivars de blé alternatif à hiver: Bidi17, Hedba 03, OZ et MBB.

Le [tableau 1](#) donne la description des principaux génotypes étudiés. D'autres variétés non indiquées dans le tableau 1 ont parfois été utilisées. Ces variétés ont données des réponses faibles comme les cvs : Hamira, Karim, Korifla, Kebir, Sebou et certaines ont donné des réponses négatives à la culture *in vitro* de microspores isolées, Brachoua, Oum rabia 3 et Oum Rabia 5.

Le nombre des variétés étudiées est suffisamment élevé pour obtenir une bonne variabilité de base induite par l'androgenèse *in vitro*, surtout que la méthode de culture *in vitro* de microspores isolées est une méthode à plusieurs techniques successives rendant le traitement

simultané de plus de trois échantillons trop lourd à faire. En effet, c'est une méthode qui nécessite beaucoup d'attention, de temps et de suivi. Rappelons qu'il faut compter au minimum 6 semaines pour obtenir les premiers résultats à partir du premier jour de mise en culture des microspores isolées dans le milieu d'induction CHB3, sans compter la durée du prétraitement.

Les caractères agronomiques et physiologiques des principales variétés utilisées dans ce travail ont été regroupés dans le [tableau 1](#).

II. Les méthodes

II.1. Conditions de culture des plantes mères

Les plantes mères des différents génotypes dont nous nous sommes servis dans toutes nos expérimentations en culture *in vitro* de microspores isolées ont été cultivées dans une chambre climatisée de type STRADER (serre du laboratoire MVEH, Orsay) avec une photopériode de 16h de lumière à 22°C et 8h d'obscurité à 15°C. Le pourcentage d'humidité relative y a été maintenu à 70 % ± 5. Le flux lumineux est assuré par des lampes à vapeur de sodium 400 W alternant avec des lampes halogènes 400 W, 1150 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Avant la culture des plantes mères, les graines de chaque génotype ont été mises à germer dans des boîtes de Pétri en verre de 90 mm de diamètre. Les boîtes ont été garnies de 2 rondelles de papier-filtre pour tests de germination, humidifiées sans excès. 15 à 20 grains au maximum ont été disposés sur les papiers filtres, régulièrement espacés de manière à éviter un chevauchement des racines pouvant aboutir à une cassure au moment du repiquage. Les boîtes ont été par la suite placées à la lumière à une température ambiante de 20°C environ. Cela peut se faire très bien dans une pièce normale: un bureau par exemple.

Après la phase de germination, une durée de vernalisation est nécessaire pour les génotypes de type alternatif et alternatif à hiver. Les graines germées ont été mises à vernaliser dans une chambre climatisée (4°C±1 avec 8 heures d'éclairage par jour) pendant 4 semaines pour les génotypes de type alternatif à hiver (Bidi 17, Hedba 03, OZ et MBB) et quinze jours pour le cv.JK. Quant aux génotypes Cham1 et Pavon 76, ils n'ont pas subi de vernalisation car il s'agit des variétés type printemps.

Les plantes mères étaient cultivées, après le temps de vernalisation nécessaire qui est fonction du type de cultivar (cultivar type alternatif ou cultivar type alternatif à hiver) dans un terreau (ORGAFLORE ou PINDSTRUP) en pot plastique de 7 litres, à raison de 5-6 plantes par pot. Les plantes sont arrosées régulièrement (tous les deux ou trois jours) à l'eau courante ou avec une solution nutritive HYDROKANI H additionnée de Fer Séquestrène. Les plantes doivent

êtres maintenues dans le meilleur état sanitaire possible. Elles subissent un traitement insecticide et fongicide chaque semaine (tous les vendredis). Elles ont été traitées contre l'oïdium dès l'apparition des premiers signes de la maladie et contre les pucerons et les trips.

II.2. Prélèvement des talles

Pour la variété Cham1, les talles ont été prélevées lorsque la plupart des microspores étaient au stade uninucléé moyen (figure 8). Cependant, pour le cv.JK, les talles ont été prélevées quand les microspores étaient au stade uninucléé tardif, comme aussi pour le génotype de blé tendre le Pavon 76 (figures 8 et 9). Par contre, pour les variétés de blé dur d'origine algérienne le prélèvement des talles a été réalisé quand les microspores ou bien la majorité des microspores étaient au stade uninucléé entre moyen et tardif.

Les talles portant les épis de blé sont prélevés à un stade bien précis de la gamétogenèse. Pour le déterminer, l'échelle de Zadock (figure 7) peut servir d'aide.

Les épis apparaissent à l'intérieur de la gaine de la dernière feuille environ 5 semaines (blé tendre : Pavon 76) ou 7 semaines (blés durs) plus tard; ils sont récoltés quand les talles de chacune des espèces sont au stade favorable.

Les talles des épis au stade favorable pour chaque génotype ont été coupées en dessous de l'avant-dernier nœud et leur dernière feuille (feuille étendard) coupée 2 cm au-dessus de la ligule. Le morceau de feuille restant sert à inscrire la date et le génotype. Les talles débarrassées des autres feuilles ont été regroupées par date et génotype en bouquets puis elles ont été conservées sous plastique à 4°C. Pour Pavon 76, les microspores les plus âgées des épis des talles prélevées doivent être à un stade compris entre le stade uninucléé tardif et le début du stade jeune grain de pollen bicellulaire ou stade bicellulé (figure 10)

Le prélèvement des épis débute peu après le début du gonflement de la première gaine (figure7). Les talles doivent être prélevées quand les microspores des premières fleurs des épillets du centre des épis atteignent le stade uninucléé moyen, tardif et entre moyen et tardif respectivement pour Cham1, JK-Pavon 76 et les variétés d'origine algérienne respectivement. Ce prélèvement est fait par appréciation visuelle de ce stade en prenant en compte trois critères morphologiques dans l'ordre suivant:

- les épis doivent présenter un gonflement moyen sans ouverture des gaines foliaires qui les contiennent,
- la partie apicale des épis doit avoir atteint au minimum les deux tiers des gaines foliaires qui les contiennent,

- le niveau du dernier nœud doit se situer entre 1-1,5 cm environ en dessous de la ligule de l'avant-dernière feuille pour Pavon 76 et à 2 cm pour les blés durs.

Les épis devant servir à la culture d'ovaires ont été prélevés au stade grain de pollen tricellulé.

II.3. Coloration au rouge carmin acétique

Des contrôles cytologiques ont lieu régulièrement pour confirmer les prélèvements.

Le contrôle des stades de la gamétogenèse a été réalisé par des colorations rapides ("squashes") au carmin acétique (Jahier, 1992). L'observation et la vérification des stades de la gamétogenèse ont été réalisées à l'aide d'une loupe binoculaire. Les anthères provenant des fleurs centrales des épis ont été prélevées. Dans une goutte de rouge carmin acétique sur une lame (annexe 4), les anthères (une ou deux) ont été déposées, puis dilacérées à l'aide d'une aiguille sous une loupe binoculaire pour libérer les microspores des tissus sporophytiques de l'anthère. La préparation a été couverte ensuite d'une lamelle, puis le tout a été chauffé légèrement à l'aide d'une lampe à alcool, pour une fixation du matériel. L'observation a été réalisée sous la loupe binoculaire (annexe 4).

Les anthères peuvent être conservées au froid à 4°C en les stockant dans une solution 3v:1v d'alcool absolu et d'acide acétique pur.

II.4. Prétraitements appliqués aux talles avant l'isolement des microspores

Tous les prétraitements appliqués (stress thermiques, osmotiques ou bien leurs combinaisons), avant l'isolement des microspores, ont lieu à 4°C et à l'obscurité. Dès qu'elles ont été coupées les talles ont été mises en bouquets dans des fioles remplies d'eau ou d'une solution de mannitol et ont été soumises au froid à 4°C.

Les talles des épis aux stades favorables ont été prélevées et ont subi par la suite les prétraitements décrits dans les trois chapitres. Ces prétraitements ont été choisis à la suite d'expériences préliminaires, non publiées, précédant celles que nous relatons dans ce travail.

Dans le premier chapitre, les variétés testées étaient Cham1 et JK pour les variétés tétraploïdes qui sont des variétés de références et Pavon 76 pour les blés hexaploïdes pris comme variété modèle et qui sert comme témoin dans nos travaux de culture *in vitro* de microspores isolées. Les prétraitements appliqués sont les suivants:

- Ø Aucun prétraitement: les talles ont été prélevées dans la serre puis les microspores ont été directement extraites sans aucun prétraitement préalable.

- Ø Un prétraitement au froid pendant 3 jours, 1 semaine, 4 semaines, 5 semaines, 6 semaines ou pendant 7 semaines. Les talles ont été mises dans des fioles Erlenmeyer à col large et en verre remplies d'eau, recouvertes d'un sac en plastique puis placées dans un réfrigérateur à 4°C et à l'obscurité.
- Ø Un prétraitement au mannitol à 0,1M, 0,3M, 0,4M et 0,5M pendant 3 jours. Les talles ont été mises séparées dans des Erlenmeyers à col large et en verre, contenant chacun une solution aqueuse de mannitol à la concentration choisie, elles sont recouvertes d'un sac plastique et placées dans un réfrigérateur à 4°C et à l'obscurité pendant 3 jours.
- Ø Un prétraitement combinant un prétraitement au froid en premier pendant 5 semaines suivi d'un prétraitement au mannitol à 0,1M pendant 3 jours. Les talles prélevées de la serre sont mises dans des fioles Erlenmeyer (à col large et en verre) remplies d'eau courante et recouvertes d'un sac en plastique; elles sont placées dans un réfrigérateur à 4°C et à l'obscurité pendant 5 semaines. Après ce délai, les talles sont retirées et placées cette fois-ci dans des Erlenmeyer contenant une solution aqueuse de mannitol 0,1M pendant 3 jours à 4°C et à l'obscurité.
- Ø un prétraitement inverse du précédent: mannitol 0,1M d'abord pendant 3 jours suivi du froid pendant 5 semaines. Les talles prélevées de la serre ont été placées en premier lieu dans des Erlenmeyer contenant une solution aqueuse de mannitol 0,1M et recouvertes d'un sac plastique. Après une durée de 3 jours à 4°C et à l'obscurité, les talles ont été transférées dans d'autres fioles Erlenmeyer (à col large et en verre) contenant de l'eau du robinet, toujours recouvertes d'un sac plastique et ont été maintenues au froid (4°C) pendant 5 semaines.

Dans le deuxième chapitre un nouveau prétraitement a été appliqué aux talles. Deux séries d'expérimentations ont été conduites: les premières ont consisté à établir la concentration optimale du mannitol et les secondes ont été réalisées dans le but de déterminer la période favorable du prétraitement c'est-à-dire la période optimale pour une bonne réponse androgénétique : temps pendant lequel les talles doivent séjourner dans la solution du mannitol.

Expérience 1

Les génotypes testés étaient JK et Cham1 pour les cultivars de blé dur. Le cv. Pavon 76 a été maintenu comme une variété témoin.

Un stress osmotique à différentes concentrations (0,1M; 0,3M; 0,4M et 0,5M) a été appliqué chez le cv. JK. Cependant seulement les deux concentrations 0,1M et 0,3M ont été testées chez le cv. Cham1.

Dans l'expérience 1, les talles prélevées de la serre ont été placées séparément dans des Erlenmeyers contenant chacun une solution aqueuse de mannitol soit à 0,1M, 0,3M, 0,4M ou bien à 0,5M, pour les génotypes JK et Pavon 76, recouvertes d'un sac plastique et gardées dans le froid à 4°C et à l'obscurité pendant 3 jours. Cependant pour la variété Cham1, deux concentrations seulement ont été appliquées.

Expérience 2

A partir des résultats de l'expérience 1, 0,3M de mannitol était la concentration de choix ; elle a été retenue pour la suite du travail (chapitre 2). Reste maintenant à définir la durée durant laquelle les talles devraient rester au froid et à l'obscurité. Pour cela plusieurs périodes ont été testées à savoir: (0 jours; 3 jours; 5 jours; 6 jours; 7 jours; 8 jours; 10 jours et 12 jours et 15 jours). Les génotypes testés étaient Cham1, JK, Bidi 17, Hedba 03, MBB et OZ 368 pour l'espèce blé dur ; comme toujours le Pavon 76 a été maintenu comme témoin. Les talles prélevées de la serre ont été placées dans des Erlenmeyers contenant une solution aqueuse de mannitol 0,3M, recouvertes d'un sac plastique et gardées au froid à 4°C et à l'obscurité pendant différentes périodes: 3, 5, 6, 7, 8, 10, 12 et 15 jours.

Beaucoup de répétitions ont été réalisées notamment sur les variétés de blé dur d'origine algérienne, du fait qu'elles étaient très récalcitrantes et ne donnaient pratiquement aucun embryon à partir des milliers de microspores mises en culture sur le milieu d'induction le CHB3 (CHU modifié par addition de 90 g/l de maltose, [annexes 1 et 2](#)) (Chu *et al.*, 1990)

Le troisième chapitre regroupe toutes les manipulations menées principalement pour optimiser le protocole d'extraction de culture de microspores isolées chez le blé dur (protocole adapté au laboratoire MVEH, de Buyser *et al.*, 2002, [annexes 1, 2 et 3](#)). Des modifications ont été portées sur:

- **la durée et la vitesse du broyeur** : tout d'abord un broyage lent (dans ce texte «B») a été réalisé en une seule fois pendant 20 secondes, à vitesse réglée en plaçant le variateur sur la position 2, au lieu d'un broyage en deux étapes pendant 10 secondes chacune à une vitesse de 18 000 rpm selon le protocole de [de Buyser et al., 2002](#).

La seconde modification consiste en un broyage plus lent encore. Ce broyage a été réalisé en une seule fois pendant 20 secondes à vitesse réglée en plaçant le variateur sur la position 1 (dans ce texte «V1»); au lieu d'un broyage en deux étapes pendant 10 secondes chacune à une vitesse de 18 000 rpm selon le protocole de [de Buyser et al., 2002](#)

- **une extraction dans le mannitol 0,3M** au lieu d'une extraction dans le milieu d'induction le CHB3 (CHU additionné de 90 g/l de maltose) ([Chu et al., 1990](#))

- **la vitesse de la centrifugation** : deux essais ont été appliqués visant à diminuer la vitesse de la centrifugation. La première tentative a été réalisée en passant de 800g pendant 5 minutes à 57g pendant 5 minutes (appelé dans ce texte «C»). Le deuxième essai consiste à baisser encore la vitesse de la centrifugation qui a été ramenée de 800g pendant 5 minutes à 50g pendant 5 minutes (appelé dans ce texte «C50»).

