

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Constantine -1-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Ecologie Végétale

N° d'ordre:76/DS/2013
Série: 022/BE/2013

Thèse Présentée en Vue de l'Obtention de Diplôme de Doctorat en
Sciences en Génétique et Amélioration des Plantes
Option « Biotechnologies Végétales »

Thème

**SELECTION *IN VITRO* POUR LA TOLERANCE
AUX STRESS SALIN ET THERMIQUE CHEZ LE
BLE TENDRE (*Triticum aestivum* L.)**

Présentée par Mr. Laid BENDERRADJI

Soutenu le 17 Novembre 2013

Devant le jury

Président :	Pr. A. DJEKOUN	Université de Constantine 1
Rapporteur :	Pr. H. BOUZERZOUR	Université de Sétif 1
Examineurs :	Pr. N. YKHLEF	Université de Constantine 1
	Pr. A. BENMAHAMMED	Université de Sétif 1
	Dr. F. BRINI	Centre de Biotechnologie de Sfax
Invité :	Pr. K. MASMOUDI.	Université de Dubaï (ICBA)

Année Universitaire: 2012/2013

Remerciements

Nombreuses ont été les personnes qui ont apporté leurs concours combien précieux pour la réalisation de cette thèse, que chacune d'elles trouve ici ma profonde gratitude.

Je tiens tout d'abord à remercier vivement le professeur Hamenna BOUZERZOUR qui a dirigé et suivi ce travail avec patience, sa compréhension, son amabilité et ses conseils précieux. Je le prie de bien vouloir trouver ici le témoignage de ma très vive gratitude,

Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude au professeur Abdelhamid DJEKOUN pour avoir accepté d'apprécier le travail et de présider le jury,

Par la même occasion, mes remerciements vont aux professeurs Nadia YKHLEF, Ammar BENMAHAMMED et Faïçal BRINI qui ont bien voulu honorer le jury par leur présence et pour avoir accepté de juger ce travail,

Je remercie vivement, mon cher invité, professeur Khaled MASMOUDI, ancien directeur du laboratoire de protection et d'amélioration des plantes (LPAP) du Centre de Biotechnologies de Sfax (CBS)-Tunisie, et directeur actuel du Centre International de l'Agriculture Bio-saline (ICBA), Université de Dubaï - United Arabes Emérites.

Mes vifs remerciements vont aussi à tous les membres du laboratoire LPAP au CBS-Tunisie, dont une partie de cette thèse est réalisé avec leurs contributions et leurs soutiens.

Mes vifs remerciements sont adressés également à l'équipe du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales (LGBBV) et à mes amis de la promotion: Kamel KELLOU, Lyas BOUAZZA, Karim BAAZIZ, Sadek CHAHREDINE, Mouloud GADHBANE, Zahira BOUZIANE, Leila BENFREIDJA, Hanane KHALFALLAH et Ahlem GUETTOUCHI.

Mes remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la préparation de ce document.

Laid BENDERRADJI

Dédicace

A l'âme de :

Mon père **Lamri**,

Ma sœur **Merzaka** et

Mon très cher regretté et le plus aimé de mes fils "**Achraf Khalil**",

A ma petite famille, **Noudjoud** et mes enfants **Aymen Yacine**, **Amjed Younes**,

Soundous Malek et **Ranine Shaimaa**

A ma mère, mes sœurs et frères

A tous qu'ils trouvent en cette thèse ma profonde gratitude et mon éternelle reconnaissance.

Laid BENDERRADJI

Liste des abréviations

2,4 D., 2,4 Acide dichlorophénoxyacétique

ABA: Acide Abscisique

AIA: Acide Indole-3-Acétique

AIB: Acide Indole-3-Butyrique

ANA: Acide Naphtalène -1- Acétique

ARN: Acide Ribonucléique

BAP: 6-Benzyl-Amino-Purine

bp : Paire de Bases

c-DNA ou ADNc: ADN Complémentaire

DEPC: Diéthyl-Pyro-Carbonate

dNTP: Désoxy-Nucléosine Triphosphate

EDTA: Ethylène Diamine Tétra-Acétate

FAO: Food Alimentary Organisation

DEPC: Di-Ethyl-Pero-Carbonate

IGC: Council International du Grain

Kin: Kinetine

LEA: Late Embryogenesis Abundant Protein

M-MLV: Moloney Murine Leukemia Virus

MS/2: Murashigie et Skoog dilué de moitié

MS: Murashigie et Skoog 1962

RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

QTL: Quantitative Traits Loci

ROS: Espèces Réactives d'Oxygène

rpm: Tours (Rotation) Par Minute

SAM: Sélection Assistée par Marqueurs

SOS: Salt Overly Sensitive

Tris: Tris (Hydroxyméthyl) Aminométhane

BET: Bromure d'Ethilium

HKT: High Affinity K⁺ Transporter

Liste des Tableaux

N°	Liste des Tableaux	Page
1	Production mondiale de blé tendre (Tonnes x 10 ⁶).	4
2	Production de blé tendre des pays africains (Tonnes x 10 ⁶).	5
3	Carrés moyens de l'analyse de la variance du taux de germination, longueur des racines, longueur des épicotyles et surface foliaire des plantules des variétés MD et HD soumises à un stress salin.	38
4	Moyennes du pourcentage de germination (%G), de la longueur des racines (LR), de la longueur des épicotyles (LE) et de la surface foliaire (SF) des variétés MD et HD soumises à un stress salin.	38
5	Carrés moyens de l'analyse de la variance du taux de la chlorophylle (Chl), la fluorescence (Flu) et de la teneur en sucres solubles (Suc) des plantules des variétés MD et HD soumises à un stress salin.	47
6	Moyennes des valeurs SPAD de la chlorophylle (Chl), de la fluorescence (Fv/Fm) et de la teneur en sucres solubles (Suc) des variétés MD et HD conduites sous stress salin.	47
7	Pourcentage de la réduction des valeurs prises par les variables mesurées sous différentes intensités du stress salin par rapport au témoin chez deux variétés MD et HD.	50
8	Milieus de culture utilisés pour la calogénèse (MS1), la caulogénèse, (MS2) et la rhizogénèse (MS3).	63
9	Composition du milieu de culture de Murashigue et Skoog (MS, 1962).	63
10	Valeurs moyennes des variables mesurées par génotype et traitement salin.	65
11	Effet du traitement salin sur la régénération des plantules des variétés MD & HD	66
12	Valeurs moyennes des variables mesurées par génotype et stress thermique.	66
13	Effet du stress thermique sur la régénération des plantules des variétés MD & HD	67
14	Plantules régénérées sous l'effet du stress salin et thermique.	71
15	Variation de l'indice de sensibilité au sel et à la température estimé sur la base de la longueur des racines	73
16	Oligonucléotides synthétiques utilisés pour l'amplification de l'ADN.	88

Liste des Figures

N°	Liste des Figures	Page
1	Production mondiale de blé tendre de 2002/03 à 2009/10.	3
2	Croissant fertile (Abbo et <i>al.</i> , 2010).	5
3	Effet du stress salin et mécanismes de régulation de la tolérance à la salinité (Cheong et Yun, 2007).	11
4	Diversité de la tolérance à la salinité chez quelques espèces végétales.	14
5	Psychromètre Wescor C-52.	34
6	Chlorophylle-mètre <i>minolta SPAD 502</i> .	34
7	Fluoromètre “Monitoring System Hansatech”.	35
8	Courbe de la fluorescence (Oukaroum, 2007).	36
9	Courbe d'étalonnage des sucres solubles.	37
10	Photomètre de flamme	37
11	Effet de salinité sur le taux de la germination (moyenne des variétés MD et HD).	39
12	Pourcentage de germination des variétés MD et HD, soumises à un stress salin	39
13	Longueur moyenne des racines de MD et HD soumises à un stress salin	40
14	Longueur de l'épicotyle des deux variétés MD et HD soumises à un stress salin	41
15	Surface foliaire des deux variétés MD et HD soumises à un stress salin.	41
16	Effet de la salinité sur la croissance foliaire des deux variétés MD et HD après 7 jours de traitement salin continu avec 0, 100 et 200mM NaCl	42
17	Potentiel hydrique du limbe et de la gaine de la variété MD au terme de 7 jours de croissance sous 100mM NaCl.	43
18	Teneur relative en eau du limbe et de la gaine des deux variétés MD et HD au terme de 14 jours de croissance sous 100mM NaCl.	43
19	Teneur en Na ⁺ dans la gaine, le limbe et les racines des deux variétés MD et HD au terme de 14 jours de croissance sous 100mM NaCl.	44
20	Teneur en Na ⁺ du limbe et de la gaine de la 1 ^{ière} et la 2 ^{ième} feuille des deux variétés MD et HD au terme de 7 jours d'exposition à la salinité.	45
21	Teneur en K ⁺ de la gaine, du limbe et des racines des deux variétés MD et HD sous 100mM NaCl durant 14 jours et le ratio K ⁺ /Na ⁺ du limbe foliaire.	46

22	Effet moyen de la salinité sur la teneur en chlorophylle chez MD et HD	48
23	Effet moyen de la salinité et Interaction (S x V) sur la fluorescence (Fv/Fm)	48
24	Teneur en sucres solubles de MD et HD sous stress salin	49
25	Efficacité de prolifération des cals sous différentes concentrations en NaCl chez MD et HD.	68
26	Effet de la salinité sur la surface des cals de MD et HD.	70
27	Effet de la température sur la surface des cals de MD et HD	70
28	Nombre moyen des plantules régénérées de MD et HD sous l'effet du stress salin et thermique.	71
29	Culture <i>in vitro</i> des embryons matures	72
30	Profil d'expression des HKT;5 et HKT2;2 dans les racines (R), la gaine (G) et le limbe (L) foliaire de MD et HD.	89
31	Model d'explication des mécanismes de transport de sodium : déchargement et séquestration vacuolaire chez la variété tolérante au sel	102

Sélection *in vitro* pour la tolérance aux stress salin et thermique chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.)

Résumé générale

Les résultats de l'étude qui porte sur la réponse des plantules de deux variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), Mahon-Demias (MD) et Hidhab (HD) au stress salin, mettent en relief l'effet négatif de la salinité sur le taux de la germination et indiquent la sensibilité de MD comparativement à HD. Le stress salin réduit significativement la longueur des racines et des épicotyles des deux variétés. MD accuse une plus grande réduction de la longueur des deux caractères que HD. Sous stress salin de 200mM NaCl, la surface foliaire de MD est réduite de 50.2% contre 24.8% pour HD. La variation des valeurs du potentiel hydrique et de la teneur relative en eau indique que MD est plus sensible à la salinité que HD. Le suivi du contenu ionique indique que l'accumulation de Na⁺ est plus importante dans la gaine de HD et le limbe de MD, avec peu de différence entre les deux variétés pour le contenu des racines. HD met en jeu un mécanisme supplémentaire pour contrer la salinité, en séquestrant préférentiellement plus de sodium dans la gaine, que dans le limbe à l'inverse de la variété MD. HD présente une plus grande capacité à accumuler l'ion K⁺ dans le limbe et au niveau des racines comparativement à MD. Le ratio K⁺/Na⁺ du limbe foliaire est plus élevé chez HD comparativement à celui de MD. Ceci indique que c'est surtout au niveau des feuilles que HD rétablit l'équilibre de son potentiel osmotique via le K⁺ et minimise ainsi l'effet du stress osmotique engendré par NaCl. La capacité de HD à pomper de K⁺ de la solution nutritive, puis de le véhiculer vers le limbe, représente donc une stratégie d'adaptation au stress salin via la régulation osmotique. Les résultats de l'étude qui porte sur les capacités embryogéniques et le pouvoir de régénération sous stress salin et thermique *in vitro* chez MD et HD en utilisant des embryons matures comme explants, montrent que MD répond mieux que HD à la sélection *in vitro*. MD présente un taux d'induction des cals plus élevé avec une meilleure prolifération des cals induits, avec cependant moins d'embryons produits par cal induit. Le taux de régénération de plantules, à partir des cals proliférant était nul pour HD et très faible pour MD. L'indice de sensibilité (IS) confirme la tolérance de la variété MD comparativement à la variété HD vis-à-vis du stress salin et thermique en culture *in vitro* à un paramètre donné qui est la longueur des racines. Les résultats obtenus suggèrent la possibilité d'utiliser la technique *in vitro* pour la sélection vis-à-vis des stress abiotiques.