- **un broyage lent, une centrifugation lente avec un gradient de maltose (dans ce texte «BCM»)**. Après leur dissection, les épillets ont été déposés dans un bol d'extraction en présence de 45 ml du CHB3. Le broyage a été réalisé en une seule fois pendant 20 secondes à vitesse réglée en position 2 (dans ce texte «B») c'est-à-dire en plaçant le variateur sur la position 2; au lieu d'un broyage répété deux fois durant 10 secondes à vitesse 18000 rpm comme décrit dans le protocole de [de Buyser et al \(2002\)](#). Après une filtration sur tamis, le résidu recueilli a été centrifugé à 57g pendant 5 minutes (appelé dans ce texte «C») au lieu de 800g pendant 5 minutes selon le protocole de [de Buyser et al., \(2002\)](#). Ensuite sur le culot de centrifugation un gradient de maltose de 0,58M a été pratiqué (dans ce texte «M»). Une deuxième centrifugation a été réalisée et le volume de la bande supérieure a été récupéré. Les étapes suivantes sont identiques à celles décrites dans le protocole de [de Buyser et al., \(2002\)](#).

- **la densité de la population des microspores**: dans le protocole de culture de microspores de blé suivi par le laboratoire MVEH, Orsay, la densité de la population des microspores mises en culture est ajustée à 50 000 microspores par ml du milieu d'induction le CHB3 (CHU additionné de 90 g/l de maltose) ([Chu et al., 1990](#)). Cependant des modifications ont été portées au niveau de la densité de la suspension des microspores mises en culture. En effet des densités plus élevées ont été testées. L'ajustement de la population des microspores a été ramené à 75 000 et 100 000 microspores par ml du milieu CHB3. Parallèlement des densités plus faibles que celle fixée dans le protocole de [de Buyser et al., 2002](#) ont été testées. Des

suspensions à 25 000 et 12 500 micropores par ml de milieu d'induction ont été mises en culture dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre.

Les génotypes testés dans ce troisième chapitre étaient Cham1 et JK, les deux cultivars de base en présence de leur témoin le cv. Pavon 76. D'autres variétés de blé dur ont été aussi utilisées: Bidi17, Hedba 03, MBB, OZ, Kebir, Brachoua, Korifla, Oum Rabia 3 et Oum Rabia5.

Un stress thermique et osmotique ont été appliqués avec la même procédure : les talles des différents cultivars prélevées de la serre ont été mises dans des Erlenmeyers (à col large et en verre) soit dans des solutions aqueuses de mannitol pour un choc osmotique, soit dans des fioles Erlenmeyers (à col large et en verre) contenant de l'eau du robinet pour un choc thermique, elles sont toujours recouvertes d'un sac plastique et ont été maintenues au froid (4°C) pendant une période de 5 semaines.

Dans le troisième chapitre, nous avons tenté de tester la méthode de [Liu et al., \(2002\)](#), dont le protocole est décrit en [annexe 6](#).

Le prétraitement appliqué est celui de ([Liu et al., 2002](#)) (voir annexe 4). Les talles prélevées de la serre au stade favorable, ont été placées dans des Erlenmeyers (en verre et à col étroit pour minimiser la contamination) contenant 50 ml de la solution de [Liu et al., \(2002\)](#) dont la composition est la suivante :

2 HNA	5 ml de la solution 10^{-3} (100mg / 100ml)
2,4-D	110 µl de la solution 10^{-4} (10mg / 100ml)
BAP	115 µl de la solution 10^{-4} (10mg / 100ml)

La solution de [Liu et al., \(2002\)](#) est ajustée à 50 ml avec de l'eau stérile. Les talles ont été recouvertes avec un sachet plastique en serrant hermétiquement au niveau du col de l'Erlenmeyer pour éviter les contaminations. Le tout a été placé après dans une étuve réglée à 33°C et à l'obscurité pour une durée allant de 48 heures à 72 heures.

Les variétés testées étaient les deux variétés de base à savoir Cham1 et JK. Parallèlement d'autres variétés ont été utilisées. Il s'agit de Sebou, Brachoua, Kebir et Bidi 17.

Par ailleurs, comme dans toutes les expérimentations réalisées au cours de ce travail sur la culture *in vitro* de microspores isolées le génotype Pavon 76 a été pris comme variété témoin.

Les prétraitements appliqués sont les suivants:

- Ø Un prétraitement de [Liu et al., \(2002\)](#) seul. Les talles prélevées de la serre au stade favorable ont été mises dans des Erlenmeyers à col étroit et en verre contenant la solution de [Liu et al., \(2002\)](#) dont la composition est donnée en annexe 5, recouvertes d'un sac plastique, scellées au niveau du col de l'erien puis ont été

placées dans une étuve à 33°C et à l'obscurité pendant 3 jours. Les microspores ont été extraites selon le protocole de [Liu et al., \(2002\)](#) (annexe 6).

- Ø Un prétraitement de [Liu et al., \(2002\)](#) avec un broyage lent (en une seule fois pendant 20 secondes, à vitesse régulée en plaçant le variateur sur la position 2; au lieu d'un broyage pendant 20 secondes à 2 200 rpm selon le protocole de [Liu et al., \(2002\)](#))
- Ø Un prétraitement combinant un prétraitement au froid en premier pendant 9 jours, et 11 jours, à 4°C et à l'obscurité suivi d'un prétraitement de [Liu et al., \(2002\)](#). Les talles prélevées de la serre ont été mises dans des Fioles Erlenmeyers à col large et en verre remplies d'eau courante recouvertes d'un sac en plastique puis ont été placées dans un réfrigérateur à 4°C et à l'obscurité pendant 9 jours et 11 jours. Après ce délai, les talles ont été retirées et placées cette fois-ci dans des Erlenmeyers à col étroit et en verre contenant une solution de [Liu et al., \(2002\)](#) pendant 3 jours à 33°C et à l'obscurité. Les microspores ont été extraites selon le protocole de [Liu et al., \(2002\)](#).
- Ø Un prétraitement combinant un prétraitement au froid en premier pendant 3 semaines et 4 semaines à 4°C et à l'obscurité suivi d'un prétraitement de [Liu et al., \(2002\)](#) à vitesse et centrifugation lente. Les talles prélevées de la serre ont été mises dans des fioles Erlenmeyers à col large et en verre remplies d'eau courante recouvertes d'un sac plastique et placées dans un réfrigérateur à 4°C et à l'obscurité pendant 3 et 4 semaines. Après ce délai, les talles ont été retirées et placées dans des Erlenmeyers à col étroit et en verre contenant une solution de [Liu et al., \(2002\)](#) pendant 3 jours à 33°C et à l'obscurité. Par la suite les microspores ont été extraites suivant les étapes décrites dans le protocole de [Liu et al., \(2002\)](#) (annexe 4) sauf pour le broyage et la centrifugation. Dans ce cas le broyage a été réalisé en une seule fois pendant 20 secondes à vitesse régulée en plaçant le variateur sur la position 2; au lieu d'un broyage pendant 20 secondes à 2 200 rpm selon le protocole de [Liu et al., \(2002\)](#) Quand à la centrifugation sa vitesse et sa durée ont été modifiées : 57g pendant 5 min au lieu de 750 t/min pendant 3 min selon le protocole de [Liu et al., \(2002\)](#).

II.5. Extraction des microspores

Le protocole d'isolement des microspores utilisé est celui décrit par [de Buyser *et al.*, \(2002\)](#) voir chapitre Annexes : [annexes 1 et 2](#)) sauf pour les prétraitements.

Juste avant la mise en culture, les épis pour la culture de microspores et ceux qui sont pour les ovaires (qui seront conservés durant l'extraction des microspores) ont été extraits des gaines foliaires. Un numéro a été inscrit sur le col de l'épi avec un feutre indélébile à l'aide d'un code simple. La correspondance entre le numéro d'épi et le génotype doit être soigneusement noté.

Avant l'isolement des microspores, les épis ont été désinfectés sous hotte à flux laminaire ([figure 11](#)) par une solution d'hypochlorite de calcium (70% de chlore actif) à 4% (12g d'hypochlorite/300ml d'eau dé-ionisée stérile) préparée juste avant son utilisation. La stérilisation a été maintenue pendant 4 à 5 minutes en agitant dans un erlen de 500 millilitres, avec environ 20 à 30 épis par Erlen. Ensuite, les épis ont été rincés 3 fois avec de l'eau dé-ionisée stérile et froide (4 à 5°C).

Sous flux laminaire stérile, les épillets de chaque épi en partant de leur base ont été d'abord débarrassés de leurs glumes et glumelles puis déposés soigneusement et dans des conditions stériles dans des boîtes de Pétri stériles de 60mm de diamètre (plastiques, pré stérilisées Greiner).

Après broyage des épillets, filtration et centrifugation, reprise du culot et deuxième centrifugation ([figure 12](#)), les microspores extraites ont été cultivées dans le milieu d'induction liquide CHB3 (CHU additionné de 90 g/l de maltose) ([Chu *et al.*, 1990](#)), dont la composition a été décrite dans le chapitre Annexes : [annexe 2](#). Les microspores ainsi extraites ont été déposées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre à raison de 1,5 ml par boîte et co-cultivées avec 5 à 10 ovaires par boîte de Pétri.

II.6. Culture des microspores isolées

Lorsque toutes les boîtes ont été fournies en ovaires, elles sont placées à raison de 4 ou 5 dans de grandes boîtes de Pétri stériles carrées (120mm) dans lesquelles on ajoute un couvercle de boîte de Pétri (diamètre 60mm) contenant 8ml d'eau stérile (préalablement conservée) pour maintenir une hygrométrie élevée ([figure 13](#)). Les grandes boîtes carrées sont scellées avec 2 ou 3 tours de Scel-O-frais (ou de parafilm). Puis elles sont placées dans une grande boîte métallique (genre boîte à biscuit). L'ensemble a été disposé dans une enceinte de culture à l'obscurité régulée à 27°C.

Le développement des microspores peut être observé directement à l'aide d'un microscope inversé à n'importe quel moment de la culture. Normalement à partir du quinzième jour de

culture, les embryons deviennent visibles; le pourcentage d'induction après 8 jours peut atteindre 10-30% et il est possible d'observer jusqu'à 1000 embryons par boîte après 4 semaines de culture pour les meilleurs génotypes (génotypes embryogènes).

L'induction, l'embryogenèse et la production des embryons sont fonction du cultivar et aussi de type de prétraitement appliqué.

II.7. Repiquage des embryons

Pour certains génotypes et selon le prétraitement utilisé, le repiquage d'embryons peut se faire à partir de la 3^{ème} semaine de culture pour les génotypes embryogènes comme le cv. JK. Les embryons bien formés et de taille suffisante (supérieure à 1mm) ont été comptés, puis repiqués sous une hotte à flux laminaire et sous loupe binoculaire.

Le prélèvement des embryons est effectué sous loupe binoculaire, à l'aide d'une pince fine et d'une aiguille à paracentèse (sans manche, enfant, inox, maison LUER) montée sur un mandrin (ou une tige de bambou) d'une vingtaine de centimètres environ. Avec la pince fine et l'aiguille, les embryons, ont été prélevés délicatement et déposés à la surface du milieu de régénération solide de [Murashige et Skoog \(1962\)](#) sans hormones (MS0), (dont la composition a été donnée dans le chapitre Annexes : [annexe 2](#)) dans des boîte de Pétri de 90 mm de diamètre (plastiques, pré stérilisées Greiner) à raison de 30 à 50 structures par boîte lorsque le nombre d'embryons est très élevé ([figure 14](#)).

Le génotype, inscrit sur la boîte de culture de microspores isolées, est noté sur la boîte de Pétri de 90mm ainsi que le nombre d'embryons repiqués et la date du repiquage des embryons. L'indication du nombre d'embryons permettra par la suite de lever des doutes sur l'origine des plantes obtenues après régénération; en effet certaines talles peuvent parfois se séparer spontanément. Quelques tours du Scel.O.frais autour de chaque boîte de Pétri de 90mm permettent de conserver une humidité suffisante et de maintenir la stérilité du milieu.

II.8. Développement des plantules

Suivant toujours le même protocole de [de Buyser et al., \(2002\)](#), les boîtes contenant les embryons repiqués pour la formation des plantes ont été placées dans une enceinte éclairée 16heures ($35\mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$) et régulée à $25^\circ\text{C}\pm 1$.

II.9. Comptage des plantes.

Après 3 semaines de culture des embryons sur le milieu de régénération, les plantes vertes, albina, chimériques et anthocyaniques ayant développé un système racinaire ainsi que les structures non régénérées en plantes ont été dénombrées.

II.10. Les paramètres d'appréciation des résultats obtenus en culture *in vitro* des microspores isolées

Il faut tout d'abord définir les unités expérimentales sur lesquelles les paramètres sont mesurés.

L'unité expérimentale la plus simple est l'ensemble des microspores extraites à partir des épis prélevés en même temps, sur un cultivar donné et ayant subi un même prétraitement. L'unité expérimentale est donc le génotype.

Les paramètres androgénétiques mesurés sont indiqués dans le [tableau 2](#).

II.11. Observations cytologiques

L'observation cytologique des microspores avant extraction ou de leur évolution en cours de culture, a été faite à l'aide d'un microscope inversé soit en lumière transmise, soit en fluorescence après coloration d'échantillons au DAF (Di Acétate de Fluoresceine) et /ou au DAPI (4', 6 Diaminido-2-Phénylindole) ([figures 15 et 16](#)).

Un prélèvement en conditions stériles a été réalisé à partir des boîtes de culture.

II.11.1. Le Di Acétate de Fluoresceine: D.A.F

Le DAF est un colorant cytologique à action immédiate (observation directe). Il donne une fluorescence en vert pistache ([figure 15](#)) au cytoplasme. C'est un test de viabilité utilisé soit pour les microspores, soit pour les grains de pollen. Les microspores qui ne donnent pas un cytoplasme fluorescent sont noires : ce sont des microspores mortes, non viables. Par contre celles qui fluorescent donnent des embryons après leurs culture dans des conditions optimales.

a. Préparation de la solution

Dans une petite boîte de Pétri de 35 mm de diamètre (non stérile), un volume de 1,5 ml du milieu CHB3 (un vieux milieu) a été ajouté avec quelques volumes de la suspension des microspores (de préférence sur du matériel frais) et quelques gouttes du colorant DAF préalablement stocké au congélateur à -20°C ([annexe 5](#)).

Sur une lame propre, déposer une aliquote au milieu de la lame, puis la couvrir avec une lamelle.

b. Observation au microscope inversé

Tout d'abord, il faut chercher la mise au point (en photonique) en utilisant l'objectif de faible grossissement; ensuite introduire les filtres UV.

Les microspores viables sont fluorescentes en vert pistache, seules les vacuoles restent sombres.

II.11.2. Le 4', 6 Di Aminido-2-Phényl Indole: D.A.P.I

Le DAPI est un autre colorant cytologique à action lente (de quelques heures). Il se fixe spécifiquement sur l'ADN. Eclairé en lumière ultra-violette (maximum 372 nm), il émet une fluorescence bleue ([figure 16](#)) (maximum 456 nm) pour les structures nucléaires et les chromosomes et à faible intensité pour la paroi. Il est utilisé pour une détermination fiable du stade de la gamétogenèse.

a. Préparation de la solution

Dans une petite boîte de pétri de 35 mm de diamètre (non stérile) ajouter:

1,5 ml du milieu de CHB3 (milieu vieux), quelques volumes de la suspension des microspores (de préférence sur du matériel frais) plus quelques gouttes de DAPI (préalablement stocké à -20°C). Laisser une demi-journée voire une journée avant l'observation au microscope inversé. Entre une lame et lamelle, placer une goutte de la solution préparée et observer l'échantillon ([annexe 5](#)).

b. Observation au microscope inversé

Après la mise au point toujours en photonique, introduire les filtres UV.