Les résultats de l'étude de l'analyse de l'expression des cinq gènes candidats de la tolérance à la salinité indiquent que HKT1;5 et HKT2;2 s'expriment dans les racines, mais pas dans les gaines et les limbes, avec une meilleure expression du gène HKT1;5 dans les racines de HD. Ceci suggère le rôle plus actif du gène HKT1;5 chez la variété HD. L'expression de l'anti-porteur vacuolaire Na^+/H^+ TNHX-1, dans les racines, les gaines et limbes est plus élevée chez HD que chez MD. Les racines et la gaine des deux génotypes accumulent plus de transcrits de la pyrophosphatase vacuolaire TVP1 que le limbe foliaire. La similitude du type d'expression des gènes TNHX1 et TVP1, notée chez MD et HD, suggère que la compartimentation vacuolaire agit avec une même efficacité chez les deux génotypes. Plus de transcrits du gène TaSOS-1, s'accumulent dans les racines et la gaine de MD comparativement à HD, suggérant qu'en plus d'une meilleure efficacité de rétention de l'ion Na^+ dans les gaines, la variété HD évite l'accumulation de l'ion Na^+ dans le limbe foliaire en activant son efflux via une expression élevée du gène SOS1 dans ce compartiment. Les résultats indiquent que la tolérance à la salinité chez le blé tendre semble liée à la capacité d'éviter l'accumulation à des niveaux toxiques de l'ion Na^+ , associée à une capacité élevée d'osmorégulation et/ou au maintien d'un niveau acceptable de K^+ , spécialement dans le limbe foliaire. Cette information est utile pour la sélection du matériel végétal dans les programmes d'amélioration des céréales.

Mots clés: *Triticum aestivum* L., stress salin, stress thermique, germination, surface foliaire, embryons matures, régénération, sélection *in vitro*, transporteurs d'ions, expression génique.

الانتخاب المخبري لتحمل الإجهاد الملحي و الحراري عند نبات القمح اللين
(*Triticum aestivum* L.)

ملخص عام

إن نتائج الدراسة الخاصة باستجابة نباتات الصنفين HD و MD من القمح اللين *Triticum aestivum* L. للإجهاد الملحي. تبين التأثير السلبي للملح المطبقة على الانتاش و تبين حساسية الصنف MD مقارنة مع الصنف HD. تؤثر الملح بفعالية على إنقاص طول الجذور و عنق الورقة للصنفين لكن يبدو الصنف MD أكثر تأثراً لهاتين الصفتين من الصنف HD. إن تركيز 200 ملي مول من ملح كلوريد الصوديوم (NaCl) ينقص المساحة الورقية بنسبة 50.2% للصنف MD و بنسبة 24.8% عند الصنف HD. إن تغيرات قيم الضغط المائي و الكمية النسبية للماء يؤكد حساسية الصنف MD للملح أكثر من الصنف HD. إن تركيز ايونات الصوديوم Na^+ يكون أكثر في عنق ورقة الصنف HD و في نصل ورقة الصنف MD مع تغير طفيف بين الصنفين في محتوى هذا العنصر على مستوى الجذور، و هذا ما يفيد بان الصنف HD يستعمل إمكانيات إضافية لمقاومة الملح بالطرد التفاضلي الزائد للصوديوم الى غمد الورقة بدلا من نصلها عكس ما تقوم به MD. إن الصنف HD يبدي سعة كبيرة لتخزين عنصر البوتاسيوم K^+ في نصل الورقة و في الجذور مقارنة مع الصنف MD. إن العلاقة K^+/Na^+ للنصل أكثر ارتفاعا عند HD مقارنة مع MD و عليه فان هذا الصنف يعيد توازنه للضغط الاسموزي على مستوى الأوراق عن طريق ايونات K^+ فيقلل من اثر الضغط الاسموزي الحاصل بتعرضه للملح بفعل NaCl المطبق كإجهاد لحيوي. إن استطاعة HD الحصول على ايونات K^+ من محلول التغذية و تحويلها إلى نصل الورقة يمثل إستراتيجية تأقلم للإجهاد الملحي عن طريق التعديل الاسموزي. إن نتائج الدراسة الخاصة بإمكانية التشكل الجنيني و القدرة على إعطاء نباتات كاملة تحت ظروف الإجهاد الملحي و الحراري للصنفين المستعملين سابقا MD و HD قد تم مخبريا في الزجاج باستعمال أجنة ناضجة حيث تبين أن الصنف MD يستجيب أحسن من الصنف HD للانتخاب المخبري. إن الصنف MD يظهر نسبة عالية من تشكل الكالوسات و بقدرة عالية من التفرع و لكن مع قليل من الأجنة الناتجة عن هذه الكالوسات و التي يمكن أن تعطي نباتات كاملة مع استمرار التجربة. إن نسبة التشكل المورفولوجي و إعطاء نباتات كاملة كان معدوما بالنسبة للصنف HD و قليل جدا بالنسبة للصنف MD. إن مؤشر التحسس (Indice de sensibilité) الخاص بطول الجذور مثلا، يؤكد قدرة الصنف MD مقارنة مع الصنف HD تجاه الإجهاد الملحي و الحراري المطبق اثناء الزراعة في الزجاج. إن النتائج المحصل عليها تشجع على استعمال تقنيات الزراعة المخبرية في الزجاج لغرض انتخاب نباتات قادرة على تحمل الإجهاد اللاحيوي. إن نتائج الدراسة

الخاصة بتحليل ترجمة خمسة جينات مرشحة لتحمل الإجهاد الملحي. بينت أن الجينات HKT1;5 et HKT2;2 تترجم في جذور النباتات و ليس في غمد أو نصل الورقة مع ترجمة عالية و مثالية للجين HKT1;5 في جذور الصنف HD، و هذا ما يفيد أن الدور الفعال لهذا الجين عند الصنف HD. إن ترجمة ناقل الضد الفجوي TNHX-1 Na^+/H^+ في جذور و غمد و نصل الأوراق أعلى عند الصنف HD منه عند الصنف MD. أن الجذور و أغمد الأوراق للصنفين تخزن نسخا من البيروفوسفاتاز الفجوي TVP1 مقارنة بنصل الورقة. إن تشابه ترجمة الجينات TNHX1 و TVP1 الملاحظ يفيد بان التأثير الفجوي في إحكام هذه الجينات يتم بنفس الفعالية عند الصنفين. إن نسخا كثيرة للجين TaSOS-1 تتركز في جذور و غمد الأوراق للصنف MD مقارنة بالصنف HD و هذا ما يبين فعالية أكبر في إحكام ايونات الصوديوم في أغمد الأوراق. إن الصنف HD يتفادى تخزين ايون الصوديوم Na^+ في نصل الأوراق و يسرع من إخراجها عن طريق الترجمة العالية لجين SOS1 على هذا المستوى. إن نتائج هذه الدراسة تبين أن تحمل الإجهاد الملحي عند القمح اللين مرتبط بالقدرة على عدم تخزين مستويات سامة من ايون الصوديوم Na^+ تزامنا مع الاستطاعة على التنظيم الاسموزي و الحفاظ على مستوى مقبول من تركيز ايون البوتاسيوم K^+ خاصة في نصل الورقة. إن هذه المعلومة تعتبر هامة جدا في الانتخاب النباتي و في برامج تحسين النباتات المنتجة للحبوب خصوصا.

الكلمات المفتاحية: القمح اللين، الإجهاد الملحي، الإجهاد الحراري، الانتاش، المساحة الورقية، أجنة ناضجة، التشكل النباتي، الانتخاب المخبري، نواقل الايونات، الترجمة الجينية.

***In vitro* selection for salt and thermal stress tolerance in bread wheat**

(Triticum aestivum L.)

General summary

Study results of response for seedlings of two bread wheat varieties (*Triticum aestivum* L.) , Mahon-Demias (MD) and Hidhab (HD) to salt stress, indicate the highlight negative impact of salinity on the rate of germination and show the sensitivity of MD compared to HD. Salt stress significantly reduced the length of roots and epicotyls of both varieties. MD showed a greater reduction in length of two characters than HD. Under salt stress of 200mM NaCl, the leaf area is reduced by 50.2 % for MD against 24.8 % for HD. Changes in water potential values and relative water content indicates that MD is more sensitive to salinity than HD. Monitoring the ionic content indicates that the accumulation of Na⁺ is higher in the sheath of HD and the blade of MD, with little difference between varieties for the content of the roots. HD uses an additional mechanism to counter salinity, sequestering preferentially over sodium in the sheath unlike in the blade of MD variety. HD has a greater ability to accumulate K⁺ ion in the limb and in the roots compared to MD. The K⁺/Na⁺ ratio of leaf blade is higher in HD compared to MD. This indicates that it is mainly their leaves HD restores the balance of the osmotic potential via K⁺ and thus minimizes the effect of osmotic stress caused by NaCl. HD capacity to pump K⁺ in the nutrient solution, and then to transfer to the limb, therefore a strategy for adaptation to salt stress via osmotic regulation. Results of study for the embryogenic capacity and power regeneration *in vitro* thermal and salt stress in MD and HD using mature embryos as explants show that MD responds better than HD in *in vitro* selection. MD has a higher rate of induction of callus with a better callus induced proliferation, but with fewer embryos induced by cal. The rate of regeneration of plantlets from proliferating callus was null for HD and very low for MD. The index sensitivity (IS) confirmed the tolerance of MD compared to HD for salt and thermal stress *in vitro* to a given parameter is the length of the roots. The results suggest the possibility of using the *in vitro* technique in selection for no biotic stress. Results of study for the expression analysis of five candidate genes for tolerance to salinity indicate that HKT1,5 and HKT2,2 are expressed in the roots, but not in sheaths and limbs, with better HKT1,5 gene expression in the roots of HD. This suggests a more active role HKT1, 5 genes in HD. The expression of anti-porter vacuolar Na⁺/H⁺, TNHx-1 roots, sheaths and limbs is higher in HD than in MD. Roots and

sheath of the two genotypes accumulate more transcripts of the vacuolar pyrophosphatase TVP1 than blades. Type similarity of gene expression TNH1 and TVP1, observed in MD and HD, suggesting that vacuolar compartmentalization is equal efficiency in both genotypes. More gene transcripts TaSOS-1, accumulate in the roots and sheath of MD compared to HD, suggesting that in addition to more effective retention of Na⁺ in sheaths, HD avoids accumulation of Na⁺ in the blade by activating its sodium efflux via high expression of SOS1 gene in this compartment. Results indicate that salinity tolerance in the bread wheat seems to be related to the ability to prevent the accumulation of toxic levels of Na⁺, associated with a high osmo-regulation and/or ability to maintain an acceptable level of K⁺, especially in the leaf blade. This information is useful for selection of plant material in cereal breeding programs.

Key words: *Triticum aestivum* L., salt stress, heat stress, germination, leaf area, mature embryos, regeneration, *in vitro* selection, ion transport, gene expression.

Introduction générale	19
-----------------------------	----

Chapitre I

Revue bibliographique

1. Culture du blé tendre (<i>Triticum aestivum</i> L.)	21
2. Origine, classification et cycle végétatif du blé tendre	23
2. 1. Origine.....	23
2. 2. Classification.....	24
2. 3. Cycle végétatif.....	24
3. Influence des contraintes abiotiques sur la production du blé tendre.....	25
3. 1. Influence du stress hydrique.....	25
3. 2. Influence du stress thermique.....	27
3. 3. Influence du stress salin.....	28
3. 3. 1. Effets de la salinité sur la plante.....	29
3. 3. 2. Mécanismes de la tolérance au stress salin.....	32
3. 4. Sélection pour la tolérance aux stress abiotiques.....	34
3. 4. 1. Sélection pour le rendement.....	35
3.4. 2. Sélection pour l'adaptation.....	35
3. 4. 2. 1. Critères phénologiques.....	36
3. 4. 2. 2. Critères morphologiques.....	36
3. 4. 2. 3. Critères physiologiques.....	37
3. 4. 2. 4. Sélection via la culture <i>in vitro</i>	39
4. Approches moléculaires pour la tolérance aux stress abiotiques.....	40
4. 1. Marqueurs moléculaires.....	40
4. 2. Génie génétique.....	41

4. 3. Gènes de tolérance à la salinité.....	42
4. 3. 1. Influx du sodium : Les transporteurs HKT.....	42
4. 3. 2. Efflux du sodium : Les transporteurs SOS1.....	42
4. 3. 3. Compartimentation vacuolaire du sodium: Les antiporteurs NHX et les pyrophosphatases.....	43

Chapitre II

Effet du stress salin sur les caractères morphologiques et physiologiques de deux variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), Mahon-Demias et Hidhab

Résumé en français.....	45
Résumé en arabe.....	46
Résumé en anglais.....	47
Introduction	48
Matériel et méthodes.....	49
1. Matériel végétal.....	49
2. Mise en place de l'expérimentation.....	50
3. Variables mesurées.....	51
3. 1. Taux de germination.....	51
3. 2. Longueur des racines et des épicotyles.....	51
3. 3. Surface foliaire.....	51
3. 4. Potentiel hydrique.....	51
3. 5. Teneur relative en eau (TRE).....	52
3. 6. Teneur en chlorophylle.....	52
3. 7. Fluorescence chlorophyllienne.....	53
3. 8. Teneur en sucres solubles.....	54
3. 9. Dosage des ions	55

4. Analyse des données.....	56
Résultats.....	56
1. Effet du stress salin sur les caractères morphologiques.....	56
1. 1. Germination.....	56
1. 2. Longueur des racines et des épicotyles.....	58
1. 3. Surface foliaire.....	59
2. Effet du stress salin sur les caractères physiologiques.....	60
2. 1. Potentiel hydrique et teneur relative en eau.....	60
2. 2. Dosage des ions Na⁺ et K⁺.....	62
2. 3. Chlorophylle et fluorescence chlorophyllienne.....	65
2. 4. Teneur en sucres solubles.....	67
Discussion.....	68
Conclusion.....	72

Chapitre III

Effet du stress salin et thermique sur la prolifération des cals et la régénération des plantules à partir des embryons matures de deux variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), Mahon-Demias et Hidhab

Résumé en français.....	73
Résumé en arabe.....	74
Résumé en anglais.....	75
Introduction	76
Matériel et méthodes.....	77
1. Conditions expérimentales.....	77
2. Variables mesurées.....	80
3. Analyse des données.....	80
Résultats et discussion.....	80

1. Induction des cals sous stress salin et thermique.....	80
2. Prolifération des cals sous stress salin et thermique.....	84
3. Longueurs des racines sous stress salin et thermique.....	86
4. Surface des cals sous stress salin et thermique.....	86
5. Nombre des plantules régénérées sous stress salin et thermique.....	87
6. Indice de sensibilité.....	89
Conclusion.....	91

Chapitre IV

Effet du stress salin sur l'expression des transporteurs d'ions chez deux variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), Mahon-Demias et Hidhab

Résumé en français.....	92
Résumé en arabe.....	93
Résumé en anglais.....	94
Introduction.....	95
Matériel et Méthodes.....	98
1. Conditions expérimentales.....	98
2. Extraction des ARN totaux des plantes par la méthode du Trizol	98
3. Synthèse des cDNAs par transcriptase reverse (RT-PCR).....	99
4. Amplification des cDNAs par PCR.....	99
5. Electrophorèse.....	101
Résultats et discussion.....	101
- Analyse de l'expression de gènes candidats HKT1; 5, HKT2; 2, TNH1, TVP1 et TaSOS1 chez deux variétés de blé tendre: MD et HD.....	101
Conclusion.....	105

Synthèse.....	106
Conclusion générale	114
Perspectives.....	116
Références bibliographiques.....	117
Annexes.....	137
Liste des articles publiés.....	139

Introduction générale

La sélection des génotypes plus performants que les variétés mises en culture, a commencé dès la fin du XIX^{ème} siècle mais la progression des rendements n'est devenue perceptible et régulière que depuis le début de la deuxième moitié du XX^{ème} siècle (Berger, 1985). Le progrès génétique participe à hauteur de 50% à cette amélioration (Slaffer *et al.*, 2005). La production céréalière des zones pluviales sèches reste faible et très irrégulière dans l'espace et le temps (Annichiarico *et al.*, 2005; Kadi *et al.*, 2010).

La recherche d'une meilleure adaptation à la variation environnementale est devenue une nécessité pour stabiliser les rendements de ces régions. La variation des rendements est engendrée par la sensibilité des nouveaux cultivars aux divers stress biotiques et abiotiques qui caractérisent le milieu de production (Benmahammed *et al.*, 2010). Le caractère, le plus utilisé en sélection, est le rendement lui-même. Cette sélection directe s'est révélée, le plus souvent, inefficace dans l'identification de génotypes adaptés et tolérants les stress (Rodrigues *et al.*, 2008).

Reynolds *et al.*, (2007) expliquent que l'inefficacité de l'approche analytique, réside dans la variabilité des liaisons entre les caractères ciblés et la production dans les environnements contraignants. Cette approche n'est pas assez fiable ni assez simple pour être applicable à des centaines voire des milliers de plantes sous sélection. Les sélectionneurs restent donc assez convaincus que les approches physiologiques n'arrivent pas à donner de meilleurs résultats comparativement aux méthodes empiriques qu'ils utilisent jusqu'ici. Ces dernières se montrent, en effet, plus efficaces, dans la mesure où des gains appréciables de rendements sont obtenus dans les environnements favorables. Ils montrent donc peu d'engouement ou d'enthousiasme à utiliser les approches physiologiques en sélection.

La réponse des plantes aux divers stress abiotiques est une caractéristique sous contrôle génétique complexe. Elle est déterminée en partie par les propriétés cellulaires. Il est de ce fait possible de sélectionner des souches cellulaires tolérantes et d'en tirer d'intéressantes variétés à intégrer au programme de sélection comme pool génétique (Bajji *et al.*, 2001). Les biotechnologies végétales, en permettant de contrôler de manière précise les conditions du milieu et de cribler rapidement un grand nombre de cellules végétales dans un espace très

réduit, représentent dans ce sens une approche privilégiée pour la mise en œuvre de tests de criblage applicables au niveau cellulaire (Eleuch et *al.*, 2008).

L'emploi de ces techniques de biotechnologies végétales s'est avéré efficace pour faire des progrès dans la compréhension des mécanismes intervenants dans la tolérance aux stress (Baum et Johnson, 2007). L'identification de gènes induits en condition de stress, constitue une approche très prometteuse en amélioration des plantes. En effet, l'isolement de gènes candidats et leur caractérisation devrait permettre à court terme leur transfert à d'autres fonds génétiques plus performants, et qui sont généralement plus sensibles aux stress abiotiques (Brini et *al.*, 2005; 2007).

Le présent travail se propose comme objectifs d'évaluer la tolérance de deux variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), Mahon-Demias (MD) et Hidhab (HD), aux stress abiotiques à travers (i) l'étude du comportement morpho-physiologique sous différentes conditions de stress salin, (ii) la mise en place d'un protocole expérimental d'induction et de maintenance des cals pour une éventuelle exploitation des possibilités offertes par la culture *in vitro* dans le domaine de la sélection des lignées cellulaires tolérantes aux stress abiotiques, et (iii) l'étude du niveau d'expression des gènes liés aux transporteurs d'ions chez les deux variétés soumises à différents stress abiotiques.

Revue bibliographique

1. Culture du blé tendre (*Triticum aestivum* L.)

La production mondiale de blé tendre a varié, selon le Conseil International du Grain (IGC, 2009), de 565 à 682 millions de tonnes, au cours de la période allant de 2002/03 à 2008/09. Cette production couvre largement les besoins de la population mondiale avec des stocks en hausses (Figure 1).

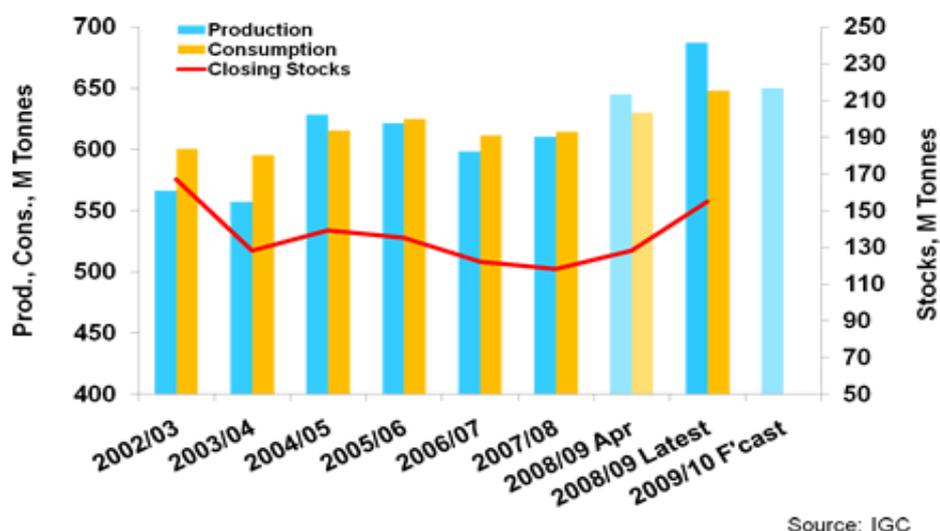


Figure 1. Variation de la production mondiale du blé tendre au cours de la période 2002/03 à 2009/10 (www.igc.org.uk/downloads/gmrsummary/gmrsumme.pdf).

La Chine, l'union Européenne, l'Inde, la Russie et les USA sont les plus gros producteurs de blé tendre (Tableau 1). Les pays exportateurs sont les USA, le Canada et l'Union Européenne ainsi que la Russie. Les gros importateurs sont la Chine et l'Égypte (IGC, 2009). Le prix actuel est de 229 \$US la tonne. Selon la FAO (2009), l'Afrique participe pour 22% à la production mondiale du blé tendre.

Dans ce contexte, la production Algérienne reste très marginale, quoiqu'elle ait connu des augmentations significatives depuis les années 1960, atteignant plus de 35 millions de quintaux (FAO, 2009). Les importations connaissent, elles aussi, des augmentations importantes, atteignant les 80 millions de quintaux, suite aux besoins, toutes céréales confondues, qui dépassent largement les 100 millions de quintaux (Tableau 2).

Tableau 1. Production mondiale de blé tendre, en millions de tonnes (FAO 2009).

Pays	2007/08	2008/09	2009/10
Algeria	2.9	2.2	3.9
Afghanistan	3.4	1.5	4.1
Argentina	18	8.4	8
Australia	13.8	21.5	23
Bulgaria	2.4	4.6	3.6
Canada	20.1	28.6	22.5
China	109.3	112.5	114.5
Denmark	4.5	5	5.6
Egypt	8.3	7.9	7.9
France	32.8	39	39.4
Germany	20.8	26	25.1
Hungary	4	5.6	4.1
India	75.8	78.6	80.6
Iran	15	10	12
Italy	7.2	9.7	6.6
Kazakhstan	16.5	12.6	14.5
Morocco	1.6	3.7	6.5
Pakistan	23.3	21.5	24
Poland	8.3	9.3	9.2
Romania	3	7.6	5.5
Russia	49.4	63.7	56.5
Spain	6.4	6.7	5
Syria	4	2.1	3.2
Turkey	15.5	16.8	17.8
Ukraine	13.9	25.9	20
United Kingdom	13.2	17.2	14.6
United States	55.8	68	59.4
Uzbekistan	6.2	6	6.2
Others	58.6	62.2	64.3
Total	611	682.3	663.8

Tableau 2. Production de blé tendre, en millions de tonnes, des pays africains (<http://www.fao.org/docrep/011/ai482e/ai482e13.htm>)

Années	Production		Imports		Exports		Total utilisé		Stocks	
	2008/09	2009/10	2008/09	2009/10	2008/09	2009/10	2008/09	2009/10	2009	2010
Afrique	149	155.4	57.3	54.2	6.9	6.4	200.1	204.1	27	26.2
Algérie	2.2	3.9	8.2	7.3	-	-	11.1	11.3	4.6	4.5
Egypte	20.6	20.9	11.8	12.2	0.7	0.8	32.1	32.5	3.9	3.8
Ethiopie	16.1	16.1	0.7	0.6	0.2	0.1	17	17	0.7	0.4
Maroc	5.2	8.1	5.5	4	0.2	0.2	10.9	11.6	1.7	2
Nigeria	28.5	28.6	5.1	5.3	0.5	0.4	32.9	33.5	1.3	1.3
Afrique du Sud.	15.8	14.1	2.4	2.4	2.6	2.2	13.9	14.3	3.5	3.7
Soudan	5.6	6	1.4	1.4	0.3	0.3	7.2	7.3	1.5	1.4

2. Origine, classification et cycle végétatif du blé tendre

2. 1. Origine

Le blé tendre est apparu entre 5000 et 6000 ans AJ, dans le croissant fertile. Cette zone constitue un vaste territoire comprenant la Syrie, la Jordanie, la Palestine, l'Iraq, l'Iran et la Turquie (Lev-Yadun et *al.*, 2000, Figure 2). De son centre primaire, le blé tendre s'est dispersé vers l'Europe via la Grèce et vers l'Asie via l'inde (Lev-Yadun et *al.*, 2000). Aujourd'hui, le blé tendre constitue une importante source alimentaire et économique mondiale (FAO, 2007).