Le DAPI colore le noyau. Les structures nucléaires et les chromosomes fluorescent en bleu blanc brillant. Les parois polliniques sont peu marquées.

II.11.3. Possibilité d'associer les deux colorants pour une seule observation

a. Préparation

Dans une petite boîte de Pétri de 35 mm de diamètre (non stérile) ajouter:

1,5 ml du milieu CHB3 (vieux milieu), quelques volumes de la suspension des microspores (de préférence sur du matériel frais), quelques gouttes du colorant DAF et quelques gouttes du colorant DAPI.

b. Observation au microscope inversé

Pour le DAF, la réaction est immédiate: c'est une observation directe. Pour le DAPI, laisser la préparation de une demi-journée à une journée avant l'observation.

Placer entre une lame et lamelle quelques gouttes de la solution préparée.

En changeant les filtres d'UV, on peut observer les deux colorations en même temps.

Les préparations du DAF et DAPI se conservent pendant plusieurs jours au froid (à 4°C).

Pour cela placer les petites boîtes de 35 mm de diamètre dans une grande boîte de 90 mm de diamètre, ensuite bien couvrir l'ensemble avec un couvercle.

II.12. Fertilité et niveau de ploïdie des plantes obtenues

Une partie des plantes androgénétiques obtenues a été suivie en chambre de culture, d'une part pour confirmer les caractères morphologiques de type *Triticum durum* et d'autre part afin de contrôler leur niveau de ploïdie (haploïde ou haploïde doublé) par l'analyse de la fertilité des épis après ensachage de ceux-ci: en même temps confirmer leur fertilité par un comptage chromosomique.

II.13. Tests statistiques

En présence des résultats obtenus sur la culture *in vitro* de microspores isolées nous avons cherché à évaluer le sens de l'information obtenue. On dispose actuellement de nombreux tests statistiques qui peuvent être utilisés pour arriver à une décision concernant une hypothèse. Par ailleurs le choix de la méthode statistique doit se faire sur des bases rationnelles. On dispose pour cela d'une large panoplie de tests statistiques parmi lesquels il faudra choisir ceux qui s'adaptent le mieux à nos types de données. Un panorama de tests statistiques existe. Il est donc judicieux de choisir ceux qui répondraient le mieux à nos objectifs. Le choix du test applicable dépend du type de la variable et de l'objectif poursuivi. Fisher, Kendall, Student, Pearson,..... Autant de noms familiers à tous ceux qui ont manipulé un jour ou l'autre des statistiques et des probabilités. Les tests d'hypothèse associés à ces

noms de mathématiciens ou statisticiens sont aujourd'hui très largement utilisés dans de nombreux domaines de recherche, pour évaluer le caractère significatif des observations recueillies.

Un traitement statistique a été réalisé sur les données obtenues en culture *in vitro* de microspores isolées. La statistique inférentielle, qui vise à tester des hypothèses et faire des prédictions à partir des données a été appliquée. Le but primordial de notre étude statistique est d'analyser les données obtenues pour savoir si elles sont dues au hasard ou si elles recèlent des informations intéressantes. L'objectif principal est de déterminer si un prétraitement est plus efficace que les autres. En d'autres termes *y a-t-il une différence significative entre les prétraitements, et si oui, comment peut-on les classer?*

L'hypothèse à tester est appelée H_0 ou hypothèse nulle. Elle s'accompagne impérativement de son hypothèse alternative appelée H_1 . Le test s'attache à valider ou à rejeter H_0 (et par conséquent à tirer la conclusion inverse pour H_1). Ces hypothèses sont toujours formulées par rapport à la population globale, alors que le test porte sur les observations effectuées dans le cadre de l'échantillon. Ces tests calculent, à partir des écarts entre les valeurs réelles et les valeurs théoriques, une valeur que l'on compare à un seuil critique (seuil de signification du test (nommé alpha), soit, de 0,05 ou 0,01 dans la table statistique correspondante. Ces derniers correspondent respectivement à 95% ou 99% de chances de rejeter l'hypothèse nulle en affirmant la présence d'un certain effet, ou bien de l'accepter. Un seuil de signification (appelé aussi seuil de rejet) doit impérativement être décidé **avant** l'analyse des données.

Si le résultat du test amène à accepter l'hypothèse nulle H_0 , le chercheur en déduit qu'il ne peut rien conclure à partir des observations concernées, la probabilité que la répartition soit due au hasard étant élevée. En revanche, le rejet de H_0 signifie que la répartition des réponses recèle des informations particulières qui ne semblent pas être dues au hasard et qu'il convient d'approfondir.

Il est utile de rappeler que l'androgenèse *in vitro* est un phénomène rare. Les données sont faibles (même dans les meilleures conditions et en présence des génotypes les plus performants) et sont exprimées en pourcentages. Dans cette étude, nous décrivons les principaux tests statistiques utilisés, ainsi que leurs objectifs et leur mode de mise en œuvre.

II.13.1. Test de comparaison de pourcentage

Le test de comparaison de pourcentage permet de comparer des résultats obtenus pour une variable, sur deux groupes d'observations, en vue de déterminer si ces résultats sont significativement différents d'un groupe à l'autre. Notons qu'il n'est utilisable que pour des échantillons supérieurs ou égaux à 5 individus. Le test de comparaison de deux pourcentages est un test paramétrique extrêmement utile pour évaluer la différence entre deux échantillons indépendants pour une modalité de réponse donnée.

Les proportions sont assimilables à des moyennes (Véronis 2002) et on peut, sous certaines conditions (Np et $N(1-p) \geq 5$) traiter les tests d'hypothèses sur les proportions comme ceux sur les moyennes. On peut étendre la même logique aux comparaisons de deux proportions d'échantillons comme dans le cas d'un test t. Comme pour les moyennes, il va falloir estimer la variance de la population à partir de celles des deux échantillons.

Lorsque nous avons des données en pourcentages pour deux échantillons indépendants on peut calculer la variable z dont la formule est indiquée ci-dessous (<http://www.up.univ-mrs.fr/veronis/cours/INFZ16/index.html>).

Un test z de comparaison de pourcentages (deux échantillons indépendants) utilisant la formule ci dessous, a été effectué sur les résultats androgénétiques (embryogenèse et conversion *in vitro* des embryons en plantes après leur repiquage sur MS0). Ce test a été utilisé afin d'évaluer la signification de l'effet des différents prétraitements sur la production d'embryons et les paramètres déterminant la régénération: régénération en plantes vertes, en plantes albina, régénération totale et enfin embryons non régénérés (absence de régénération). Aussi le test z a été appliqué afin de déterminer la signification variétale pour un prétraitement donné.

Ainsi nous pouvons répondre à notre question initiale: *y a-t-il une différence significative entre les prétraitements, et si oui, comment peut-on les classer ?* A partir des résultats obtenus, le test de comparaison de pourcentages, a été appliqué à l'ensemble des couples de différences possibles. Le risque de 5% et de 1% que nous avons choisi est utilisé pour déterminer la valeur critique z, qui est comparée à la différence entre les moyennes normées.

Soient N_1 et N_2 les effectifs des deux échantillons indépendants, c'est-à-dire les tailles respectives de ces échantillons,

P_1 et P_2 les proportions ou pourcentages observés dans chacun des 2 échantillons à comparer (échantillons = génotypes, ou bien prétraitements). On calcule la statistique z par la formule indiquée ci-dessous. Pour appliquer la statistique z il faut que les deux échantillons respectent la règle suivante:

les valeurs de NP et N (1-P) doivent être supérieures ou égales à 5.

$$Z = \frac{|P_1 - P_2|}{\sqrt{\frac{P(1-P)}{N_1} + \frac{P(1-P)}{N_2}}}$$

Et pour P dont la formule est la suivante (<http://www.up.univmrs.fr/veronis/cours/INFZ16/index.html>):

$$P = \frac{N_1P_1 + N_2P_2}{N_1 + N_2}$$

Les effectifs dans les deux échantillons sont respectivement N_1P_1 et N_2P_2 . Comme on connaît l'effectif total ($N_1 + N_2$) il est possible d'en déduire la proportion combinée.

Si le $|z|$ calculé est supérieur à z alpha (1,96 pour $\alpha = 0,05$), alors le test est significatif à 5% près en formulation bilatérale. On rejette H_0 ($H_0 =$ absence de différence). Il existe une différence statistiquement significative entre les deux proportions observées. Le pourcentage observé P_1 est significativement différent du pourcentage P_2 .

Si le $|z|$ calculé est supérieur à z alpha (2,57 pour $\alpha = 0,01$), alors le test est significatif à 1% près en formulation bilatérale.

Si le $|z|$ calculé est inférieur à z alpha (1,96 et 2,57) pour des risques de 5% et 1% respectivement), alors il n'y a aucune raison de rejeter l'hypothèse H_0 ($P_1 = P_2$) dans le cas de test bilatéral. Le pourcentage observé p_1 n'est pas significativement différent du pourcentage observé P_2 .

Comme pour l'embryogenèse le même procédé a été appliqué aux données concernant la régénération (ou la conversion) des embryons après leur repiquage sur le MS0. Un test statistique de comparaison de pourcentages par couple de génotypes, utilisant la formule ci-dessus, a été effectué afin d'évaluer la signification de l'effet des différents prétraitements sur l'obtention de plantes vertes, albina, ou l'absence de régénération.

La variable z a une distribution normale. Pour certains essais les données ont été transformées en $\arcsin \sqrt{p}$

II.13.2. Analyses de variances

Une analyse de variance (abréviation ANOVA, «analysis of variance») à un ou deux facteurs à effet fixe au seuil de signification de 5% et de 1% a été appliquée pour les résultats de l'androgenèse *in vitro*. Les données recueillies étant calculées sous forme de pourcentages (voir tableaux chapitres 1, 2 et 3), ceux-ci ont été transformés en $\arcsin \sqrt{p}$. Dans le cas d'une analyse de variance à deux facteurs on parle d'analyse de variance factorielle. L'effet variétal, l'effet des prétraitements ainsi que l'effet d'une interaction variété- prétraitement ont été comparés par le test F.

Certains essais ont été analysés par des analyses de variance à un facteur au seuil de 1 % : on a pu, non seulement calculer la variance due aux prétraitements mais également celle due aux blocs. Ces variances ont été comparées par des tests F.

A quoi sert cette méthode statistique ANOVA?

L'analyse de variance est une extension des tests effectués sur deux moyennes, comme le t-test. Elle sert à comparer les moyennes obtenues par des groupes de sujets indépendants qui se différencient sur un, deux ou plusieurs facteurs. Cette méthode est utilisée dans le but de voir s'il existe au moins une différence entre les moyennes obtenues par ces groupes pour un seuil de signification choisi (généralement 5%).

En culture *in vitro* de microspores isolées, on souhaite évaluer en premier lieu les effets de différents prétraitements qui ont été testés respectivement sur les différentes variétés (individus). En [analyse de variance](#), le paramètre susceptible d'influer sur les [données](#) étudiées s'appelle un *facteur*, et ses valeurs sont les *modalités* (ici les différents prétraitements).

On cherche à savoir si la variabilité observée dans les [données](#) est uniquement due au hasard, ou s'il existe effectivement des différences significatives entre les groupes, imputables au facteur. Pour cela, on va comparer les [variances empiriques](#) de chaque échantillon, à la [variance](#) de l'échantillon global, de taille n . La moyenne des [variances](#) (pondérée par les

effectifs) résume la variabilité à l'intérieur des groupes, d'où le nom de variance [intra-groupes](#), ou [variance résiduelle](#). La variance des [moyennes](#) décrit les différences entre groupes qui peuvent être dues au prétraitement, d'où le nom de variance [intergroupes](#), ou variance [expliquée](#).

Si les prétraitements ont effectivement un effet sur la réponse androgénétique, on s'attend à ce que la [variance expliquée](#) soit grande, comparée à la [variance résiduelle](#). La décomposition de la [variance](#) de l'[échantillon](#) global en [variance expliquée](#) et [variance résiduelle](#) est explicitée dans le résultat suivant:

Le test [ANOVA](#) consiste donc à rejeter l'égalité des moyennes (accepter qu'il y a un effet des prétraitements) quand le rapport pondéré de la [variance expliquée](#) (inter-groupes) à la [variance résiduelle](#) (intra-groupes) est significativement trop grand par rapport aux [quantiles](#) de la loi. Bien que le modèle soit différent, la procédure de test est rigoureusement identique. Pour une ANOVA à deux facteurs indépendants, on parle d'analyse de variance *factorielle* pour désigner de telles situations dans lesquelles deux facteurs ou plus sont étudiés simultanément. Le grand avantage de cette forme d'analyse est qu'elle permet de détecter des interactions entre facteurs.

Comment faire une ANOVA à un ou deux facteurs suivie de règle de décision?

Nos données ont été récoltées à partir des résultats obtenus en culture *in vitro* des microspores isolées. Ces données ont été introduites sur Excel pour être mises en forme, ce qui nous a permis d'effectuer une ANOVA à mesures répétées pour mettre en évidence les différences entre les conditions, ANOVA équilibrée puisque le nombre de répétitions est le même pour les différents groupes. Une feuille Excel contient les données qui correspondent à des ANOVA à un ou deux facteurs indépendants : on parle d'analyse factorielle pour désigner de telles situations. En utilisant l'outil d'ANOVA d'Excel (ANOVA à un ou deux facteurs avec répétition d'expériences) nous cherchons à déterminer s'il existe une différence significative de l'effet facteur dans le cas d'une ANOVA à un facteur : comme pour l'analyse de variance à deux facteurs, quel est le prétraitement le plus efficace et quelle est la variété la plus androgénétique (celle qui répond mieux)?

Règle de décision ou la statistique de décision:

Il suffit de calculer et de comparer la valeur obtenue à la valeur lue dans la table de Fisher au seuil σ choisi au préalable (par exemple, au seuil 5%). Il faut donc lire la table de Fisher avec de degrés de liberté en ligne et en colonne

- Si la valeur de F calculée est plus grande que la valeur de F critique (lue dans une table de Fisher au risque α choisi), l'hypothèse d'égalité des moyennes (H_0) est rejetée. Il y a une différence significative, donc au moins une des moyennes est différente des autres de manière significative

-Si la valeur de F calculée est plus petite que la valeur de F«critique» au risque α , on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle (il n'y aucune raison de rejeter l'hypothèse H_0). Il n' y a pas de différence significative: les moyennes des groupes sont égales.