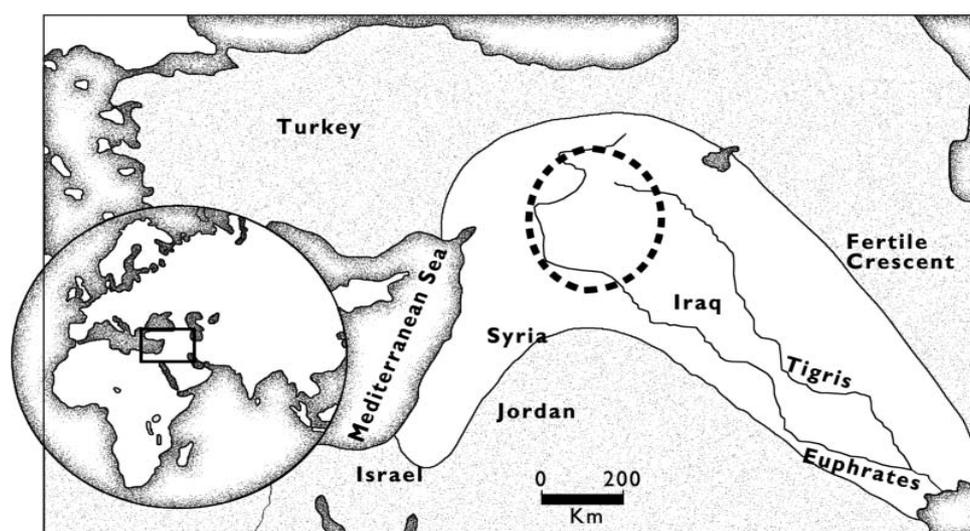


Figure 2. Le croissant fertile (Abbo et *al.*, 2010)

2. 2. Classification

Le blé est une plante monocotylédone du genre *Triticum* de l'ordre des poales, de la famille des poaceae. Les deux espèces les plus cultivées sont le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*), mais il existe de nombreuses autres espèces qui se différencient par leur degré de ploïdie, à savoir, le blé diploïde avec le génome AA, le blé tétraploïde avec les génomes AA et BB et le blé hexaploïde avec les génomes AA, BB et DD. La différenciation réside aussi dans leur nombre de chromosome qui est de 14, 28 ou 42 respectivement.

Le blé tendre possède les trois génomes AA, BB et DD constitué chacun de sept paires de chromosomes homologues, soit au total 42 chromosomes; le blé dur ne contient que les deux génomes AA et BB, soit 28 chromosomes. La filiation génétique des blés est complexe et incomplètement élucidée. Il est acquis que le génome A provient de *Triticum monococcum*, le génome B d'un *Aegilops* (*bicornis*, *speltoïdes*, *longissima* ou *searsii*) et le génome D d'*Aegilops squarrosa*. Le croisement naturel entre *T. monococcum* et *Aegilops* (porteur du génome B) a permis l'apparition d'un blé dur sauvage de type AABB (*Triticum turgidum ssp. dicoccoides*) qui a ensuite progressivement évolué vers *T. turgidum ssp. dicoccum* puis vers *T. durum* (blé dur cultivé). Les blés tendres cultivés (AA BB DD) seraient issus également d'un croisement naturel entre *T. turgidum ssp. dicoccum* (AA BB) et *Aegilops squarrosa* (DD). Ces deux espèces de blé ont une importance économique réelle à l'heure actuelle (Bertrand, 1996).

2. 3. Cycle végétatif

Le blé tendre est une plante annuelle, monocotylédone, composé d'un appareil végétatif herbacée, qui comporte un système racinaire fasciculé, une tige cylindrique plus au moins creuse et des feuilles engainantes (Simmonds, 1991). Les feuilles apparaissent les premières, elles sont suivies par les tiges portant des épis terminaux, comportant de 15 à 25 épillets composées de 2 à 3 fleurs fertiles autogames. Le fruit ou le grain de blé (caryopse) est issue de fécondation de la fleur qui a lieu à l'intérieur des glumelles, avant que les étamines n'apparaissent à l'extérieur (Simmonds, 1991).

Le cycle végétatif du blé tendre se subdivise selon Acevedo (1989) en trois périodes: végétative, reproductrice et maturation. La période végétative correspond à l'installation de la

culture, qui débute par la levée et se termine au stade épi-1cm et au cours de laquelle la plante développe le système racinaire et le tallage. La période de reproduction va du stade épi-1cm à l'anthèse et au cours de laquelle prédomine la croissance de l'épi. La période de maturation débute de l'anthèse jusqu'à la maturité physiologique du grain (Acevedo, 1989).

3. Influence des contraintes abiotiques sur la production du blé tendre

3. 1. Influence du stress hydrique

Le déficit hydrique est une contrainte permanente de la production agricole dans de nombreux pays au climat de type méditerranéen. Il est à l'origine d'importantes pertes de production agricole dans de nombreuses régions (Kamoshita et *al.*, 2008). Trente-cinq pourcent (35%) des terres arables, de par le monde, sont classées dans la catégorie aride ou semi-aride. Les risques de manque d'eau vont devenir de plus en plus fréquents et persistants, à l'avenir, par suite des changements climatiques causés par l'effet de serre (Witcombe et *al.*, 2008).

Passioura (2004) définit le déficit hydrique comme étant les circonstances dans lesquelles les plantes accusent une réduction de croissance et de production à cause d'une alimentation hydrique insuffisante. Tardieu (2003) mentionne que le statut hydrique de la plante passe progressivement par trois principales phases, selon le développement du stress hydrique. Au cours de la phase initiale, la transpiration et l'assimilation se déroulent comme si la plante dispose de l'eau à volonté.

Cette phase se poursuit jusqu'au moment où le niveau d'absorption racinaire ne peut plus satisfaire la demande climatique que subit le feuillage. La réserve utile du sol est alors épuisée à 50%. Après ce seuil, la plante entre dans la seconde phase, au cours de laquelle la transpiration et l'assimilation sont réduites relativement à leur potentiel. La plante réagit de façon dynamique au cours de cette phase, pour rétablir l'équilibre entre la demande climatique et l'offre du sol, en faisant intervenir des mécanismes qui lui sont propres (développement du système racinaire, régulation stomatique, ajustement osmotique) (Passioura, 2004).

Quand le déficit hydrique devient plus intense, alors la plante entre dans la troisième et dernière phase au cours de laquelle les stomates se ferment complètement, annulant toutes activités photosynthétiques. Toutes les pertes hydriques de la plante se font alors à travers les

voies non stomatiques et plus précisément par la cuticule. Il n'y a plus de gain de matière sèche, la respiration consomme les hydrates de carbone stockés et la plante passe au stade de survie. La période de survie dépend du rythme de la transpiration résiduelle et de la tolérance à la dessiccation des tissus vivants restants (Passioura, 2004).

Selon Chaves et Pereira (2003), la croissance s'arrête avant qu'aucun abaissement notable ne soit perceptible dans le contenu relatif en eau. Le premier effet du déficit hydrique est de réduire la vitesse de croissance des cellules de la tige, en partie, à cause de l'accumulation de l'acide abscissique. Le déficit hydrique provoque la réduction du nombre de grains par épi, du nombre d'épis par plante, du poids moyen du grain, de l'indice de récolte et du rendement (Condon et *al.*, 2004). Kameli et Losel (1996) notent que la matière sèche augmente progressivement sous stress hydrique, mais elle reste sous le seuil de 50%, comparativement à l'évolution de la matière du témoin. Cette réduction est assez conséquente pour affecter significativement le rendement final.

La conductance stomatique diminue avec le déclin du contenu hydrique du sol et la réduction de l'hygrométrie. Une résistance stomatique élevée limite le flux de l'eau à partir des racines et de ce fait réduit la transpiration. Elle diminue la concentration du CO₂ dans la chambre sous stomatique et réduit de l'activité photosynthétique (Tardieu, 2003). Rebzetzke et *al.*, (2002) notent qu'en zone semi-aride, au cours du printemps, l'intensité lumineuse est plus qu'optimale pour une activité photosynthétique normale. Une forte luminosité, sous stress hydrique, engendre une réduction de l'efficacité des photosystèmes, suite à la photo-inhibition causée par l'élévation de la température du couvert végétal.

L'intensité du stress hydrique induit une baisse de la teneur relative en eau, ainsi que la réduction des potentiels hydriques et osmotiques foliaires. Alors que la croissance foliaire est fortement inhibée, dès l'avènement du stress hydrique, l'assimilation du carbone, réagissant moins vite, produit des assimilats qui sont déroutés en priorité vers la croissance racinaire et utilisés pour l'ajustement osmotique (Condon et *al.*, 2004). Parmi les solutés, accumulés sous stress hydrique, on note une augmentation des sucres solubles, des acides aminés comme la proline et à un degré moindre la glycine-bétaïne (Rebetzke et *al.*, 2002).

3. 2. Influence du stress thermique

Le seuil mis en cause dans le cas du stress des hautes températures est variable en fonction du stage végétatif de la plante et de l'interaction avec le stress hydrique. Ibrahim et Quick (2001) montrent que l'effet pénalisant de l'élévation de la température est surtout dû au fait que la plante n'arrive pas à absorber les éléments nutritifs et l'eau, et à les utiliser, au rythme imposé par le stress thermique. Araus et *al.*, (2003) observent une forte réduction du nombre de plantes levées par unité de surface, suite aux effets des hautes températures lors de la période du semis.

L'effet des hautes températures au semis se matérialise par une réduction de la longueur de la coléoptile, la plante ne peut pas s'ancrer en profondeur et devient très sensible aux effets du stress thermique. Rebetzke et *al.*, (2002) notent une réduction de la longueur de la coléoptile de 100mm à une température de 15°C, mesurée à 5cm de la profondeur du sol, à moins de 30 mm lorsque la température maximale du sol atteint le seuil de 35°C.

Wardlaw (2002), observe une réduction du rendement des semis tardifs, liée à une diminution du nombre d'épis et du poids moyen du grain, causée par les effets des hautes températures en fin de cycle. Il note aussi que l'effet pénalisant du stress thermique se matérialise par une accélération du développement et une réduction des dimensions des organes constitutifs de la plante. La résultante est un effet négatif sur la productivité globale de la plante.

Wardlaw et Moncur (1995), montrent que la baisse du rendement due au stress thermique terminal, est corrélée positivement à la réduction du poids de 1000 grains et à la variation du nombre de grains/m². L'élévation de la température, tard au cours du cycle de développement de la plante et particulièrement après anthèse, est une contrainte à l'augmentation des rendements en zone semi-aride. L'effet se manifeste par une accélération de la sénescence foliaire et l'arrêt de la croissance du grain (Condon et *al.*, 2004).

L'abaissement brutal de la température, en dessous de 0°C, provoque de nombreuses perturbations au sein du végétal. Lorsque la température chute fortement, des cristaux de glace se forment dans les espaces intercellulaires déshydratant les cellules dont l'eau est appelée vers ces espaces. La membrane plasmique perd sa spécificité et il y a arrêt du

fonctionnement cellulaire. La réversibilité du phénomène n'a lieu que si la structure cellulaire n'est pas fortement endommagée. Lors du dégel, les cellules intactes se réhydratent et redeviennent fonctionnelles (Gate, 1995 ; Mekhlouf et *al.*, 2006).

Les effets indirects des basses températures peuvent se manifester par la disparition progressive des plantes, plusieurs semaines après le dégel. Un autre effet indirect du gel est consécutif aux lésions des gaines foliaires (1 ou 2 cm au-dessus du sol), provoquant l'aplatissement des plantes sur le sol et favorisant leur attaque par les agents pathogènes. En outre, la transformation de l'eau de surface en glace, et l'alternance des périodes de gel et dégel, provoquent des ruptures au niveau du collet. Il y a aussi déchaussement de plantules dues au soulèvement du sol (Sutka, 2001).

Tant que l'ébauche d'épi n'est pas atteinte parce qu'elle est protégée par l'empilement des feuilles, les dégâts foliaires ont peu de conséquences sur le devenir de la culture. Lorsque la vague des basses températures fait son apparition de manière progressive, la plante s'accoutume et s'endurcit. Les effets sont relativement moins importants. L'endurcissement est plus intense lors de la période hivernale. Il est activé par des jours courts et des températures faibles.

Les variétés de type hiver s'endurcissent mieux que les variétés de printemps dont les besoins vernaux sont nuls et de ce fait se montrent plus sensibles au froid. Plus que la valeur absolue de la température minimale enregistrée, c'est surtout l'écart des températures qui règle l'intensité des dégâts observés sur les plantes. Ces derniers seront plus importants si une baisse brutale de la température est précédée par un temps relativement clément (Sutka, 2001).

3. 3. Influence du stress salin

Selon Munns et *al.*, (2006), la salinité représente l'accumulation des sels dissous dans la solution du sol à un niveau qui inhibe la croissance et le développement des plantes. On compte généralement deux formes de salinité: Primaire et secondaire.

La salinité primaire résulte de l'accumulation des sels dans le sol à travers un long processus naturel de dégradation des roches salines et des apports éoliens des sels des mers et océans.

La salinité secondaire est d'origine anthropique, résultant des activités humaines, notamment l'irrigation avec des eaux chargées de sels (Munns *et al.*, 2006). La salinité est une contrainte en agriculture parce que la plus part des cultures sont peu tolérantes aux excès de sels. De plus la salinité est associée à l'eau qui est un important facteur d'augmentation des productions végétales. En effet, les 15% des terres irriguées dans le monde participent pour 1/3 dans la production totale mondiale. De ce fait la réduction de la productivité, suite à la salinité, pose une sérieuse contrainte à l'augmentation de la production pour couvrir une demande alimentaire de plus en plus importante (Chaves *et al.*, 2003).

3. 3. 1. Effets de la salinité sur la plante

La salinité affecte la croissance des plantes selon trois processus majeurs qui sont (1) l'effet de déficit hydrique qui résulte de la réduction du potentiel hydrique de la solution du sol, (2) la toxicité des ions spécifiques, absorbés en excès, tels que le sodium et le chlore et (3) le déséquilibre ionique qui résulte de l'excès des ions toxiques (Na^+ et Cl^-) qui engendrent une réduction de l'absorption d'autres ions (K^+ , Ca^{2+} , NO_3^-) nécessaire à l'activité enzymatique de la plante (Figure 3 ; Cheong et Yun, 2007; Greenway et Munns, 1980).

La réponse des plantes soumises au stress salin se manifeste sous forme de réduction de l'élongation foliaire, qui est associée à une réduction de la turgescence cellulaire plus qu'à l'effet ionique (Zhao *et al.*, 2007). En effet la concentration cellulaire en ions Na^+ et Cl^- est, dans ce cas, toujours inférieure au seuil de toxicité.

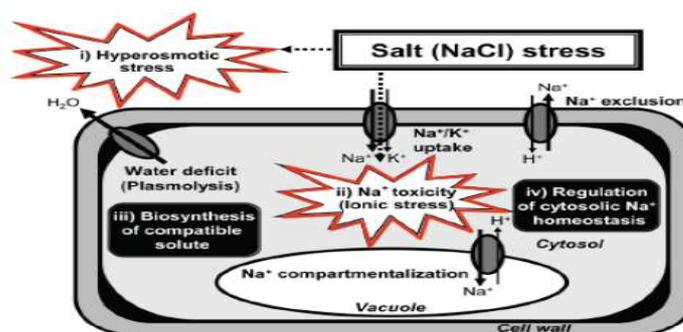


Figure 3. Effet du stress salin et mécanismes de régulation de la tolérance à la salinité (Cheong et Yun, 2007).

D'autres hypothèses explicatives de la réduction de l'élongation foliaire sous stress salin suggèrent le changement de la balance hormonale entre les racines et la tige (Hu et Schmidhalter, 1998 ; Zhao *et al.*, 2007). Chez les génotypes sensibles, les sels absorbés ne sont pas éliminés du flux de la transpiration et de ce fait, ils s'accumulent à des niveaux toxiques dans le feuillage. Les feuilles âgées se dessèchent et les plus jeunes deviennent succulentes (Munns et James, 2003 ; Munns *et al.*, 2006).

Sous la pression du stress, la plante accélère sa croissance pour fleurir et produire le peu de graines permis par le feuillage vert restant (Mass et Poss, 1989). Quoique la salinité induit une rapide réduction de la croissance du système racinaire, la croissance de la tige est proportionnellement plus réduite, reflétant un ratio racine/tige plus élevé, comparativement à celui du témoin (Neumann, 1995a ; Zhao *et al.*, 2007). La salinité réduit du tallage herbacé et de la matière sèche accumulée dans les tiges (Pessarakli et Huber, 1991 ; Zhao *et al.*, 2007).

Selon Aloy (1992), le poids de 1000 grains de l'orge est plus affecté sous stress salin comparativement aux nombres de grains par épi et nombres d'épis par plante. Par contre chez le riz, la fertilité des épillets et le nombre de tiges montantes sont plus affectés que le poids de 1000 grains (Zeng *et al.*, 2002). Selon Neumann (1995b), le degré de sensibilité au stress salin dépend aussi du stage végétatif au cours duquel la plante subit le stress. Chez certaines espèces, c'est le stage juvénile qui est le plus sensible, alors que chez d'autres espèces, c'est le stade adulte qui est le plus sensible. Ainsi par exemple l'orge, le blé, le sorgho, la betterave et le tournesol se montrent plus sensibles au stade juvénile qu'au stade plante adulte (Greenway et Munns, 1980 ; Munns *et al.*, 2006). La réduction de la croissance est une conséquence de plusieurs réponses d'ordre physiologiques, dont le statut hydrique, le déséquilibre ionique, la répartition et l'utilisation des hydrates de carbone (Termatt et Munns, 1986; Munns, 1993 ; Zhao *et al.*, 2007).

La réponse de la respiration à la salinité est associée à l'effet direct des sels sur les fonctions enzymatiques, vu que le stress salin sévère augmente la transpiration. Cette augmentation est plus importante chez les génotypes sensibles que chez ceux qui sont tolérants (Zhao *et al.*, 2007). L'accumulation des sels dans les tissus cellulaires affecte l'activité stomatique, la photosynthèse et les échanges gazeux (Seemann et Critchley, 1985 ; Zhao *et al.*, 2007). En effet une relation négative existe entre l'activité photosynthétique et le

contient en Na^+ et en Cl^- du feuillage (Yeo, 1998 ; Zhao et *al.*, 2007). Ainsi James et *al.*, (2002) mentionnent que la photosynthèse diminue de 50% pour une concentration de Na^+ du feuillage de 350mM.

La salinité réduit le contenu chlorophyllien, cette réduction est dépendante de l'intensité du stress et du degré de tolérance de la plante (Ashraf et McNeilly, 1988 ; Zhao et *al.*, 2007). Selon Velegaleti et *al.*, (1990), la réduction de la chlorophylle est corrélée avec l'accumulation du Cl^- dans les tissus. De plus la salinité impose à la plante une réduction de l'absorption des ions essentiels tels que le K^+ et Ca^{2+} , conduisant à un déséquilibre ionique (Zhu, 2001). Ca^{2+} est nécessaire pour le maintien de la sélectivité et l'intégrité de la membrane cellulaire, d'où un déficit en Ca^{2+} affecte la sélectivité de la cellule et l'intégrité de la membrane, accélérant le passage passif des ions Na^+ et leur accumulation dans les tissus (Cramer, 2002).

En générale, la présence du sel dans la solution du sol augmente le potentiel osmotique du sol et crée un déficit hydrique pour la plante dont les racines sont inaptes à absorber l'eau nécessaire à la croissance de cette solution. De ce fait le potentiel hydrique foliaire baisse aussi (Munns, 1993 ; Tattini et *al.*, 1995 ; Zhao et *al.*, 2007). Comme la croissance cellulaire est corrélée à la pression de turgescence des tissus, la baisse de la turgescence est la principale cause de l'inhibition de l'élongation cellulaire sous salinité (Greenway et Munns, 1980 ; Zhao et *al.*, 2007).

Le stress salin génère l'accumulation dans les tissus cellulaires des composés toxiques tels que les espèces réactives d'oxygène (ROS). Les ROS représentent les peroxydes, superoxydes et les radicaux hydroxyles (Shen et *al.*, 1997; Tsugane et *al.*,1999). Ces molécules toxiques endommagent les membranes cellulaires, les enzymes et l'ADN mitochondrial et chloroplastique, perturbant la croissance voire la survie de la plante (Allen, 1995 ; Munns et *al.*, 2006). Le stress salin intense induit une réduction de la production des auxines, des gibbérellines et des cytokinines des tissus cellulaires et augmente la concentration de l'acide abscissique (ABA) (Moorby et Besford, 1983).

Ces changements hormonaux sont suspectés d'être à l'origine de la réduction de la croissance de la plante sous stress salin. Le modèle bi phasique de l'inhibition de la croissance sous stress salin a été proposé par Munns (1993). La première phase de la réduction de la

croissance apparaît rapidement. Elle est liée à la présence des sels dans la solution du sol plus qu'à la présence des sels dans la plante. Au cours de cette phase, l'inhibition de la croissance n'est pas due à l'effet du stress ionique. Elle est plutôt due à l'effet du stress hydrique occasionné par la baisse du potentiel osmotique de la solution du sol, et pour lequel, il y a peu de variabilité génétique (Munns *et al.*, 2006).

La seconde phase de réduction de la croissance se développe plus tardivement et engendre des dommages dus aux effets de l'accumulation des sels dans les tissus cellulaires. Le degré de réduction de la croissance au cours de cette seconde phase est lié au degré de dommages causés au feuillage. De ce fait, certains programmes de sélection utilisent le degré de dommage foliaire comme critère pour évaluer la tolérance au stress salin (Munns et James, 2003 ; Zhao *et al.*, 2007). Le modèle bi-phasique prédit que les différences génotypiques de croissance, en réponse à la salinité, sont apparentes au cours de la seconde phase (Fortmeier et Schubert, 1995).

3. 3. 2. Mécanismes de la tolérance au stress salin

La tolérance à la salinité représente la capacité de la plante à maintenir la croissance sous conditions salines. Pour réaliser cela, la plante doit posséder le mécanisme pour tolérer la salinité. La tolérance à la salinité n'est pas un mécanisme qui est présent ou absent, c'est plutôt un phénomène qui prend différents degrés d'expression, variables selon les génotypes et les conditions de croissance. La conséquence est une large variabilité de réponses chez les plantes soumises au stress salin (Figure 4. Mahajan et Tuteja, 2005 ; Greenway et Munns, 1980; Wyn Jones et Gorham, 1983; Munns *et al.*, 2006).