Pour ce qui concerne la régénération androgénétique ou la conversion des embryons après leur repiquage sur MS0, nous ne faisons pas d'analyse de variance, puisqu'il s'agit d'un phénomène rare (même si nos résultats sont nettement supérieurs à ceux de la culture d'anthères: le nombre des données dont on dispose en culture *in vitro* des microspores isolées est trop faible. En effet, les pourcentages d'embryons poursuivant leurs développements et donnant des plantes est en moyenne de l'ordre de 1 à 70 microspores pour 10 000 donnant un embryon, il est donc difficile d'envisager d'effectuer une ANOVA. Nous commenterons ces valeurs à l'aide de représentations graphiques.

Pour les plantes chimériques et anthocyaniques (phénomène très rare à obtenir en culture *in vitro* de microspores isolées chez le blé dur), aucun test statistique n'a pu être utilisé pour ce type de plantes.

II.13.3. Calcul des écart-types

Lorsqu'on a des données en pourcentages sur deux échantillons indépendants on peut calculer la variable «s». L'écart-type correspond à la formule habituelle (<http://www.up.univ-mrs.fr/veronis/cours/INFZ16/index.html>):

$$s = \sqrt{p(1-p)}$$

où p est la proportion ou le pourcentage calculé.

Références bibliographiques

- Albertini L, Souvré A, Audran JC.** 1987. Le tapis de l'anthere et ses relations avec les microsporocytes et les grains de pollen. *Rev Cytol Biol Végét-Bot* 10: 211-242.
- Amssa M, de Buyser J, Henry Y.** 1980. Origine des plantes diploïdes obtenues par culture *in vitro* d'anthers de Blé tendre (*Triticum aestivum* L.): influence du prétraitement au froid et de la culture *in vitro* sur le doublement. *C.R. Acad. Sc. Paris* 290, D: 1095-1097.
- Andersen SB, Due I.K, Olesen A.** 1987. The response of anther culture in a genetically wide material of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Breeding* 99, 3: 181-186.
- Asselin de Beauville M.** 1980. Obtention d'haploïdes *in vitro* à partir d'ovaires non fécondées de riz, *Oryza sativa* L. *C. R. Acad. Sci. Paris* 296, série D: 489-492.
- Bajaj YPS.** 1990. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry. Haploids in crop improvement*, vol 12, Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 1-44.
- Barany I, Testillano PS, Mityko J, Risueno MC.** 2001. The switch of the microspore program in *Capsicum* involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants. *International Journal of Developmental Biology* 45: 39-40.
- Barany I, Gonzalez-Melendi P, Fadon B, Mityko J, Risueno MC, Testillano PS.** 2005. Microspore derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annum* L): subcellular rearrangements through development. *Biology of the Cell* 97: 709-722.
- Barloy D, Denis L, Beckert M.** 1989. Comparison of the aptitude for anther culture in some androgenetic doubled haploid maize lines. *Maydica* 4: 303-308.
- Barloy D, Beckert M.** 1993. Improvement of regeneration ability of androgenetic embryos by early anther transfer in maize. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 33: 45-50.
- Barnabas B, Szakacs E, Karsai I, Bedo Z.** 2001. *In vitro* androgenesis of wheat: from fundamentals to practical application. *Euphytica* 119:211-216.
- Bedinger P.** 1992. The remarkable biology of pollen. *The Plant Cell* 4: 879-887.
- Benkirane H, Sabounji K, Chlyah A, Chlyah H.** 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 61:107-113.
- Bennet MD, Hughes WG.** 1972. Additional mitosis in wheat pollen induced by Ethrel. *Nature* (Lond.) 240: 566-568.
- Bernard S.** 1977. Etude de quelques farceurs contribuant à la réussite de l'androgénèse par culture d'anthers *in vitro* chez le Triticale hexaploïde. *Ann.Amelior. Plantes* 27 : 639-655.

- Bohorova NE, Pfeiffer WH, Mergoum M, Crossa J, Pacheco M, Estañol P.** 2001. Regeneration potential of CIMMYT durum wheat and triticale varieties from immature embryos. *Plant Breed* 120:291–295.
- Bolik M, Koop HU.** 1991. Identification of embryogenic microspores of barley (*Hordeum vulgare* L.) by individual selection and culture and their potential for transformation by microinjection. *Protoplasma* 162:61–68
- Bommineni VR, Jauhar PP.** 1996. Regeneration of plantlets through isolated scutellum culture of durum wheat. *Plant Sci* 116:197–203.
- Bourgin JP, Nitsch JP.** 1967. Obtention de *Nicotiana* haploïdes à partir d'étamines cultivées *in vitro*. *Ann. Physiol. Veg* 9:377-382.
- Bruins MBM, Snijders CHA.** 1995. Inheritance of anther culture derived green plantlet regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 43:13–19.
- Cagnet-Sitbon M.** 1980. Production of haploid *Gerbera jamesonii* plants by culture of unfertilized ovules. *Agronomie* 1: 807-812.
- Caredda S, Clément C.** 1999. Androgenesis and albinism in Poaceae: influence of genotype and carbohydrates. In Clément C, Pacini E, Audran JC (eds) *Anther and pollen: from biology to biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp 211-228.
- Caredda S, Devaux P, Sangwan RS, Clément C.** 1999. Differential development of plastids during microspore embryogenesis in barley. *Protoplasma* 208: 248-256.
- Caredda S, Doncoeur C, Devaux P, Sangwan RS, Clément C.** 2000. Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Sex Plant Reprod* 13: 95–104.
- Caredda S, Devaux P, Sangwan RS, Prout I, Clément C.** 2004. Plastid ultrastructure and DNA related to albinism in androgenetic embryos of various barley (*Hordeum vulgare*) cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76: 35-43.
- Castillo AM, Vallés MP, Cistué L.** 2000. Improvements in barley androgenesis for plant breeding. In: *Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells* (B. Bohanec ed.). COST 824, Bled, Slovenia 1-5 July 2000: 15-21.
- Caswell K, Leung N, Chibbar RN.** 2000. Regeneration of fertile plants from immature inflorescences of four Canadian spring wheat cultivars. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 60:69–73.

- Cattaneo M, Qiao YM, Pogna NE.** 1991. Embryoid induction and green plant regeneration from cultured anthers in a *durum* wheat line homozygous for the 1BL/1RS translocation. *Journal Genet Breed* 45: 69–372.
- Cauderon Y, Cauderon A.** 1956. Etude des hybrides F1 entre *Hordeum bulbosum* et *Hordeum secalinum*. *Ann. Inst. Rech. Agron. Paris, Series B*, 6: 307-317.
- Charmet G, Vedel F, Bernard M, Bernard S, Mathieu C.** 1985. Cytoplasmic variability in androgenetic doubled haploid lines of triticale. *Agronomie* 5: 709-717.
- Chen CC.** 1976. Studies on the anther culture of rice pollen stage and low temperature treatment. *Nat Sci Counc Taipei* 4(2): 2187.
- Chen ZH.** 1986. Induction of androgenesis in woody plants. In: Hang, H., Hongyuan, Y., (Eds.), *Haploids of higher plants in vitro*. China Academic Publishers, Beijing and Sringer-Verlag, Berlin pp 42-66.
- Chu CC.** 1978. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In: *Proceedings of Symposium of Plant Tissue Culture*, Science Press, Beijing, China, pp 43-50.
- Cho MS, Zapata FJ.** 1988. Callus formation and plant regeneration in isolated pollen culture of rice (*Oryza sativa* L. Taipei 309). *Plant Sci* 58: 239-244.
- Chowdhury SH, Kato K, Yamamoto Y, Hayashi K.** 1991. Varietal variation in plant regeneration capacity from immature embryo among common wheat cultivars. *Jpn J Breed* 41:443–450.
- Chu CC, Hill RD, Brule-Babel AL.** 1990. High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. On monosaccharide containing media. *Plant Science* 66: 255-262.
- Chuong PK, Beversdorf WD.** 1985. High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *Brassica carinata* Braun. *Plant Sci* 39: 219-226.
- Cistué L, Ramos A, Castillo AM.** 1999. Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 159-166.
- Cistué L, Soriano M, Castillo AM, Vallés MP, Sanz JM, Echavarri B.** 2006. Production of doubled haploids in *durum* wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports* 25: 257–264.
- Comeau A, Nadeau P, Plourde A, Simard R, Maès O, Kelly S, Harper L, Lettre J, Landry B, St-Pierre CA.** 1992. Media for *in ovulo* culture of pro-embryos of wheat and wheat derived interspecific hybrids and haploids. *Plant. Sci* 81: 117-125.
- Corduan G.** 1975. Regeneration of anther-derived plants of *Hyoscyamus niger* L. *Planta*

127: 27-36.

- Coumans MP, Sohota S, Swanson EB.** 1989. Plant development from isolated microspores of *Zea mays* L. *Plant Cell Rep* 7: 618-621.
- Creissen G, Smith C, Francis R, Reynolds H, Mullineaux P.** 1990. Agrobacterium and microprojectile mediated viral DNA delivery into barley microspore-derived cultures. *Plant cell reports* 8 (11): 680-683.
- Cresti M, Blackmore S, van Went JL.** 1992. Atlas of sexual reproduction in flowering plants. Cresti M, Blackmore S and van Went JL Eds, Springer-Verlag, 249p.
- Custers JBM, Cordewener JHG, Nöllen Y, Dons JJM, van Lookeren Campagne MM.** 1994. Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Rep* 13: 267-271.
- Dale PJ.** 1975. Pollen dimorphism and anther culture in barley. *Planta* 127: 213-220.
- Daniel G.** 1993. Anther culture in rye. Improved plant regeneration using modified MS-media. *Plant Breeding* 110: 259-261.
- Datta SK, Wenzel G.** 1987. Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in *Triticum aestivum* L. *Plant Sci* 48: 49-54.
- Datta R, Chourey PS, Pring DR, Tang HV.** 2001. Gene-expression analysis of sucrose-starch metabolism during pollen maturation in cytoplasmic male-sterile and fertile lines in sorghum. *Sexual Plant Reproduction* 14: 127-134.
- Datta R, Chamusco KC, Chourey PS.** 2002. Starch biosynthesis during pollen maturation is associated with altered patterns of gene expression in maize. *Plant Physiology* 130: 1645-1656.
- Davies PA, Morton S.** 1998. A comparison of barley isolated microspore and anther culture and the influence of cell culture density. *Plant Cell Rep* 17: 206-210.
- Day A, Ellis THN.** 1984. Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen: possible basis for maternal inheritance of chloroplasts. *Cell* 39: 359-368.
- Day A, Ellis THN.** 1985. Detected forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. *Curr. Gene.t* 9: 671-678.
- De Buyser J, Henry Y.** 1979. Androgenèse sur des blés tendres en cours de sélection.
1. L'obtention des plantes *in vitro*, *Z. Pflanzenzuecht.* 83: 49-56.
- De Buyser J, Henry Y, Lonnet P, Hertzog R, Hespel A.** 1987. Florin; A doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method. *Plant Breeding* 98: 53-56.

- De Buyser J, Touraine, Ambroise A, Picard E.** 1998. Induction of androgenetic embryos and chlorophyllian plants of *Triticum aestivum* from isolated microspore culture, in: A.E. Slinkard (Ed.), Proc. 9th Int. Wheat Genetics Symposium, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, vol. 3, 2–7 August 1998, pp. 175–177.
- De-Buyser J, Touraine P, J'Aïti F, Haïcour R, Picard E.** 2002. Haplodiploïdisation par culture de microspores isolées de blé *in vitro*. In: Tec Doc, Biotechnologies végétales techniques de laboratoire. Lavoisier, Londres, Paris, New York, 257-273.
- De Buyser J, Labbani Z, Richard N, Picard E.** 2004. Isolated microspore culture in durum wheat : effect of pretreatments. Working Group 1 Workshop on: "Technology advancement in gametic embryogenesis of recalcitrant genotypes" Palermo, 11-13 November, 2004.
- Deimling S, Flehinghaus T, Schneider I, Geiger HH.** 1990. Influence of post-planting temperature and carbohydrate source in maize and rye anther culture. In: Abstracts 7th International Congress Plant Tissue Cell Culture, Amsterdam, 1990.
- Deimling S, Flehinghaus-Roux T.** 1997. Haploidy in rye. In Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE (eds) *In vitro* haploid production in higher plants. 4. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp181-204.
- Demarly Y.** 1975. Anther and pollen culture for production of haploids. Their utilization in plant breeding. Proc. Cong. Eucarpia "Ploidy in Fodder Plants", Zürich, 142-154.
- Dickinson HG.** 1992. Microspore derived embryogenesis. In : Sexual Plant Reproduction, Cresti M and Tiezzi A Eds, Springer-Verlag, pp 1-16.
- Dieu P, Beckert M.** 1986. Further studies of androgenetic embryo production and plant regeneration from *in vitro* cultured anthers of maize (*Zea mays* L.). *Maydica* 31: 245-259.
- Dogramaci-Altuntepe M, Peterson TS, Jauhar PP.** 2001. Anther culture-derived regenerants of *durum* wheat and their cytological characterization. *The Journal of Heredity* 192(1): 56–64.
- Doré C, Marie F.** 1993. Production of gynogenetic plants of onion (*Allium cepa* L.) after crossing with irradiated pollen. *Plant Breeding* 111: 142-147.
- Duncan EJ, Heberle E.** 1976. Effect of temperature shock on nuclear phenomena in microspores of *Nicotiana tabacum* and consequently on plantlet production. *Protoplasma* 90:173–177
- Dunford RP, Walden RM.** 1991. Plastid genome structure and plastid –related transcript levels in albino barley plants derived from anther culture. *Curr Genet* 20: 339-347.

- Dunwell JM.** 1978. Division and differentiation in culture pollen. In: Thorpe TA (ed) Frontiers of plant tissue culture. Univ Press, Calgary, Canada, pp 102-112.
- Ekiz H, Konzak CF.** 1991. Nuclear and cytoplasmic control of anther culture in wheat: I. Analysis of alloplasmic lines. *Crop. Sci* 31, 6: 1421-1427.
- Engvild KC.** 1974. Plantlet ploidy and flower-bud size in tobacco anther cultures. *Hereditas* 76: 320-322.
- Fedak G.** 1977. Haploids from barley x rye crosses. *Can J Genet Cytol* 19: 15-19.
- Ferrie AMR, Taylor DC, MacKenzie SL, Keller WA.** 1999. Microspore embryogenesis of high *sn-2* erucic acid *Brassica oleracea* germplasm. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 57:79–84.
- Filonova LH, Bozhkov PV, Brukhin VB, Daniel G, Zhivotovsky B, von Arnold S.** 2000. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *Journal of Cell Science* 113: 4399–4411.
- Flehinghaus T, Deimling S, Geiger HH.** 1991. Methodical improvements in rye anther culture. *Plant Cell Rep*10: 397–400.
- Foroughi-Wehr B, Friedt W, Wenzel G.** 1982. On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. *Theor. Appl. Genet.* 62: 233-239.
- Foroughi-Wehr B, Zeller FJ.** 1990. *In vitro* microspore reaction of different German wheat cultivars. *Theor Appl Genet* 79: 77-80.
- Gaillard A, Vergne P, Beckert M.** 1991. Optimization of maize microspore isolation and culture conditions for reliable plant regeneration. *Plant Cell Reports* 10: 55–58.
- Gains EF, Aase HC.** 1926. A haploid wheat plant. *Am J Bot.* 13: 373-385.
- Genovesi AD, Collins GB.** 1982. *In vitro* production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Sci* 22: 1137- 1144.
- Ghaemi M, Sarrafi A, 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.
- Ghaemi M, Sarrafi A, Alibert G.** 1995. Influence of genotype, media composition, cold pretreatment and their interactions on androgenesis in *durum* wheat (*Triticum turgidum*). *Cereal Res Commun* 23(3): 215–227.
- Gonzalez JM, Friero E, Jouve N.** 2001. Influence of genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration from immature embryos of *Triticum turgidum* Desf. Cultivars. *Plant Breed* 120:513–517.