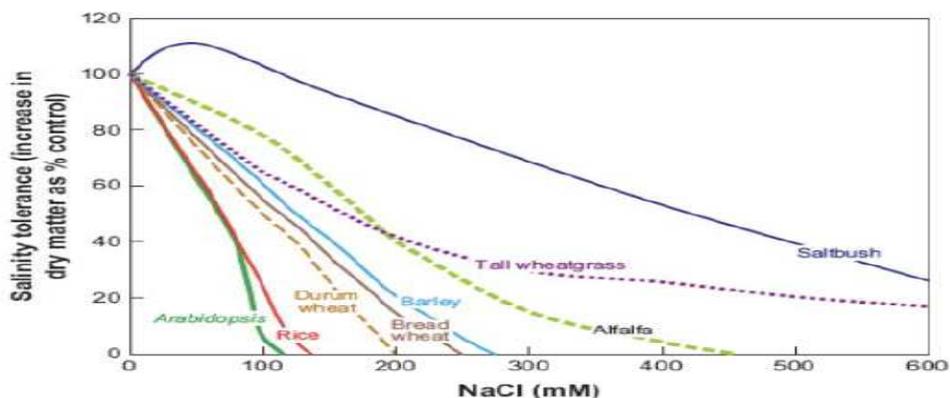


Figure 4. Diversité de la tolérance à la salinité chez quelques espèces végétales (Mahajan, S et Tuteja, N, 2005).

L'exclusion, l'inclusion, la discrimination entre Na^+ et K^+ ainsi que l'ajustement osmotique sont reconnus comme étant différents mécanismes utilisés par la plante pour tolérer le stress salin (Figure 3). L'exclusion des sels représente la capacité de la plante à restreindre l'absorption des ions toxiques vers la tige (Munns, 2002). Chez le blé, l'orge et le maïs, la tolérance à la salinité est associée à l'exclusion de l'ion Na^+ (Gorham, 1993; Alberico et Cramer, 1993). L'exclusion n'est, cependant, pas toujours synonyme de tolérance au stress salin. En effet certains génotypes, sensibles au stress salin, accumulent nettement moins d'ions Na^+ dans la tige comparativement aux génotypes tolérants (Schachtman *et al.*, 1989). Ainsi Cramer *et al.*, (1994) notent qu'un génotype de maïs tolérant le stress salin accumule l'ion Na^+ à un rythme qui est le double de celui noté chez le génotype sensible.

Les espèces « excluders » absorbent indifféremment les sels dans la sève du xylème, puis transfèrent ces sels toxiques dans les tissus conducteurs du phloème et enfin les ré-transfèrent des racines vers la solution du sol. L'inclusion représente la capacité de la plante à accumuler des quantités de sels, à des niveaux toxiques, dans la tige. Cette capacité est associée à une faible accumulation des ions toxiques dans le cytoplasme, qui est un mécanisme clé dans la tolérance au stress salin (Ashraf, 2002). La sélectivité ionique représente la capacité de la plante à réguler l'accumulation de Na^+ au profit de K^+ , phénomène de discrimination entre les ions Na^+ et K^+ (Gorham, 1993). En effet des niveaux élevés de l'ion K^+ dans les jeunes plantules sont associés à la tolérance du stress salin, chez plusieurs espèces (Bhandal et Malik, 1988).

Le locus contrôlant la discrimination a été identifié chez le blé par Dvorak *et al.*, (1994), qui montrent que lorsque ce gène est inséré dans le génome du génotype sensible, ce dernier exprime la tolérance à la salinité. L'ajustement osmotique est considéré comme un autre mécanisme de tolérance du stress salin. En effet, les plantes sont capables de tolérer le stress salin en réduisant le potentiel osmotique cellulaire, par accumulation de solutés compatibles (Hasegawa *et al.*, 2000; Serraj et Sinclair, 2002). Au cours de l'ajustement osmotique, la cellule compartimente les ions toxiques dans la vacuole et en même temps synthétise et accumule les solutés compatibles dans le cytoplasme pour maintenir l'équilibre osmotique entre les deux compartiments (Serrano et Gaxiola, 1994; Hasegawa *et al.*, 2000).

Il apparaît donc que les plantes supérieures tolèrent la salinité en développant des stratégies pour maintenir la concentration des sels toxiques dans le cytoplasme à des niveaux

raisonnables avec l'activité métabolique au lieu de développer un cytoplasme résistant à la salinité comme c'est le cas chez certaines bactéries. En effet les bactéries halophytes sont les seules espèces connues qui possèdent un cytoplasme tolérant la salinité, ce qui permet aux différents enzymes et aux membranes de fonctionner en présence de fortes concentrations salines (Kramer, 1984).

Les mécanismes mis en place par les plantes pour tolérer le stress salin sont spécifiques à chaque espèce. Certaines espèces possèdent la capacité de restreindre l'entrée du sel dans leurs tissus. Cette exclusion du sel peut avoir lieu au niveau plante ou bien au niveau cellule. D'autres espèces possèdent la capacité de minimiser la concentration des sels dans le cytoplasme, en le redirigeant vers la vacuole, phénomène de compartimentation. Cette compartimentation évite à la plante l'effet toxique du sel sur l'activité photosynthétique et les processus métaboliques.

En l'absence ou l'insuffisance de ces mécanismes, des concentrations de l'ion toxique, au-delà de 100mM, inhibent sévèrement l'activité de plusieurs enzymes (Munns *et al.*, 2006). En effet les enzymes nécessitant le potassium comme cofacteur sont particulièrement sensibles aux concentrations élevées de l'ion Na^+ ou du ratio Na^+/K^+ . Les plantes acclimatées au stress salin accumulent plus de solutés compatibles qui jouent un rôle important dans la protection des protéines et de la membrane, dans l'ajustement osmotique, et dans le nettoyage (scavaging) des espèces réactives d'oxygène (ROS) et des excès des ions d'ammonium accumulés (Munns *et al.*, 2006).

3. 4. Sélection pour la tolérance aux stress abiotiques

L'objectif de la sélection est l'identification de nouvelles lignées qui portent un ensemble de caractéristiques désirables leur permettant d'être adoptées comme variétés agricoles, sans de grands risques pour les producteurs. Elles doivent produire plus pour réduire les coûts de production au niveau de l'exploitation et surtout doivent se distinguer par une meilleure régularité des rendements et une nette amélioration de la qualité du produit récolté (Lecomte, 2005). La diminution des coûts de production, en zones sèches, passe par l'adoption de variétés relativement plus plastiques et plus adaptées qui valorisent des itinéraires techniques moins intensifs, et tolèrent un climat de nature variable (Benmahammed *et al.*, 2010).

3. 4. 1. Sélection pour le rendement

La productivité est définie comme la capacité de produire plus. C'est une notion relative. En sélection, elle désigne souvent le rendement grain. Une variété productive ne l'est, en fait que par rapport à une autre variété qu'elle remplace et à laquelle elle est comparée. Cette dernière est alors utilisée comme témoin de référence.

L'amélioration du rendement grain est généralement abordée de manière directe ou indirecte. La sélection directe utilise le rendement lui-même qui est mesuré après la mort de la plante. La sélection indirecte utilise les composantes du rendement et les caractères morpho-physiologiques (Reynolds *et al.*, 2007 ; Adjabi *et al.*, 2007).

La sélection du rendement grain n'est efficace que si les conditions de milieu qui ont permis la réalisation d'un rendement grain donné, se répètent de façon régulière. En milieux relativement plus stables, les progrès de la sélection directe sont, donc plus évidents, qu'ils ne le sont en milieux variables où les interactions génotype x environnements amenuisent le gain génétique réalisé (Bouzerzour et Djekoun, 1996 ; Catteveli *et al.*, 2002).

L'inefficacité de la sélection directe est expliquée par des interactions génotype x lieux qui réduisent la variance génotypique et le coefficient de l'héritabilité (Annichiarico *et al.*, 2006; Kamoshita *et al.*, 2008).

3. 4. 2. Sélection pour l'adaptation

L'adaptation fait suite à l'action modificatrice des facteurs extérieurs qui influencent le comportement et la structure de la plante. L'adaptation est définie aussi comme la capacité d'une plante à croître et à donner des rendements satisfaisants dans des zones sujettes à des stress de périodicités connues (Rebetzke *et al.*, 2007).

La notion d'adaptation se confond parfois avec celles de résistance et de tolérance au stress. En fait l'adaptation n'est que la résultante de la tolérance des contraintes. Une plante adaptée est donc celle qui tolère ou résiste à un stress donné et réussit à produire à un niveau satisfaisant par rapport à une autre plante qui sera dite non adaptée (Tardieu, 2003).

3. 4. 2. 1. Critères phénologiques

Les stades repères qui découpent le cycle de la plante en phases de développement, plus ou moins distinctes, sont l'épi-1cm, l'épiaison et la maturité physiologique. Parmi les changements qualitatifs que subit la plante pendant sa vie, le plus important de tous est certainement l'épiaison. La durée semis-épiaison dépend presque exclusivement de la température et de la luminosité (Fischer, 1985).

Les différences d'épiaison relative, d'année en année, sont plus courtes lorsque l'hiver est rigoureux et deviennent plus importantes lorsque l'hiver est doux (Bouzerzour et *al.*, 1998). Elles sont plus grandes chez les variétés insensibles à la photopériode et à la vernalisation et plus faibles pour les variétés sensibles à la photopériode qui tendent à épier à plus ou moins une date fixe (Worland et *al.*, 1998) ; Bahlouli et *al.*, 2005). En conditions méditerranéennes, la sélection vers une plus grande précocité au stade épiaison et à maturité a été la stratégie la plus utilisée pour minimiser les effets du stress sur le déroulement de la phase de remplissage du grain. Cette stratégie s'est révélée peu payante dans les zones où le gel tardif limite l'utilisation de génotypes précoces (Devita et *al.*, 2007 ; Mekhlouf et *al.*, 2006).

3. 4. 2. 2. Critères morphologiques

Le développement de la plante comporte une suite de changements de dimensions et de formes. Ces changements ont pour origine la croissance et le développement. Le développement quantitatif ou croissance est un changement de dimensions, alors que le développement qualitatif, ou développement proprement dit, est essentiellement un changement de formes (Kirby et Appleyard, 1984 ; Kirby, 2002). La hauteur de paille est souvent rapportée comme étant une caractéristique bénéfique en cas de stress (Annichiarico et *al.*, 2005).

Ehdaie et *al.*, (2006) expliquent cette liaison entre la hauteur de paille et l'adaptation par le transfert des assimilés stockés dans la tige vers le grain et la réalisation de ce fait d'un niveau de rendement acceptable sous stress. Pour Rebetzke et *al.*, (2002), l'importance de la hauteur sous stress est liée à la capacité de croissance du système racinaire en profondeur. Un taux de croissance élevé, dès la levée, nécessite une insensibilité aux températures froides.

Il améliore l'utilisation des pluies hivernales et permet l'obtention d'une biomasse acceptable à maturité.

Cependant ce type de croissance entraîne souvent une précocité excessive au stade épiaison. Il fait donc courir les risques de destruction des organes floraux par le gel tardif en zones d'altitudes. Il contribue, cependant, à l'évitement de la sécheresse et des hautes températures de fin de cycle. La sensibilité plus ou moins élevée aux températures basses induit une vitesse de croissance relativement plus lente en début du cycle. Les génotypes qui possèdent cette caractéristique ont tendance à végéter en hiver. Ils couvrent complètement le sol, limitent l'évaporation et leur croissance ne devient active et rapide, qu'une fois leurs besoins en froid ou en photopériode sont satisfaits (Rebetzke et *al.*, 2002).

3. 4. 2. 3. Critères physiologiques

La recherche sur la tolérance physiologique aux stress a pour objectif d'améliorer les capacités génétiques de production des plantes sous des conditions qui sont, en générale, moins favorables à l'expression du potentiel. Cette approche se justifie par le fait que certaines variétés sont plus tolérantes aux stress que d'autres.

Le comportement caractéristique des variétés populations locales, comparativement aux variétés améliorées, illustre bien cette situation et il est souvent avancé comme exemple (Tardieu, 2003). Cette approche reste cependant tributaire de l'identification des mécanismes qui permettent à la plante de surmonter le stress pour produire de manière satisfaisante et du transfert de ces mécanismes à d'autres fonds génétiques plus intéressants pour d'autres caractéristiques. L'identification de ces mécanismes repose essentiellement sur les méthodes de criblage qui doivent être simples et reproductibles, pour pouvoir les appliquer au tri d'un nombre important de lignées en ségrégations (Slafer et *al.*, 2005).

Fellah et *al.*, (2002) observent des différences génotypiques dans le temps mis par les stomates pour fermer sous stress. Ils notent aussi des différences assez conséquentes dans la teneur relative en eau pour laquelle les stomates se ferment. L'élévation de la température, tard dans le cycle et particulièrement après l'anthèse, est considérée comme une contrainte à l'augmentation des rendements en zones arides et semi-arides (Slafer et *al.*, 1990).

La capacité de rétention de l'eau par le feuillage est très utilisée pour déterminer la résistance des plantes vis à vis du stress hydrique. Clarke et Mc Craig (1982) rapportent que la mesure du contenu relatif en eau du feuillage est un bon indicateur de la résistance d'un génotype au déficit hydrique. Ces auteurs recommandent cette technique pour cribler tout germoplasme destiné aux zones sèches. La capacité de rétention de l'eau au niveau du feuillage conduit au maintien de la turgescence qui est nécessaire à la poursuite des activités métaboliques de la plante. Ce mécanisme est dû à l'accumulation de divers osmolytes. Les substances accumulées à cette fin sont des acides aminés, des acides organiques, des ions inorganiques comme les ions Na^+ , K^+ et Cl^- et des sucres solubles (Morgan, 1984).

Farshadfar et *al.*, (1995) notent que l'osmorégulation est une importante et effective composante de la tolérance au déficit hydrique dont les conséquences sont une tendance à avoir une turgescence plus élevée et une vitesse de déperdition d'eau assez faible. Utilisant les lignées de substitutions, ils montrent que les gènes qui contrôlent la turgescence foliaire et la vitesse de déperdition de l'eau par le feuillage sont essentiellement localisés sur les chromosomes 1A, 5A, 7A, 1B, 4B, 5B 3D et 5D du blé tendre (*Triticum aestivum* L.).

La durée de la surface verte ou la stabilité de la chlorophylle est une autre caractéristique qui est utilisée en sélection pour la tolérance et l'adaptation au stress thermique (Acevedo et *al.*, 1999 ; Bahlouli et *al.*, 2005). La concentration en chlorophylle de la feuille étendard, mesurée deux semaines après l'anthèse montre une corrélation significative avec le rendement en grains sous stress thermique (Reynolds et *al.*, 2007).

Dans de tels environnements, la réduction de l'activité photosynthétique des génotypes peu productifs est corrélée à la réduction de la concentration chlorophyllienne de la dernière feuille. Reynolds et *al.*, (2007) montrent l'existence d'une différence de 5°C entre la température de l'air et celle de la canopée de certains génotypes de blé tendre conduits sous stress thermique. Ils observent des écarts de température allant jusqu'à 10°C au dessous de la température de l'air pour certaines lignées. Ils suggèrent que la température du couvert végétal peut être un excellent outil de sélection pour la résistance et à l'adaptation au stress thermique.

3. 4. 2. 4. Sélection via la culture *in vitro*

Dans les zones arides et semi arides, les fortes teneurs en sel sont des facteurs essentiels limitant la production végétale, notamment celle du blé qui est largement utilisé dans l'alimentation humaine de par le monde d'où les surfaces actuellement utilisables pour sa production sont insuffisantes. L'augmentation de cette production passe par le choix d'une technologie de création d'un matériel végétal tolérant aux sels et précisément au chlorure de sodium (NaCl) pour permettre d'étendre les aires de cultures et d'assurer une meilleure suffisance alimentaire (Bajji et *al.*, 2001).

Dans ce contexte les techniques de biotechnologies végétales et plus particulièrement la culture *in vitro* des tissus peuvent jouer d'importants rôles dans la sélection de nouveaux cultivars en complément de la sélection classique aux champs. Pour cela, différentes voies biotechnologiques sont utilisées pour augmenter la diversité et les capacités des plantes à tolérer les stress, sachant que dans une population naturelle c'est la plante entière qui fait face aux pressions sélectives où le criblage est effectué à un niveau global. Par contre, *in vitro*, c'est la cellule, libérée des contraintes rencontrées dans la plante entière, qui constitue la cible des pressions sélectives afin d'arriver à une gamme de variants ainsi générés qui diffèrent de ceux issus de la sélection classique (Sibi, 1996, Catteveli et *al.*, 2002).

La diversification des bases biologiques et génétiques peut apparaître, après régénération *in vitro* de cals provenant de tissus végétaux tant somatiques (Sibi, 1976) que gamétophytiques (Burk et Matzinger, 1976; San Noeum, 1976). Il en résulte une variation somaclonale ou différente expression génétique des cellules cultivées *in vitro*. L'application des stress permet soit un criblage des cellules avec élimination naturelle des non tolérantes, soit une adaptation avec évolution des potentialités de base mais sans élimination, orientant ainsi la variabilité des régénérant vers une résistance ou une tolérance aux pressions exercées.

La régénération de plantes entières, à partir de cals placés en conditions de stress, pourrait dès lors fournir un matériel végétal présentant les caractéristiques de tolérance exprimées par les cellules mères de ces plantes (Burk et Matzinger, 1976; San Noeum, 1976). Parmi les outils biotechnologiques utilisés pour ce type de sélection, la culture de gamétophytes et la production consécutive de plantes haploïdes, ce qui attirent l'attention des sélectionneurs.

En effet, cette voie, après doublement des chromosomes, donne immédiatement des structures génétiques parfaitement fixées. Cependant, lors de la culture de souches cellulaires sous forme de cals, la variation somaclonale apparaît de façon fréquente, et la culture de gaméophytes représente, en l'occurrence, une source de variabilité plus marquée que celle des cellules somatiques (Sibi et Kandil, 1993; Sibi et Fakiri, 1994).

Il paraît donc utile d'utiliser cette première voie pour générer des variants. La régénération par culture de gaméophytes donne des succès variables selon les espèces. Pour certaines espèces comme le tabac, le blé tendre et le riz, l'androgénèse est une voie efficace; pour d'autres, elle n'aboutit pas ou, comme chez le blé dur (*Triticum durum*), elle est souvent associée à un albinisme indésirable des plantes régénérées (Zhu et Wu 1979). Ce défaut s'exprimant très rarement après gynogénèse, chose qui laisse réfléchir à élaborer une technique de culture *in vitro* d'ovaires non fécondés ou gynogénèse (Kobaissi, 2001; Sibi, 1996) qui se révèle être une voie efficace comme source de plantes vertes haploïdes et comme source potentielle de vitro-variations en milieux stressants.

L'embryogénèse somatique est une autre technique de culture *in vitro* des tissus, utilisée pour la création de nouvelles formes d'embryogénèse, c'est aux embryons zygotiques observés *in situ* dans les graines, se sont ajoutés les embryons somatiques, les embryons androgéniques et les embryons gynogéniques. Ce sont des néoformations expérimentales obtenus généralement sous l'effet de différentes contraintes abiotiques *in vitro* afin d'y avoir des variations somaclonales pour améliorer la productivité d'une espèce donnée (Kacem, 2005).

Kacem (2005) rapporte que l'embryogénèse somatique des dicotylédones est plus simple comparativement aux monocotylédones. Cette technique a été mise en évidence depuis les années 80 d'une manière incontestable chez plusieurs céréales, à savoir le blé, l'orge, le maïs et le riz.

4. Approches moléculaires pour la tolérance aux stress abiotiques

4. 1. Marqueurs moléculaires

L'utilisation des marqueurs moléculaires renforce la sélection classique. Elle identifie et étiquette les gènes d'intérêts. Elle améliore la gestion et la manipulation de la variabilité

génétique pour construire des génotypes cumulant des gènes favorables. Grâce aux marqueurs nucléaires, il devient, en effet possible, d'une part, de mieux lire le génotype à travers le phénotype, et d'autre part, de contrôler les recombinaisons entre locus en cause (Jones et *al.*, 1997; Bartels et Sunkar, 2005). Ceci est d'autant plus intéressant que les marqueurs morphologiques car ils sont relativement peu influencés par la fluctuation environnementale. Ils sont aussi indépendants de l'organe mesuré ou analysé du stade de développement du sujet concerné (Eagle et *al.*, 2001; Najimi et *al.*, 2003).

La sélection assistée par des marqueurs (SAM) devient de plus en plus un complément nécessaire aux schémas de sélection classique d'amélioration des céréales (Hospital, 2001). Cette technique a été utilisée de manière avantageuse dans l'amélioration de la résistance aux maladies et aux insectes (Langridge et *al.*, 2001).

Les marqueurs sont, en effet, considérés comme des caractères liés au caractère principal à sélectionner. Paterson et *al.* (1991), montrent l'existence de QTL (Quantitative Traits Loci) spécifiques pour l'adaptation à certains milieux. Pour obtenir donc, des variétés stables, il faut accumuler dans un même fond génétique, le maximum de QTL d'adaptation. La SAM devrait permettre de construire plus rapidement et avec plus de sécurité de tels génotypes.

4. 2. Génie génétique

L'introduction directe d'un petit nombre de gènes par génie génétique offre une alternative attrayante et une approche rapide pour l'amélioration de la tolérance aux stress abiotiques. La stratégie basée sur le génie génétique repose sur le transfert d'un ou plusieurs gènes qui codent soit pour un processus biochimique soit comme terminateurs de la voie des signaux de transcriptions (Yang et *al.*, 2001). Les produits résultants de l'action des gènes introduits apportent une certaine protection, directe ou indirecte, vis à vis des stress abiotiques (Yang et *al.*, 2003).

Dans ce contexte les gènes codant pour les *Late Embryogenesis Protein Abundant (LEA)*, qui s'accumulent au cours de la dessiccation du grain et dans les tissus végétaux, lorsque la plante expérience le déficit hydrique, ont émergé récemment comme des candidats attractifs pour la génomique de la tolérance au stress (Lee et Vierling, 2000).

La plus part des stress induisent la production des oxydants. Ainsi la surproduction des enzymes détoxifiants tels que les superoxydases dismutases a été une des premières approches d'évaluation de la tolérance globale des plantes aux stress (Alscher et *al.*, 2002). Il en est de même de la surproduction des osmotocums compatibles comme le tréhalose (Jang et *al.*, 2003) et la glycine betaine (Chen et Murata, 2002) qui ont un effet protecteur des membranes vis-à-vis du stress.

4. 3. Gènes de tolérance à la salinité

Des progrès considérables ont été effectués ces dernières années. En effet, plusieurs gènes associés à la tolérance aux stress abiotiques ont été caractérisés et récemment, plusieurs approches de transfert de gènes ont été employées pour l'amélioration de la tolérance des plantes à ces stress abiotiques.

4. 3. 1. Influx du sodium: Les transporteurs HKT

Les fonctions cellulaires végétales sont tributaires d'un rapport K^+/Na^+ élevé. En présence d'une forte concentration en NaCl, les ions Na^+ entrent en compétition avec les ions K^+ à travers les co-transporteurs Na^+-K^+ ou même les transporteurs K^+ spécifiques des cellules racinaires (Zhu, 2003). Ce déséquilibre ionique entraîne des niveaux toxiques de Na^+ et des concentrations en K^+ insuffisantes pour les réactions enzymatiques et l'ajustement osmotique. Chez certaines plantes, telles que *Arabidopsis* et le blé, sous l'effet d'un stress salin, des transporteurs K^+ spécifiques HKT (High Affinity Potassium Transporter) de la membrane cytoplasmique ont aussi une faible affinité pour les ions Na^+ .

L'expression d'un anti-sens de *HKT1* du blé dans cette plante cause une diminution de l'entrée du ^{22}Na par les racines et stimule la croissance en milieu salin, par rapport aux plantes sauvages (Laurie et *al.*, 2002). On peut ainsi dire que sous l'effet du sel, les transporteurs de type HKT participent à l'influx du sodium.