- Gresshoff PM, Doy CH.** 1974. Derivation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of meiotic development of anthers for haploid culture of this and other genera. *Z. Pflanzenphysiol* 73: 132-414.
- Gu HH, Hagberg P, Zhou WJ.** 2004. Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Growth Regulation* 42: 137-143.
- Guha S, Maheshwari SC.** 1964. *In vitro* production of embryos from anthers in *Datura*, *Nature* 204:139–144.
- Guha S, Mukherjee S.** 1973. Genotypic difference in the *in vitro* formation of embryoids from rice pollen. *J Exp Bot* 24: 139-144.
- Hadwiger M.A, Heberle-Bors E.** 1986. Pollen plant production in *Triticum turgidum*. In: Genetic Manipulation in Plant Breeding, Proc. Int. Symp. organized by EUCARPIA. Berlin, Germany, pp. 303-305.
- Harlan, J.R.** 1971. Agricultural origins: centers and noncenters. *Science* 174:468-474.
- Hassawi DS, Liang GH.** 1990. Effect of cultivar, incubation temperature and stage of microspore development on anther culture in wheat and triticale. *Plant Breeding* 105: 332-336.
- Hause G, Hause B.** 1996. Induction of embryogenesis in isolated microspores and pollen of *Brassica napus* L. Thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands
- He DG, Ouyang JW.** 1984. Callus and plantlet formation from cultured wheat anthers at different developmental stages. *Plant Sci. Letters.* 33: 71-79.
- He G, Zhang J, Li K, Xiong Z, Chen M, Chang J, Wang Y, Yang G, Barnabas B.** 2006. An improved system to establish highly embryogenic haploid cell and protoplast cultures from pollen calluses of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (in press)*.
- Heberle-Bors E, Reinert J.** 1977. Factors of haploid production by isolated pollen cultures. *Naturwissenschaften* 64: 100.
- Heberle-Bors E, Reinert J.** 1979. Androgenesis in isolated pollen cultures of *Nicotiana tabacum* L.: dependence upon pollen development. *Protoplasma* 99: 237-245.
- Heberle-Bors E.** 1983. Induction of embryogenic pollen grains and subsequent embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. by treatments of the pollen donor plants with feminizing agents. *Physiol Plant* 59: 67-72.
- Heberle-Bors E.** 1985. *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review. *Theor Appl. Genet* 71 : 361-374.

- Henry Y, de Buysen J.** 1980. Androgenèse sur des blés tendres en cours de sélection. 2-
L'obtention des grains. *Z. Pflanzenzuchtg* 84 : 9-17.
- Henry Y, de Buysen J.** 1981. Float culture of wheat anthers. *Theor Appl Genet* 60: 77-79.
- Henry Y, de Buysen J.** 1985. Effect of 1B/1R translocation on anther culture ability in wheat
(*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports* 4: 307-310.
- Henry Y, de Buysen J.** 1990. Wheat anther culture: agronomic performance of doubled
haploid lines and the release of a new variety "Florin". In: Bajaj YPS (ed)
Biotechnology in agriculture and forestry, vol 13, wheat. Springer, Berlin Heidelberg
New York, pp 285–352.
- Hoekstra S, van Zijderveld MH, Louwerse JD, Heidekamp F, van der Mark F.** 1992.
Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. *Plant Science* 86:89–
96.
- Hoekstra S, van Bergen S, van Brouwershaven IR, Schilperoort RA, Heidekamp F.**
1996. The interaction of 2,4-D application and mannitol pretreatment in anther and
microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. *Journal of Plant Physiology* 148,
696–700.
- Hoekstra S, van Bergen S, van Brouwershaven IR, Schilperoot RA, Wang M.** 1997.
Androgenesis in *Hordeum vulgare* L: effects of mannitol, calcium and abscisic acid on
anther pretreatment. *Plant Science* 126: 211–218.
- Holme IB, Olesen A, Hansen NJP, Anderson SB.** 1999. Anther and isolated microspore
culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe. *Plant Breeding*
118: 111-117.
- Horner M, Street E.** 1978. Pollen dimorphism origin and significance in plant pollen
formation by anther culture. *Ann Bot* 42: 763-777.
- Hu H.** 1997. *In vitro* induced haploids in wheat. In: *In Vitro Haploid Production in Higher
Plants*, vol. 4. (S.M. Jain, S.K. Sopory, R.E. Veilleux, eds.). Kluwer Acad. Publishers,
Dordrecht: 73-97.
- Hu H, Yang HY.** 1986. Haploids of higher plants *in vitro*. China Academy Publishers,
Beijing/Springer-Verlag, Berlin,
- Hu H, Hsi TY, Tseng CC, Ouyang TW, Ching CK.** 1978. Application of anther culture to
crop plants. In: *Frontier of plants tissue culture*, Thorpe TA ed., Offset print serv.
Univ. of Calgary, pp.123-130.
- Hu H, Huang B.** 1987. Application of pollen-derived plants to crop improvement. *Int Rev
Cyt* 107: 293–313.

- Hu TC, Ziauddin A, Simion E, Kasha KJ.** 1995. Isolated microspore culture of wheat *Triticum aestivum* L. in a defined media. I. Effects of pretreatment, isolation methods and hormones. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 31: 79-83.
- Hu T, Kasha KJ.** 1999. A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. *Genome* 42: 432- 441.
- Huang B.** 1986. Ultrastructural aspects of pollen embryogenesis in *Hordeum*, *Triticum* and *Paeonia*. In: Hu H, Hongyuan Y (eds) Haploids of higher plants *in vitro*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 91-117
- Huang BQ, Russell SD.** 1992. Female germ unit: organisation, isolation and function. In:sexual reproduction in flowering plants. Russell SD and Dumas C Eds, *Int Rev Cytol, Acad Press, Inc*, Vol 140, pp 233-296.
- Hunter CP.** 1988. Plant regeneration from microspores of barley, *Hordeum vulgare*. Ph D thesis. Wye College, University of London.
- Indrianto A, Herbele-Bors E, Touraev A.** 1999. Assessment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores. *Plant Science* 143: 71-79.
- Jacoben E, Sopory S.K.** 1978. The influence and possible recombination of genotypes on the production of microspore ambryoids in anther cultures of *Solanum tuberosum* and dihaploid hybrids. *Theor. Appl. Genet.*52: 119-123.
- Jahier J.** 1992. Techniques de cytologie végétale. INRA publication
- Jähne A., Lazzeri PA, Jäger-Gussen M, Lörz H.** 1991. Plant regeneration from embryogenic cell suspensions derived from anther cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 82: 74-80.
- Jähne A, Lörz H.** 1995. Cereal microspore culture. *Plant Sci* 109: 1–12.
- Jahne-Gartner A, Lorz H.** 1999. Protocols for anther and microspore culture of barley. *Methods Mol Biol* 111: 269–279.
- J'Aiti F, Benlhabib O, Sharma HC, El Jaafari S, El Hadrami I.** 1999. Genotypic variation in anther culture and effect of ovary co-culture in *durum* wheat. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 59: 71–76.
- J'Aiti F, El Jaafari S, El Hadrami I, Nachit M, Baum M, De Buyser J, Picard E.** 2000. Problématique de la culture de microspores chez le blé dur *Triticum turgidum* L. var. *durum*. In: Durum wheat improvement in the Mediterranean region: New challenges. Eds C. Royo, MM Nachit, N Di Fonza, JL Araus CIHEAM, CentreUdL-

- IRTA, CIMMYT, ICARDA. Instituto Agronomico Mediterraneo Zaragoza, 12–14 April 2000, pp 149–152.
- Jauhar PP.** 2003a. Haploid and doubled haploid production in durum wheat by wide hybridization. In: Maluszynski M et al (eds) Doubled haploid production in crop plants. Kluwer, pp 161–166
- Jauhar PP.** 2003b. Haploid and doubled haploid production in durum wheat by anther culture. In: Maluszynski M et al (eds) Doubled haploid production in crop plants. Kluwer, pp 167–172.
- Karimzadeh G, Kovács G, Barnabás B.** 1995. Effects of cold treatment and different culture media on the androgenic capacity of two winter wheat genotypes. *Cereal Research Communications* 23: 223-227
- Kasha KJ, Kao KN.** 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) and utilization in barley breeding. *Nature*, (London), 225: 874-876.
- Kasha KJ.** (Ed.) 1974. Haploids in Higher Plants: Advances and Potential. Proceedings of the first International Symposium on haploids, June 10-14, University of Guelph, Canada, pp 421.
- Kasha KJ, Ziauddin A, Cho UH.** 1990. Haploids in cereal improvement: anther and microspore culture. In: Gustafson JP (ed) Gene manipulation in plant improvement II. Plenum Press, New York, pp 213–235.
- Kasha KJ, Hu TC, Oro R, Simion E, Shim YS.** 2001a. Nuclear fusion leads to chromosome doubling during mannitol pretreatment of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores. *Journal of Experimental Botany* 52: 1227-1238.
- Kasha KJ, Simion E, Oro R, Yao QA, Hu TC, Carlson AR.** 2001b .An improved *in vitro* technique for isolated microspore culture of barley. *Euphytica* 120: 379-385
- Kasha KJ, Maluszynski M.** 2003. Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. In: Maluszynski M et al (eds) Doubled haploid production in crop plants. Kluwer, pp 1–4.
- Kernan Z, Ferrie AMR.** 2006 Microspore embryogenesis and the development of a double haploidy protocol for cow cockle (*Saponaria vaccaria*). *Plant cell rep* (in press).
- Kim M, Kim J, Yoon M, Choi DI, Lee KM.** 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 63–72.
- Koul AK, Karihaloo JL.** 1977. *In vivo* embryoids from anthers of *Narcissus bioflorus* curt. *Euphytica* 26: 97-102

- Knudsen S, Due IK, Anderson SB.** 1989. Components of response in barley anther culture. *Plant Breed* 103: 241–246.
- Krautwig B, Lörz H.** 1995. Single androgenetic structures of maize (*Zea mays* L.) for the initiation of homozygous cell suspension and protoplast cultures. *Plant Cell Report* 14: 477-481.
- Kruczkowska H, Pawlowska H, Skucinska B.** 2002. Influence of anther pretreatment on the efficiency of androgenesis in barley. *J Appl Genet* 43(3): 287-296.
- Kuhlmann U, Forough-Wehr B, Graner A, Wenzel G.** 1991. Improved culture system for microspores of barley to become a target for DNA uptake. *Plant Breed* 107:165–168.
- Kumlehn J, Lörz H.** 1999. Monitoring sporophytic development of individual microspores of barley (*Hordeum vulgare* L.). In: Clement C, Pacini E, Audran JC (eds) *Anther and Pollen: from biology to biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 183-189.
- Kuo CS.** 1982. The preliminary studies on culture of unfertilized ovaries of rice *in vitro*. *Acta Bot Sin* 24: 33-38.
- Labrani Z, de Buysier J, Richard N, Picard E.** 2004. Optimisation de la réponse de culture *in vitro* de microspores isolées chez *Triticum turgidum subsp.durum*. *Proceeding IXèmes Journées Scientifiques de l'AUF Lomé Togo* du 4 au 7 octobre 2004. pp81-87.
- Labrani Z, Richard N, de Buysier J, Picard E.** 2005. Plantes chlorophylliennes de blé dur obtenues par culture de microspores isolées: importance de prétraitements. *Comptes Rendus Biologies* 328: 713–723.
- Labrani Z, de Buysier J, Picard E.** 2006. Relation entre le Mannitol et la régénération chlorophyllienne en culture *in vitro* de microspores isolées chez le blé dur. *Proceeding X^{èmes} Journées Scientifiques de l'AUF Constantine Algérie* du 8 au 11 mai 2006. pp 25-26.
- Labrani Z, de Buysier J, Picard E.** 2007. Effect of mannitol pretreatment to improve green plant regeneration on isolated microspore culture in *Triticum turgidum subsp. durum* (Desf.) Husn.) cv. Jennah Khetifa. (*in press*).
- Lam E.** 2004. Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 305–315.
- Lange W.** 1968. Preliminary results from crosses between *Hordeum vulgare* (barley) and *H. bulbosum*. *Tiende Jaarb, 1966-1967, Ned. Givaan. Centrum*, 118-124.
- Laurie DA, Bennett MD.** 1988. The production of haploid wheat plants from wheat x maize crosses. *Theor Appl Genet* 76: 393-397.

- Lazar MD, Schaeffer GW, Baenziger PS.** 1990. The effects of culture environment with genotype on wheat (*Triticum aestivum*) anther culture response. *Plant Cell Reports* 8: 525-529.
- Letarte J, Simion E, Miner M, Kasha KJ.** 2006. Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. *Plant Cell Reports* 24: 691-698.
- Liu W, Zheng MY, Polle EA, Konzak CF.** 2002. Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. *Crop Science* 42: 686-692.
- Li Wenze, Song Zi hong, Jing Kang, Hu Hang.** 1995. Effects of mannitol pretreatment on androgenesis of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Acta Botanica Sinica* 37 (7): 552-557.
- Lu CS, Sharma CH, Ohm HM.** 1991. Wheat anther culture: effect of genotype and environmental conditions. *Plant cell tissue and organ culture* 24: 233-236.
- Mac Donald MV.** 1992. Donor plant growth factors affecting anther culture of maize and sweet corn (*Zea mays* . L.). *Ann Bot* 70: 357-363.
- Magnard JL, Le Deunff E, Domenech J, Rogowsky PM, Testillano PS, Rougier M, Risueno MC, Vergne P, Dumas C.** 2000. Genes normally expressed in the endosperm are expressed at early stages of microspore embryogenesis in maize. *Plant Molecular Biology* 44: 559–574.
- Maraschin SF, Vennik M, Lamers GEM, Spaink HP, Wang M.** 2005a. Time-lapse tracking of barley androgenesis reveals position-determined cell death within pro-embryos. *Planta* 220, 531–540.
- Maraschin SF, Caspers M, Potokina E, Wulfert F, Corredor M, Graner A, Spaink HP, Wang M.** 2005b. Androgenic switch in barley microspores. II. cDNA array analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis. PhD thesis, Leiden University, The Netherlands.
- Maraschin SF, Priester W de, Spaink HP, Wang M.** 2005c. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *J Exp Bot* 56 (417): 1711-1726.
- Matsushima, T., S. Kikuchi, F. Takaiwa and K. Oono.** 1988. Regeneration of plants by pollen culture in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Tissue Cult. Lett.* 5, 78-81.
- McCormick S.** 1993. Male gametophyte development. *The Plant Cell* 5: 1265–1275.

- Mejza SJ, Morgant V, DiBona DE, Wong JR.** 1993. Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum*. *Plant Cell Rep* 12: 149-153.
- Mentewab A, Sarrafi A.** 1997. Influence of genotype and cold pretreatment on the production of embryoids and their regeneration in tetraploid and hexaploid wheats. *Journal Genet and Breed* 51: 59-62.
- Mihamou-Ziyyat A.** 1992. I. Réactions aux températures élevées du blé tendre au cours de l'androgénèse *in vitro* et conséquences sur la physiologie des plantes obtenues. II. Recherches sur les méthodes de production d'haploïdes doublés de blé dur (*Triticum durum* Desf). Thèse de Doctorat, Université Paris Sud XI, 224p.
- Mityko J, Andrasfalvy A, Csilléry G, Fari M.** 1995. Anther culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Breeding* 114: 78–80.
- Moeini A.** 1997. Etude Génétique de l'androgénèse *in Vitro* chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et utilisation des haploïdes pour l'amélioration de cette espèce. Thèse pp 152.
- Mogensen HL.** 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *Am J Bot* 83: 383-404.
- Mouritzen P, Holm PB.** 1994. Chloroplast genome breakdown in microspore cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) occurs primarily during regeneration. *J plant Physiol* 144: 586-593.
- Murashige T, Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Nagata N, Saito C, Sakai A, Kuroiwa H, Kuroiwa T.** 1999a. Decrease in mitochondrial DNA and concurrent increase in plastid DNA in generative cells of *Pharbitis nil* during pollen development. *Eur. J. Cell Biol.* 78: 241–248.
- Nagata N, Saito C, Sakai A, Kuroiwa H, Kuroiwa T.** 1999b. The selective increase or decrease of organellar DNA in generative cells just after pollen mitosis one controls cytoplasmic inheritance. *Planta* 209: 53–65.
- Nijzeki H, Oono K.** 1968. Induction of haploid rice plants from anthers culture. *Proc. Japan, Acad.*, 44: 554-557.
- Nitsch C.** 1974. Pollen culture-a new technique for mass production of haploid and homozygous plants. In: Haploids in higher plants. Advances and potential. Proceedings of the first international symposium on haploids. June 1974. University of Guelph. Kasha ed., 1974, pp.123-135.

- Nitsch C, Norreel B.** 1973. Effet d'un choc thermique sur le pouvoir embryogène du pollen de *Datura innoxia* cultivé dans l'anthere ou isolé de l'anthere. *C R Acad Sci Ser. D*, 276: 303-306.
- Nitsch C, Gautheret R.** 1974. La culture de pollen isolé sur milieu synthétique. *C R Acad Sc Paris*, 278: 1031-1034.
- Nitsch C.** 1977. Culture of isolated microspores. In Reinert J and Bajaj Y.P.S (eds) Applied and fundamental aspects of Plant Cell Tissue, and Organ Culture. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 66-91.
- Nitsch C, Andersen S, Godars M, Neuffer M. G, Sheridan W. F.** 1982. Production of haploid plants of *Zea mays* and *Pennisetum* through androgenesis. In: Earle, E. D.; Demarly, Y., eds. Variability in plants regenerated from tissue culture. New York: Prager; 1982:69-91.
- Ogawa T, Fukuoka H, Okhawa Y.** 1994. Induction of cell division of isolated pollen grains by sugar starvation in rice. *Breed Sci* 44: 75-77.
- Oleszczuk S, Sowa S, Zimny J.** 2004. Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (\times *Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo. *Plant Cell Rep.* 22: 885-893.
- Olsen FL.** 1991. Isolation and cultivation of embryogenic microspores from barley (*Hordeum vulgare* L.) *Hereditas* 115: 255-266.
- Orlov PA, Mavrishcheva EB, Palilova N.** 1993. Estimation of the response to anther culturing in 60 genotypes of different wheat species. *Plant Breed* 111: 339-342.
- Orshinsky BR, Mc Gregor JL, Johnson G I E, Hucl P, Kartha KK.** 1990. Improved embryoid induction and green shoot regeneration from wheat anthers cultured in medium with maltose. *Plant Cell Reports* 9: 365-369.
- Otani M, Shimada T.** 1994. Pollen embryo formation and plant regeneration from cultured anthers of tetraploid wheat. *Journal Genet Breed* 48: 103-106.
- Ouyang JW, Hu H, Chuang CC, Tseng CC.** 1973. Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. *Sci. Sinica* 16, 1: 79-95.
- Ouyang JW, Zhou SM, Jia SE.** 1983. The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum*. *Theor. Appl. Genet* 66: 101-109.
- Ouyang JW, Jia SE, Zhang C, Chen X, Feng G.** 1989. A new synthetic medium (W₁₄) for wheat anther culture. *Ann Rep Inst Genet Aca Sinica, Beijing*, pp 91-92.
- Ouyang JW, Zhou SM, Jia SE.** 1993. The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum*. *Theor. Appl. Genet.* 66: 101-109.

- Özgen M, Turet M, Altmok S, Sancak C.** 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Rep* 18:331–335.
- Pace GM, Reed JN, Ho LC, Fahey JW.** 1987. Anther culture of maize and the visualization of embryogenic microspores by fluorescent microscopy. *Theor Appl Genet* 73: 863–869.
- Pan CL, Kao KH.** 1978. The induction of wheat pollen embryo and influence of some factors on its frequency of induction. In Proc. Symp. Plant. Tissue Culture, 25-30 May 1978, Beijing. Science Press Beijing, pp133-142.
- Peloquin SJ, Ougas RW, Gabert AC.** Haploidy as a new approach to the cytogenetics and the breeding of *Solanum tuberosum*. In: Chromosome manipulation and plant genetics. Eds Riley and Lewis. Oliver and Boyd Edinburg.
- Pescitelli SM, Mitchell JC, Jones AM, Pareddy DR, Petolino JF.** 1989. High frequency androgenesis from isolated microspores of maize. *Plant Cell Rep* 7: 673-676.
- Picard E.** 1973. Influence de modifications dans les corrélations internes sur le devenir du gamétophyte mâle de *Triticum aestivum* L. *in situ* et en culture *in vitro*. C.D. Acad. Sc., Paris, série D., 277: 777-780.
- Picard E, de Buyser J.** 1973. Obtention de plantules haploïdes de *Triticum aestivum* L à partir de cultures d'anthères *in vitro*. *Comptes Rendus Acad Sciences, Paris*; 277 D, 1463-1466.
- Picard E, de Buyser J.** 1975. Nouveaux résultats concernant la culture d'anthères *in vitro* de blé tendre (*Triticum aestivum* L). Effets d'un choc thermique et de la position de l'anthère dans l'épi. *C R Acad Sc Paris, série D*, 281: 127-130.
- Picard E, de Buyser J.** 1977. High production of embryoids in anther culture of pollen derived homozygous spring wheats. *Ann. Amélior. Plantes* (Paris) 27 (4): 483–488.
- Picard E, de Buyser J, Henry Y.** 1978. Technique de production d'haploïdes de blé par culture d'anthères *in vitro*. *Le Sélectionneur Français* 26: 25-37.
- Picard E, Hours C, Gregoire S, Phan TH, Meunier JP.** 1987. Significant improvement of androgenetic haploid and doubled-haploid induction from wheat plants treated with a chemical hybridization agent. *Theor. Appl. Genet* 74: 289-297.
- Picard E.** 1988. Sélection du blé : l'intégration des biotechnologies. *Biofutur*. Mai 1988. p. 48-58.

- Picard E, Rode A, Doussinault G, Rousset M, Rives M.** 1990. *In vitro* production and utilization of doubled haploids of wheat (*Triticum aestivum* L.). Ed. YPS. Bajaj. *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Haploids in Crop Improvement*, vol XII, pp: 101-124.
- Picard E, Crambes E, Liu GS, Mihamou-Ziyyat A.** 1994. Evolution des méthodes d'haplodiploïdisation et perspectives pour l'amélioration des plantes. *C. R. Soc. Biol* 188 : 109-141.
- Picard E, Touraine P, Ambroise A, de Buyser J.** 1998. Chlorophyllian, anthocyanic and albinos *Triticum durum* plants derived from isolated microspore culture, in: A.E. Slinkard (Ed.), Proc. 9th Int. Wheat Genetics Symposium, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, vol. 3, 2–7 August 1998, pp. 44–46.
- Picard E, de Buyser J.** 2002. Haplodiploïdisation par culture d'anthers en milieu liquide chez le blé. In: Tec Doc, Biotechnologies végétales techniques de laboratoire. Lavoisier, Londres, Paris, New York, pp 243-256.
- Powell WW, Thomas TB, Thompson DM.** 1992. The agronomic performance of anther culture derived plants of barley produced via pollen embryogenesis. *Ann Appl Biol* 120: 137-150.
- Pressman E, Peet MM, Masson Pharr D.** 2002. The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers. *Annals of Botany* 90: 631-636.
- Przetakiewicz A, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A.** 2003. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 73:245–256.
- Raghavan V.** 1988. Anther and pollen development in rice (*Oryza. sativa*). *Am J Bot* 75:183–196.
- Raina SK, Irfan ST.** 1998. High frequency embryogenesis and plantlet regeneration from isolated microspores of Indica rice. *Plant Cell Rep* 17: 957-962.
- Rakoczy-Trojanowska M, S´miech M, Malpszy S.** 1997. The influence of genotype and medium on rye (*Secale cereale* L.) anther culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 48:15–21
- Ramirez C, Testillano PS, Pintos B, Moreno-Risueno MA, Bueno MA, Risueno MC.** 2004. Changes in pectins and MAPKS related to cell development during early microspore embryogenesis in *Quercus suber* L. *Eur J Cell Biol* 83: 213-225.

- Rammana MS.** 1974. The origin and *in vivo* development of embryoids in the anthers of *Solanum* hybrids. *Euphytica* 23: 623-632.
- Rammana MS, Hermsen JGTH.** 1974. Embryoid formation in the anthers of some interspecific hybrids in *Solanum*. *Euphytica* 23: 423-427.
- Raquin C, Amssa M, Henry Y, de Buysier J, Essad S.** 1982. Origine des plantes polyploïdes obtenues par culture d'anthères: analyse cytophotométrique *in situ* et *in vitro* des microspores de *Petunia* et de blé tendre. *Z. Pflanzenzüchtg* 89: 265-277.
- Rashid A, Siddiqui AW, Reinert J.** 1982. Subcellular aspects of origin and structure of pollen embryos of *Nicotiana*. *Protoplasma* 113: 202-208
- Renard M, Dosba F.** 1980. Etude de l'haploïdie chez le colza (*Brassica napus* L.var. *oleifera* Metzger). *Ann. Amélior. Plantes* 30:191-209.
- Reynolds TL.** 1997. Pollen embryogenesis. *Plant Mol Biol* 33:1-10.
- Reynolds TL, Kitto SL.** 1992. Identification of embryoid- abundant genes that are temporally expressed during pollen embryogenesis in wheat anther cultures. *Plant Physiol* 100: 1744-1750.
- Roberts-Oëhlschlager SL, Dunwell JM.** 1990. Barley anther culture: pretreatment on mannitol stimulates production of micropore-derived embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 20: 235-240.
- Rode A, Hartmann C, Dron M, Picard E, Quétier F.** 1985. Organelle genome stability in anther derived doubled haploids of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Moisson. *Theor. Appl. Genet* 71: 320-324.
- Sagi L, Barnabas B.** 1989. Evidence for cytoplasmic control *in vitro* microspore embryogenesis in the anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 78: 867-872.
- Saidi N, Cherkaoui S, Chlyah A, Chlyah H.** 1997. Embryo formation and regeneration in *Triticum turgidum* ssp. *durum* anther culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 51:27-33.
- Sai Kishore N, Visarada KBRS, Aravinda Lakshmi Y, Pashupatinath E, Rao SV, Seetharama N.** 2006. *In vitro* culture methods in *sorghum* with shoot tip as the explant material. *Plant cell rep* 25: 174 -182.
- Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS.** 1987. Ultrastructural cytology of plastids of pollen grains of certain androgenic and non androgenic plants. *Protoplasma* 138: 11-22.
- San Noeum LH.** 1976. Haploïdes d'*Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* d'ovules non fécondés. *Ann Amélior Plantes* 26: 751-754.

- Sato S, Katoh N, Iwai S, Hagimori M.** 2002. Effect of low temperature pretreatment of buds or inflorescence on isolated microspore culture in *Brassica rapa* (syn. *B. campestris*). *Breeding Sci* 52: 23–26.
- Seguí JM, Testillano PS, Risueño MC.** 2003. Hsp70 and Hsp90 change their expression and subcellular localization after microspore embryogenesis induction in *Brassica napus* L. *J Struct Biol* 142: 379–391.
- Seguí JM, Testillano PS, Jouannic S, Henry Y, Risueño MC.** 2005. MAP kinases are developmentally regulated during stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. *Histochem Cell Biol.*, DOI 10.1007/s00418-004-0749-y
- Shariatpanahi ME, Bal U, Heberle Bors E, Touraev A.** 2006. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiologia Plantarum* 127: 519–534.
- Sheoran IS, Saini HS.** 1996. Drought-induced male sterility in rice: changes in carbohydrate levels and enzyme activities associated with the inhibition of starch accumulation in pollen. *Sexual Plant Reproduction* 9: 161–169.
- Shimada T, Makino T.** 1975. *In vitro* culture of wheat III. Anther culture of A genome aneuploids in common wheat, *Theor. Appl. Genet.* 46: 407–410.
- Silva-Romano MC, Canhoto JM.** 1999. Resposta de genótipos de *Triticum aestivum* e de *Triticum durum* a cultura *in vitro* de anteras. *Melhoramento* 36:5–14
- Somleva MN, Schmidt EDL, de Vries SC.** 2000. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Reports* 19: 718–726.
- Sopory S.K. and Munshi M.** 1996. Anther culture. In: Jain S.M., Sopory S.K. and Veilleux R.E. (eds), *In vitro* Haploid Production in Higher Plants, Vol. 1. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 145–176.
- Souvré A, Albertini L, Audran JC.** 1987. Le grain de pollen des Angiospermes, Apports de la biopalinologie et perspectives biotechnologiques. *Bull Soc Bot, Fr*, 134, *Actual bot* 1: 87-112.
- Souvré A, Jardinaud MF.** 1995. Androgénèse par culture de microspores ou de grains de pollen isolés. In: Haplodiploïdisation. Cours de la série «Biotechnologies Végétales» co-produits par l'AUPELF.UREF et le CNED dans le cadre du programme UNISAT Université audiovisuelle francophone de l'AUPELF. ref BV95 pp 103-145.

- Stöber A, Hess D.** 1997. Spike pretreatments, anther culture conditions, and anther culture response of 17 German varieties of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Breeding* vol 116, n5: 443-447.
- Sunderland N.** 1974. Anther culture as a means of haploid induction. In: Kasha KJ, ed. Haploids in higher plants: advances and potential. Proceedings of the first international symposium on haploids. University of Guelph. Canada, June 1974 pp: 91-122.
- Sunderland N.** 1979. Anther and pollen culture 1974–1979. In: Davis DR, ed. The plant genome and 2nd Int. Haploid Conference. Norwich: The John Innes Charity, pp.171–181.
- Sunderland N, Roberts M.** 1979. Cold-pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers. *Ann Bot* 43: 405–414.
- Telmer CA, Newcomb W, Simmonds DH.** 1995. Cellular changes during heat shock induction and embryo development of cultured microspores of *Brassica napus* cv. Topas. *Protoplasma* 185: 106–112.
- Testillano PS, Coronado MJ, Seguí JM, Domenech J, González-Melendi P, Raska I, Risueño MC.** 2000. Defined nuclear changes accompany the reprogramming of the microspore to embryogenesis. *J Struct Biol* 129: 223–232.
- Testillano PS, Coronado MJ, Bárány I, Latino A, Seguí JM, Ramírez C, Díaz-Mendoza M, Risueño MC.** 2001. Defined cellular markers including specific MAPK distribution in two pollen developmental programmes. In *Microscopy*, Barcelona 2001, pp. 68–69, Universitat de Barcelona, Barcelona.
- Touraev A, Lezin F, Heberle-Bors E, Vicente O.** 1995. Maintenance of gametophytic development after symmetrical division in tobacco microspore culture. *Sex. Plant Reprod*, 8:70-76.
- Touraev A, Ilham A, Vicente O, Heberle-Bors E.** 1996a. Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Rep* 15:561–565
- Touraev A, Indrianto A, Wratschko I, Vicente O, Heberle-Bors E.** 1996b. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sexual Plant Reproduction* 9: 209–215.
- Touraev A, Pfosser M, Vicente O, Heberle-Bors E.** 1996c. Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/ pollen embryogenesis. *Planta* 200: 144–152.
- Touraev A, Vicente O, Heberle-Bors E.** 1997. Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci Rev* 2(8): 297-302.

- Touraev A, Heberle-Bors E.** 1999. Microspore embryogenesis and *in vitro* pollen maturation in tobacco. *Methods Mol. Biol* 111: 281–291.
- Tsunewaki K, Mukai Y, Yamamori H.** 1984. The salmon method of haploid production in common wheat. In: Sym. Genet. Manipulation in Crops. Science Press. Beijing, p.21.
- Turesson IKD, Pedersen S, Andersen SB.** 1989. Nuclear genes affecting albinism in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Theor Appl Genet* 78: 879-883.
- Turesson S, Ljungberg A, Johansson N, Karlsson KE, Suijs LW, Josset JP.** 2000. Large-scale production of wheat and triticale doubled haploids through the use of a single anther culture method. *Plant Breed* 119: 455-459.
- Van Bergen S, Kottenhagen MJ, van der Meulen RM, Wang M.** 1999. The role of abscisic acid in induction of androgenesis: a comparative study between *Hordeum vulgare* L. cvs Igri and Digger. *Journal of Plant Growth Regulation* 18, 135–143.
- Vergne P, Riccardi F, Beckert M, Dumas C.** 1993. Identification of a 32 kDa anther Marker protein response in maize, *Zea mays* L. *Theor Appl Genet* 86: 843-850.
- Véronis.** 2002. (<http://www.up.univ-mrs.fr/veronis/cours/INFZ16/index.html>)
- Wallwork MAB, Logue SJ, MacLeod LC, Jenner CF.** 1998. Effect of high temperature during grain filling on starch synthesis in the developing barley grain. *Australian Journal of Plant Physiology* 25: 173–181.
- Wang CC, Chu CC, Sun. CS, Wu. SH, Yin KC, Hsu C.** 1973. The androgenesis in wheat (*Triticum aestivum*) anthers cultured *in vitro*. *Sci. Sin* 16: 218-222.
- Wang CC, Sun. CS, Chu CC, Wu SC.** 1978. Studies on the albino pollen plantlets of rice. Proceedings of a symposium on plant tissue culture. 149-160. Science Press, Peking.
- Wang M, Höekstra S, van Bergen S, Lamers GEM, Oppedijk BJ, van der Heijden MW, de Priester W, Schilperroort RA.** 1999a. Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant Mol Biol* 39:489–501.
- Wang M, van Bergen S, Lamers GEM, Oppedijk BJ, Schilperroort RA.** 1999b. Programmed cell death during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. In: Clement C, Pacini E, Audran JC (eds) Anther and Pollen: From Biology to Biotechnology. Springer, verlag, Berlin, Heidelberg, Tokyo. pp. 201-209.
- Wang M, van Bergen S, van Duijn B.** 2000. Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiol* 124:523–530.
- Wei ZM.** 1982. Pollen callus culture in *Triticum aestivum* L. *Theor Appl Genet* 63: 71-73.

- Wojnarowicz G, Caredda S, Devaux P, Sangwan R, Clément C.** 2004. Barley anther culture: assessment of carbohydrate effects on embryo yield, green plant production and differential plastid development in relation with albinism. *Journal of Plant Physiology* 161 (6): 747-755.
- Xie QJ, Oard JH, Rush MC.** 1995. Genetic analysis of an unstable, purple-red hull rice mutation derived from tissue culture. *J. Hered* 86: 154-156
- Yang HY, Zhou C.** 1982. *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. *Theor Appl Genet* 63: 97-104.
- Yeung EC, Rahman MH, Thorpe TA.** 1996. Comparative development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. cv. Topas. I. Histodifferentiation. *Int J Plant Sci* 157: 27-39.
- Zaki MAM, Dickinson HG.** 1991. Microspore-derived embryos in *Brassica*: the significance of division symmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. *Sex Plant Reprod* 4: 48-55.
- Zheng MY, Liu W, Weng Y, Polle E, Konzak CF.** 2001. Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores treated with inducer chemicals. *Plant Cell Reports* 20:685-690.
- Zhou H, Konzak CF.** 1997. Influence of genotypic and environmental factors on anther culture response of wheat. *J. Appl Genet* 38: 393-406.
- Zhu ZC, Wu HS.** 1979. *In vitro* induction of haploid plantlets from the inpollinated ovaries of *Triticum aestivum* and *Nicotiana tabacum*. *Acta Genet Sin* 6: 181-183.
- Zhu ZQ, Warg JJ, Sun JS.** 1979. The introduction of the albinos pollen plants and preliminary observation of their ploidy in *Triticum durum*. *Acta Bot Sin* 21: 295-298.
- Zhu ZC, Wu HS, An QK, Liu ZY.** 1981. Induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* cultured *in vitro*. *Acta Genet Sin* 8: 386-390.
- Ziauddin A, Simion E, Kasha KJ.** 1990. Improved plant regeneration from shed microspore culture in barley (*Hordeum vulgare* L.) cv. Igri. *Plant Cell Rep* 9: 69-72.
- Ziauddin A, Marsolais A, Simion E, Kasha KJ.** 1992. Improved plant regeneration from wheat anther and barley microspore culture using phenylacetic acid (PAA). *Plant Cell Rep* 11: 489-498.

Résumés

ملخص:

من خلال دراستنا يمكننا القول بان تشكل جنيني لم يعد عائقا أمام استخدام زراعة الابواغ المعزولة *ortiv ni* عند القمح الصلب . إذ أظهرت الدراسة التي قمنا بها الحصول على أجنة بنفس نوعية الأجنة المتحصل عليها بعد أنتاش الحبوب، هذه الأخيرة كانت مستحيلة عند القمح الصلب الذي يتميز بالاستجابة الضعيفة سواء بالنسبة لتشكيل الأجنة أو الحصول على نباتات خضراء.

عدة معاملات أولية أجريت على أصناف من القمح الصلب و من بين هؤلاء نجد مانيتول 0,3M (7 أيام) والمعاملة الأولية بالبرودة (4م⁰ في الظلام) من أحسن المعامل التي أعطت نتائج لم يتحصل عليها إطلاقا عند القمح الصلب. حيث تحصلنا تحت المعامل الأولي بالبرودة (5 أسابيع) على مجموع 5300 جنين من بين 2470000 أبواغ الصنفين معا (Cham1 وKJ) منها 1850 أنقلت على و سط خاص بإنتاج النباتات (MS0) إذ أنتجت 89 نباتات خضراء أي 9 نباتات خضراء لكل 100 مئابر (الصنفين معا). من جهته فان المانيتول 0,3 M (7 أيام تحت درجة حرارة 4م⁰ في الظلام) أعطى بالنسبة للصنف 2,3KJ % من الإنتاج للنباتات الخضراء أي بمعدل 9 نباتات خضراء لكل 100أبواغ. تجدر الإشارة هنا إلى نتائج أصلية لم يسبق الحصول عليها عند القمح الصلب ألى وهي إنتاج نباتات خضراء من خلال أجنة مسنة وضعت اصطناعيا في وسط منتج للنباتات.

الكلمات الأساسية

Triticum turgidum subsp. durum (Desf.) Husn.

زراعة الأبواغ المعزولة، معاملة أولية، مانيتول، معاملة أولية بالبرودة، تحريض التشكل الجنيني الذكري ، تشكل جنيني *ortiv n* ، إنتاج نباتات خضراء، إنتاج نباتات خضراء *ortiv ni*، عديم الكلوروفيل.

Abstract. Androgenetic haploid plants derived from durum wheat isolated microspore culture. Albinism can it be partially controlled ?

Producing doubled haploid, homozygous lines is one of the more attractive methods for breeding new interesting lines in a crop species. In *Triticum turgidum subsp.durum* (Desf.) Husn., the major problem with this approach is the low efficiency of green plant regeneration. Only *in vitro* ovary culture or intergeneric crosses with *Zea mays* L produce gynogenetic green haploid and doubled haploid plants. This study is concerned with another very interesting method of androgenetic doubled haploid plant production, the *in vitro* isolated microspore culture (IMC).

The objective of this study was to improve the induction of embryogenesis and the green plant regeneration in durum wheat microspore culture in order to obtain higher number of regenerating embryos and their conversion in green plants. In this thesis, it is shown that IMC, associated with cold or cold plus mannitol pretreatments, or mannitol of the spikes kept within their sheath leaves, during different durations, have significant positive effects, not only on embryo production, but also on chlorophyllian plant regeneration. Our results show that the induction of embryogenesis in durum wheat microspore cultures is strongly improved by the use of cold pretreatment or a mannitol 0,3M. The two pretreatments have a strong effect on the number of embryos produced and regenerated green plants. Thus under cold pretreatment (5 weeks), a total of 5300 embryos was obtained from 2470000 microspores of two *T. durum* varieties (Cham1 and JK), among which 1850 embryos were transferred to regeneration medium and developed 89 chlorophyllian plants, which represents the equivalent of 9 green plants per 100 anthers.

Also, with 0,3M cold mannitol for 7 days, a high green plants regeneration rate was recorded in JK cultivar: 85 green plants were obtained (about the equivalent of 9 green plants per 100 anthers). These results are among the better results published until now in durum wheat.

Our study shows clearly that a long-term 4°C cold pre-treatment and 0,3M cold mannitol for 7 days at 4°C in the dark could be promising for green regeneration in *Triticum turgidum subsp. durum* (Desf.) Husn.

Keywords: Isolated microspore culture; *Triticum turgidum subsp. durum* (Desf.)Husn.; Pretreatments; Mannitol; Cold; Androgenic induction; *In vitro* embryogenesis; green regeneration; Albinism.

Abridged English version

Androgenetic haploid plants derived from durum wheat isolated microspore culture. Albinism can it be partially controlled?

Thesis presented by

Zelikha Labbani

Department of Biology, University of Constantine, Algeria

For breeding purposes, the evaluation of diversity in genetic pools and the establishment of homozygous lines are of critical importance. Homozygosity has been traditionally achieved by performing time-consuming and labor-intensive backcrosses.

However, in the middle 1960's, a new technique came into view: the production of double haploid plants from immature pollen grains (microspores). Prompted by certain stress signals, microspores can be switched from their normal pollen developmental pathway towards an embryogenic route of development, a process that is referred to as androgenesis (Fig. 56). Due to the colchicine-induced or spontaneous chromosome doubling during the early stages of microspore embryo development, single haploid microspores give rise to fertile double haploid plants within a short period of time. The production of double haploids via androgenesis represents, nowadays, a powerful technique both for the production of hybrid seeds and the evaluation of genetic diversity.

Stress has been considered the main trigger for the androgenic switch in microspores. Depending on the plant species, and even the plant variety, different stress treatments are required to efficiently induce androgenesis. However, many agronomically important crops are still recalcitrant to androgenesis. Improvement in protocol development has been so far based on trial and error experiences, limiting further use of this biotechnology for breeding purposes. For both applied and fundamental research, it is of uttermost importance to

understand how a highly specialized cell such as an immature pollen grain can be reprogrammed to become embryogenic.

Producing doubled haploid, homozygous lines have become the method of choice in the selection of genotypes of interest in agronomic plant species. In *Triticum turgidum subsp. durum* (Desf.) Husn., the utilization of *in vitro* androgenesis is hampered by the very high frequency of albinism in regenerating plants, reaching in most cases 100% and a low efficiency of green plant regeneration. Only of *in vitro* ovary culture or intergeneric crosses with maize (*Zea mays* L) has produce gynogenetic green haploid and doubled haploid plants.

This study is concerned with another very interesting method of androgenetic doubled haploid plant production, the *in vitro* isolated microspore culture. This last is the more recent method of doubled-haploid production. It has the considerable advantage to allow the separation of the microspore populations from the sporophytic tissues, leading to more true embryos and quick conversion of those into true haploid and doubled haploid plants with a lower rate of somaclonal variations compared to *in vitro* anther culture. Today isolated microspore culture has been extensively applied with success in crops such as rape seed, barley and more recently bread wheat, but not in *Triticum durum*. Apart from saving time for breeders, an important advantage of microspore culture is that a high frequency of chromosome doubling can take place early in the culture phase, resulting in completely fertile doubled haploid plants (Kasha and Maluszynski 2003). In addition, it is possible to observe the early stages of embryo formation from induction to differentiation under a microscope.

As shown by several experiments, microspore androgenic development is divided into three main characteristic, overlapping phases : acquisition of embryogenic potential by stress, initiation of cell divisions and pattern formation and the embryos development into haploid plants.

The research described in this thesis has provided a substantial contribution towards optimization of the androgenesis efficiency. The use of cold pretreatment, mannitol pretreatment or their combination when all the microspores were at the mid to late uninucleate stage has been crucial in pointing out the effect of stress to increase the androgenic yield.

The objective of this doctoral work was to improve androgenic development in durum wheat microspore culture in order to obtain a high number of regenerating embryos and their development in green plants. The switch from the pollen developmental pathway towards the androgenic route involves was induced by stress. Many works were done about various species. However, little is does in durum wheat.

Durum wheat represents an attractive species to study the androgenesis via isolated microspore culture in order to increase the efficiency of androgenic yield in recalcitrant species such as in induction embryogenesis and in green plant regeneration. Nevertheless, the efficiency of the response was extremely low and there is the necessity to develop a new protocol of isolated microspore culture in order to increase a number of doubled haploid regenerants. This method would be useful for breeding purposes and to help in the breeding programs. Time and labour would probably be reduced too. In this context our laboratory has decided to study the effects of different pretreatments on the behaviour of *in vitro* isolated microspores populations of durum wheat. We describe here an efficient method for inducing embryos and regenerating green plants from isolated microspores of durum wheat. It is shown that this method, associated with cold alone or cold plus mannitol pretreatment, or mannitol alone of the spikes kept within their sheath leaves, during different times, have significant positive effects, not only on embryo production, but also on chlorophyllian plant regeneration. The aim of this study was therefore to test the effect of mannitol 0,3M and cold pretreatment on the quality and quantity of embryos produced from microspore culture and green plants regenerated from wheat cultivars.

The main events of androgenesis are reviewed in preliminary chapter. This last presents an overview of the progress that the research on androgenesis induction has made in the recent years, emphasizing the phase of microspore embryogenic potential acquirement and initiation of cell divisions. In addition, this chapter draws the effect of pretreatment of androgenic development in main crop species.

In this thesis, we used some durum wheat varieties (*Triticum turgidum subsp. durum* (Desf.) Husn.), tetraploid ($2n = 4x = 28$, AABB) Cham1, Jennah Khetifa (JK), Bidi 17, Hedba 03, Mohamed Ben Bachir (MBB), Oued Zenati 368 (OZ), Hamira, Karim, Korifla, Kebir, Sebou, and compared with the results obtained with the cv. Pavon 76, a bread wheat variety (*Triticum aestivum subsp. aestivum*), hexaploid ($2n = 6x = 42$, AABBDD), here used as control. The reason of this choice is that until today there is no available control genotype in durum wheat for isolated microspore culture methods. The two durum wheat varieties (Cham1 and Jennah Khetifa) were previously tested by the laboratory as being recalcitrant in producing green plantlets with anther culture and preliminary studies showing that pretreatments of the spikes could be advantageous for green plant production were published.

Donor plants were planted in 6L pots and grown in a controlled greenhouse. Each pot contained 5 to 6 plants. The temperature was 22°C at day time and 16°C at night time. The photoperiod was set at 16/8h (light/dark) and the humidity at 70 ± 5%.

In this thesis's work, tillers from each plant were harvested when the microspores were predominantly at the mid or late uninucleate stage and then, except for the controls, were submitted to different pretreatments described in chapters 1, 2 and 3. Then the microspore population extraction was done using the protocol of [de Buyser *et al.*, \(2002\)](#). The embryogenesis and plant regeneration were followed in both cultivars during the androgenic process and correlated with the proportion of regenerated chlorophyllian plantlets.

Before microspores culture, tillers were cut at 2-3cm from the basal, and were manually removed from the leaf sheath. Spikes were surface sterilised for 4 to 5 minutes in a 4% solution of sodium hypochlorite and then rinsed 3 times with sterile deionized water for 3 minutes.

Microspores were isolated and extracted following protocol as described by [de-Buyser *et al.*, \(2002\)](#). Microspores were isolated by blending. The crude microspore preparation was filtered through a 75 or 100µm sieve. The suspension of microspores was centrifuged twice at 800g for 5min. Isolated microspores were cultured in liquid CHB3 medium ([Chu *et al.*, 1990](#)) modified by adding 90g/l of maltose as a carbohydrate source in 35mm Petri dishes, each containing 1,5ml of microspores suspension with a density was adjusted to 50 000 microspores per ml. Five to ten immature ovaries, which had been removed from newly harvested spikes or stored at 4°C for up to one week, were added in each Petri dish for co-culture.

Plates were sealed and incubated at 28°C in the dark for about 24 to 35 days.

After 3 to 5 weeks on embryos induction medium, embryos were derived from isolated microspore culture were transferred aseptically to solid regeneration MS medium without hormones (MS0) ([Murashige and Skoog 1962](#)), containing 6,5 g/l of agarose and 20 g/l of sucrose in 90mm Petri dishes. The dishes were placed in a growth chamber and were incubated at 25°C in 16h of light. After 3 weeks, the number of green, albino, chimeric and anthocyanic plantlets were counted.

To describe the quantitative effects of different pretreatments on the main stages of embryogenesis and plant regeneration on isolated microspores culture, following parameters were measured:

- embryos production frequency = (number of mature embryos obtained / total number of cultured microspores) x 100.

- green regenerated plants frequency = (green regenerated plants / total number of mature embryos transferred) x 100.
- albino regenerated plants frequency = (albino regenerated plants / total number of mature embryos transferred) x 100.
- chimeric regenerated plants frequency = (chimeric regenerated plants / total number of mature embryos transferred) x 100.
- anthocyanic regenerated plants frequency = (anthocyanic regenerated plants / total number of mature embryos transferred) x 100.
- total regeneration frequency = (total plants regenerated / total number of mature embryos transferred to MS0 medium) x 100.
- embryos not giving any regeneration frequency = (number of embryos not giving any regeneration / number of embryos transferred to MS0 medium) x 100.
- ratio G/A = Number of green plants (G) / number of albino plants (A) among the embryos transferred to MS0 medium.
- total theoretical yield of green plants = (rate of embryos production) X (rate of green plants regeneration) per 1000.
- total theoretical yield in albino plants = (rate of embryos production) X (rate of albino plants regeneration) per 1000.

All experiments were conducted as completely randomized designs with all the tillers for a single replication coming from the same batch of donor plants grown at the same time in the same conditions of light, temperature and humidity.

Data was recorded on percentage. It was shown per experiment mean \pm standard error.

Data on the number and development of the embryos were collected between 3 to 10 weeks in induction medium. Only the large or mature embryos were transferred on the regeneration medium. The numbers of green, albino, chimeric and anthocyanic plants, also the frequency of total regeneration were thus based only on the number of large or mature embryos.

The data were statistically analyzed using Anova.

In chapter 1, the developmental pathways of stressed microspores are elucidated by cold pretreatment, osmotic pretreatment and their combination. This chapter describes the response of each tested genotype and draws the differences between the varieties.

The two durum cultivars (Cham1 and JK) showed a great difference in their embryogenic potentialities. The cv. Cham1 has a poor response in embryo formation for all pretreatments. However, the cv. JK has shown a good embryogenesis for all pretreatments, principally when

0,1M mannitol is used for three days at 4°C. Under this condition, we obtained 0,71% of embryo production, which exceeded the level of Pavon 76. As far as green plant regeneration is concerned, the cold pretreatment during 5 weeks at 4°C was the best one. It gave a net improvement of microspore culture responses particularly for embryo production but also for green plant release. All pretreatments and control taken together, a total of 16 490 embryos was obtained from $17,4 \times 10^6$ microspores of two *T. durum* varieties, among which 9 320 embryos were transferred to the regeneration medium. Thus, the proportion of embryos giving green plantlets was increased from 0 to 7,38 % and 0 to 3,42 % respectively in Cham1 and JK and a total of 150 androgenetic green plantlets were obtained, which is the higher number of green androgenetic plants ever published concerning durum wheat.

In chapter 2, this study provides evidence for a role of the novel pretreatment in the formation of embryos and for their development in green plants. In chapter 2 mannitol-stressed microspores was used with the objective to increase the number of embryogenic cells, and to investigate the stress-induced microspore and their developmental in plants. Further the effect of mannitol pretreatment revealed that the induction of androgenesis was more stimulate in cv. JK when compared with others varieties tested here like Cham1, Bidi 17, Hedba 03, MBB, and OZ.

Chapter 2 is composed of two parts. In part 1, the tillers from durum wheat donor plants were pretreated in different cold mannitol concentrations: 0,1M; 0,3M; 0,4M and 0,5M. The 0,3M had a beneficial effect of *in vitro* microspore culture especially in green plant regeneration. For the second part of study, tillers from donor varieties were pretreated in 0,3M mannitol and were stored at 4°C at various times: 3; 5; 6; 7; 8; 10; and 12 days. Our results showed clearly that the novel pretreatment combined mannitol 0,3M and cold for 7days had a strong effect on the number of embryos produced and regenerated green plants. Under this condition 13 475 mature embryos were produced from 2 693 500 JK microspores. Moreover, 85 green plants were obtained. High green plants regeneration frequency was recorded. As an average 11,55 green plants were produced per 100 000 JK microspores (about the equivalent of 6 plants per spike). Therefore this study showed clearly that our results are the best ones published until now in durum wheat.

We have demonstrated that 0,3M mannitol at 7d is capable of promoting green regeneration. It gave the most consistent result. Our work investigated the effects of mannitol on *in vitro* isolated microspores culture. The result also implied that mannitol could have potential for enhancing the regeneration of other cereal and grass species. The present microspore culture

protocol, in durum wheat, may be widely applicable for increasing yield of androgenesis response in recalcitrant species. The new method is simple, effective and highly reproducible. It may overcome one of the major drawbacks of doubled haploid production in wheat.

Some optimizations of the protocol of isolated microspore culture were done. The investigation was characterized in detail in chapter 3. In this chapter the results show that certain optimization like speed blending can give an important feature of the embryogenic pathway of durum wheat microspores.

Our results show that the induction of embryogenesis in durum wheat microspore cultures is strongly improved by the use of cold pretreatment or a mannitol 0,3M. The two pretreatments have a strong effect on the number of embryos produced and regenerated green plants. Thus under cold pretreatment (5 weeks), a total of 5 301 embryos was obtained from 2 475 000 microspores of two *T. durum* varieties (Cham1 and JK), among which 1 848 embryos were transferred to regeneration medium and developed 89 chlorophyllian plants, about the equivalent of 9 green plants per 100 anthers. In spite of a 0,3M mannitol pretreatment, it produced 13 475 mature embryos from 2 693 500 JK microspores. Moreover, 85 green plants were obtained. High green plants regeneration frequency was recorded. As an average 11,55 green plants were produced per 100 000 JK microspores (about the equivalent of 6 plants per spike). The proportion of green plants versus albino was 10 % (85/867). This result was comparatively good according to previous studies with durum wheat, where albinism seemed to be the major problem (Ghaemi *et al.*, 1995).

In comparison with the results published by various authors y included those obtained in our laboratory a few years ago by J'Aiti *et al.*, (1999, 2000), our study in durum wheat isolated microspores culture showed clearly that our results are the best ones published until now in durum wheat. In the study of Hadwiger and Heberle-Bors (1986), two green plantlets were obtained from anther culture, while in that of Ghaemi *et al.*, (1993) three green and two albino plantlets were regenerated. Many genotypes did not respond at all to anther culture, as only one green and three albino plants were obtained from 15 different cultivars by J'Aiti *et al.*, (1999, 2000). Whoever, the results obtained by Dogramaci-Altuntepe *et al.*, (2001) were more interested. They produced 248 green plants from 86400 anthers using ten Turkish cultivars (0,3 green plant per 100 anthers). The best results always from durum wheat were reported recently by Cistué *et al.*, (2006) when they produced, using 35 microspores isolations 407

green plants from 16 050 anthers under the mannitol 0,7M pretreatment (an average of 2,5 green plants per 100 anthers).

Although in comparison with the result obtained in cv.Chris, using the combination of Larcoll and Gum Arabic in bread wheat microspore culture (Letarte *et al.*, 2006), our result obtained in cv. Jennah Khetifa seems to be highly significant as far as we know that Chris is an aestivum wheat variety and it is less recalcitrant than durum wheat varieties.

An intergeneric comparison with rice another cereal was carried out in order to compare our results with other cereals other than the durum wheat. In this context, Raina and Irfan (1998) obtained in rice and under the best pretreatment 500 embryos from 80 000 microspores (a frequency of 0,62 %). However under cold pretreatment (5 weeks) with the method of lower blending and a density of 75 000 microspores /ml, our study shows in JK cultivar a frequency of 1,98% of embryos production, about 3 times more important than the results obtained by Raina and Irfan (1998), like in regenerating plants.

The high frequency of green plants obtained in JK variety are probably a consequence of several causes: genotype, stage of microspores, pretreatment, production of the mature embryos (scutellum), induction medium, regeneration medium.

Our results clearly show that the microspore culture response varies within the species and depends also on the pretreatment. The durum cultivars showed a great difference in their embryogenic potentialities. The cv. JK has shown a good embryogenesis for all pretreatments, principally when used cold pretreatment for 5 weeks. Under this condition, we obtained 1,98% of embryo production, which exceeded the level of Pavon 76. In general, higher levels of induction are obtained through *in vitro* isolated microspore culture in cv. JK. As far as green plant regeneration is concerned, the cold pretreatment during 5 weeks at 4°C was the best one. It gave a net improvement of microspore culture responses particularly for embryo production but also for green plant release.

Finally, we may conclude that the isolated microspore culture response in tetraploid wheat depends on the genotype as well as on the pretreatment, and that, in spite of these encouraging results, the problem of albino regenerated plants is only partially solved.

Our doctoral work shows clearly that a long-term cold pretreatment like the 0,3M cold mannitol for 7 days at 4°C in the dark could be promising for green regeneration in *Triticum turgidum subsp. durum* (Desf.) Husn, however the mannitol allows a considerable profit in time.

Publications récentes

Labbani Z, de Buyser J, Richard N, Picard E. 2004. Optimisation de la réponse de culture *in vitro* de microspores isolées chez *Triticum turgidum subsp.durum*. *Proceeding IXèmes Journées Scientifiques de l'AUF Lomé Togo* du 4 au 7 octobre 2004. pp81-87.

De Buyser J, Labbani Z, Richard N, Picard E. 2004. Isolated microspore culture in durum wheat : effect of pretreatments. COST Action 851 "Gametic Cells and Molecular Breeding for Crops Improvement". On: Technology advancement in gametic embryogenesis of recalcitrant genotype. Palermo, 11-13 november, 2004.

Labbani Z, Richard N, de Buyser J, Picard E. 2005. Plantes chlorophylliennes de blé dur obtenues par culture de microspores isolées: importance des prétraitements. *Comptes Rendus Biologies* 328: 713–723.

Labbani Z, de Buyser J, Picard E. 2006. Relation entre le Mannitol et la régénération chlorophyllienne en culture *in vitro* de microspores isolées chez le blé dur. *Proceeding X^{èmes} Journées Scientifiques de l'AUF Constantine Algérie* du 8 au 11 mai 2006. pp25-26.

Labbani Z, de Buyser J, Picard E. 2007. Effect of mannitol pretreatment to improve green plant regeneration on isolated microspore culture in *Triticum turgidum subsp. durum* (Desf.) Husn.) cv. Jennah Khetifa. *Plant Breeding, in press*.