4. 3. 2. Efflux du sodium: Les transporteurs SOS1

L'efflux du sodium des cellules racinaires empêche l'accumulation de niveaux toxiques de Na^+ dans le cytoplasme. L'analyse génétique des mutants *sos* (salt overly sensitive) d'*Arabidopsis* sensibles à NaCl, a permis d'identifier le gène SOS1 codant pour un antiport Na^+/H^+ de la membrane cytoplasmique. Ce transporteur joue un rôle primordial non

seulement dans l'efflux du sodium des cellules racinaires mais aussi dans son transport à longue distance vers la tige (Shi et Zhu, 2002). La surexpression du gène SOS1 augmente la tolérance d'*Arabidopsis* au stress salin (Shi et *al.*, 2003).

L'activité de SOS1 est régulée dans des conditions de stress salin par le complexe protéique SOS2/SOS3. Le signal calcique spécifique du stress salin est perçu par SOS3 qui est une protéine liant le calcium. Ensuite, cette protéine transmet ce signal en activant la protéine SOS2 qui est une sérine/thréonine-kinase. SOS2 possède le domaine catalytique de la kinase dans la partie N-terminale et le site de liaison à SOS3 (motif FISL) dans la partie C-terminale.

En effet, suite à un stress, SOS3 se lie au motif FISL et stimule l'activité kinase de SOS2, qui une fois activée va phosphoryler SOS1 et entraîner son activation. De plus, l'activation transcriptionnelle de SOS1 sous l'effet d'un stress salin est inhibée chez les mutants *sos2* et *sos3*.

On peut ainsi conclure que la voie de signalisation par SOS2/SOS3 stimule l'expression du gène SOS1 (et/ou favorise la stabilité du transcrit) ainsi que son activité de transport Na^+/H^+ à travers la membrane plasmique. Il est important de signaler qu'outre l'accumulation du Ca^{2+} suite à un stress salin, l'acide abscissique (ABA) s'accumule aussi et joue un rôle dans la régulation de la voie de signalisation SOS, via une phosphatase 2C, la protéine ABI2. Cette dernière régule négativement la tolérance au stress salin en inhibant SOS2 ou des transporteurs SOS2-dépendants (Ohta et *al.*, 2003).

4. 3. 3. Compartimentation vacuolaire du sodium: Les antiporteurs NHX et les pyrophosphatases

Une autre stratégie développée par les plantes pour lutter contre les excès de sodium dans le cytoplasme est de le séquestrer dans la vacuole. Cette séquestration vacuolaire permet non seulement d'abaisser les concentrations cytoplasmiques en Na^+ mais aussi d'ajuster le potentiel osmotique (Zhu, 2003). Elle est assurée par des antiports Na^+/H^+ dont l'activité dépend de pompes à protons vacuolaires du type H^+ -ATPase et H^+ -pyrophosphatase. Ces phosphatases génèrent un gradient de protons (ΔpH) servant de force motrice aux antiports (Drozdowicz et Rea, 2001).

La surexpression d'une pyrophosphatase d'*Arabidopsis* *AVP1* résulte dans l'augmentation de la séquestration de sodium dans la vacuole et le maintien du potentiel hydrique dans les feuilles. En conséquence, ces plantes montrent une tolérance au stress salin plus élevée que les plantes d'*Arabidopsis* sauvages (Gaxiola et *al.*, 2001). En outre, des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* surexprimant l'antiport *AtNHX1* sont tolérantes à des fortes concentrations de NaCl à l'ordre de 200 mM (Apse et *al.*, 1999). Ce même gène surexprimé chez la tomate (très sensible au sel) entraîne une forte amélioration de sa tolérance au stress salin. Ces plantes transgéniques sont capables de se développer et de produire des fruits en présence de 200mM NaCl (Zhang et Blumwald, 2001).

L'analyse du génome d'*Arabidopsis* montre la présence de 5 autres gènes codant pour des antiports du type NHX (*AtNHX2-6*). L'analyse de l'expression de ces gènes montre que les ARN_m de *AtNHX1* et de *AtNHX2* sont les plus répandus. Ils sont exprimés constitutivement dans les feuilles et dans les racines et l'abondance des transcrits est induite par des stress osmotiques et dépend de l'acide abscissique (ABA) (Shi and Zhu, 2002; Yokoi et *al.*, 2002). L'existence de ce type d'antiport a aussi été démontrée chez des plantes halophytes comme *Atriplex gmelini* (Matoh et *al.*, 1989), des glycophytes comme l'orge (Gabarino et Dupont, 1988) et le blé (Brini et *al.*, 2005).

Effet du stress salin sur les caractères morphologiques et physiologiques de deux variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), Mahon-Demias et Hidhab

Résumé

Les résultats de cette étude qui porte sur l'analyse de la réponse des plantules de deux variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), Mahon-Demias et Hidhab au stress salin, mettent en relief l'effet négatif de la salinité sur le taux de germination des graines et indiquent la sensibilité de MD par rapport à HD. Le stress salin réduit significativement la longueur des racines et des épicotyles des deux variétés. MD accuse une plus grande réduction de la longueur de ces deux caractères que HD sous stress de 200mM NaCl, la surface foliaire de MD est réduite de 50.2% contre 24.8% pour HD. La variation du potentiel hydrique et de la teneur relative en eau suggèrent que MD est plus sensible à la salinité que HD. Le contenu en ions indique que l'accumulation de Na⁺ est plus importante dans les gaines de HD et les limbes de MD avec peu de différence entre les deux variétés pour le contenu des racines en Na⁺. Ceci indique que HD met en jeu un mécanisme supplémentaire pour contrer la salinité, en séquestrant préférentiellement Na⁺ dans la gaine, que dans le limbe à l'inverse de la variété MD. HD présente une plus grande capacité à accumuler l'ion K⁺ dans les limbes et au niveau des racines par rapport à MD. Ceci engendre un rapport K⁺/Na⁺ du limbe foliaire plus élevé chez HD comparativement à celui de MD. Les résultats indiquent que c'est surtout au niveau des feuilles que HD rétablit l'équilibre de son potentiel osmotique via l'ion K⁺ et minimise ainsi l'effet du stress osmotique engendré par NaCl. La capacité de HD à pomper de K⁺ de la solution nutritive, puis de le véhiculer vers le limbe, représente donc une stratégie d'adaptation au stress salin via la régulation osmotique. Le stress salin affecte significativement le contenu en chlorophylle. La réduction est moindre chez HD comparativement à MD. La fluorescence baisse sous l'effet du stress mais ne discrimine pas entre les deux génotypes étudiés. Le contenu en sucres solubles augmente sous l'effet de la salinité et de manière plus importante chez HD que chez MD. Ces résultats suggèrent la plus grande tolérance à la salinité de HD comparativement à MD.

Mots clés: *Triticum aestivum* L., Stress salin, Germination, Tolérance, Fluorescence.

تأثير الإجهاد الملحي على الخصائص المورفولوجية و الفيزيولوجية لصنفين من القمح اللين

Hidhab و Mahon-Demias ، (*Triticum aestivum* L.)

ملخص

يهدف هذا الجزء من الدراسة إلى مقارنة سلوك و إجابة نباتات الصنفين HD و MD من القمح اللين- *Triticum aestivum* L تحت ظروف الإجهاد الملحي. تبين النتائج التأثير السلبي للملوحة المطبقة على الانتاش و تبيين حساسية الصنف MD مقارنة مع الصنف HD. تؤثر الملوحة بفعالية على إنقاص طول الجذور و كذلك على السويقة العلوية للصنفين لكن يبدو ان الصنف MD أكثر تأثراً لهاتين الصفتين من الصنف HD. إن تركيز 200 ملي مول من الملح NaCl يؤثر على المساحة الورقية للصنف MD بنسبة 50.2% و بنسبة 24.8% للصنف HD. إن تغيرات قيم الضغط المائي و الكمية النسبية للماء يؤكد حساسية الصنف MD للملوحة أكثر من الصنف HD. إن تركيز ايونات الصوديوم Na^+ يكون أكثر في عنق ورقة الصنف HD و في نصل ورقة الصنف MD مع تغير طفيف بين الصنفان في محتوى هذا العنصر على مستوى الجذور، و هذا ما يفيد بان الصنف HD يستعمل إمكانيات إضافية لمقاومة الملوحة بالطردي التفاضلي الزائد للصوديوم في السويقة العلوية عكس ما تقوم به MD. كما أن الصنف HD يبدي سعة كبيرة لتخزين عنصر البوتاسيوم K^+ في نصل الورقة و في الجذور مقارنة مع الصنف MD، و هذا ما يعطي نسبة K^+/Na^+ للنصل أكثر عند HD، و عليه فان هذا الصنف يعيد توازنه للضغط الاسموزي على مستوى الأوراق عن طريق ايونات K^+ فيقلل من اثر الضغط الاسموزي الحاصل بفعل التعرض للملوحة بفعل NaCl المطبق كإجهاد لحيوي. إن استطاعة HD الحصول على ايونات K^+ من محلول التغذية و تحويلها إلى السويقة العلوية يمثل إستراتيجية تأقلم للإجهاد الملحي عن طريق التعديل الاسموزي. إن الإجهاد الملحي يصيب بقوة الكلوروفيل عند MD منه عند HD. إن الإشعاع الكلوروفيلي ينخفض تحت تأثير الملح، و لكن لا يبدو ذلك واضحاً بصورة جيدة عند الصنفين المدروسين. إن كمية السكريات الذائبة تزداد بفعل الملوحة و بنسبة عالية عند HD مقارنة بالصنف MD. إن هذه النتائج تبين بوضوح قدرة تحمل الملوحة من قبل الصنف HD مقارنة بالصنف MD.

الكلمات المفتاحية : *Triticum aestivum* L.، الإجهاد الملحي، الانتاش، التحمل، الإشعاع الكلوروفيلي

Salt stress effects on morphological and physiological characters of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars, Mahon-Demias and Hidhab

Abstract

The aim of this investigation is to study the response of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties Mahon-Demias and Hidhab to salt stress at the seedling stage. The results showed a negative effect of salinity on seed germination, with MD showing higher sensitivity than HD. Salt stress significantly reduced roots and epicotyls length of both varieties. MD showed a greater reduction in the length of both characters than HD when subjected to 200 mM NaCl. The leaf area of MD is reduced by 50.2% against 24.8% for HD. Variation of water potential and relative water content suggest that MD is more sensitive to salinity than HD. Monitoring the ion content, indicated that the accumulation of Na⁺ is higher in HD sheaths and in MD blades, with a light difference between both varieties for Na⁺ content of the roots. This suggests that HD involves an additional mechanism to counter salinity, sequestering preferentially sodium in the sheath than in the blade while the reverse was observed for MD. HD has a greater capacity to accumulate K⁺ in blades and roots compared to MD, leading to high a ratio K⁺/Na⁺ leaf blade of HD compared to MD. This suggests that it is mainly inside the leaves that HD restores the balance of the osmotic potential via K⁺ and thus minimizes the effect of osmotic stress caused by NaCl. The ability of HD to pump K⁺ from the nutrient solution, and then convey it to blades represents an adaptation strategy to salt stress via osmotic regulation. Salt stress significantly affects the chlorophyll content, and reduction is lower in HD compared to MD. Fluorescence decrease as a result of stress but does not discriminate between the two genotypes. The content of soluble sugars increased under the effect of salinity, more in HD than in MD. These results suggest greater tolerance to salinity of HD compared to MD.

Keywords: *Triticum aestivum* L., Salt stress, Germination, Tolerance, Fluorescence.

Introduction

La salinité est un obstacle majeur pour la production agricole des zones arides et semi-arides caractérisées par de faibles précipitations conduisant à l'accumulation du sel en surface du sol. Chez les céréales, la salinité affecte la germination des graines, la croissance des plantules et le rendement en grain (Gill et *al.*, 2003).

L'effet nuisible du sel résulte de la combinaison du déficit hydrique et de la toxicité des ions, et par conséquent, le stress salin réduit la capacité des plantes à absorber l'eau et les soumettant ainsi à l'effet du déficit hydrique favorisant ainsi les quantités excessives de sel dans les tissus végétaux qui inhibent le développement cellulaire et entraînant un retard de croissance (Munns et *al.*, 2006). Même si le déficit hydrique reste le facteur le plus limitant de la production céréalière, la salinité est signalée comme un problème de plus en plus important, qui amplifie et exagère cet effet.

La demande plus élevée en produits céréaliers conduit à la mise en culture des zones de moins en moins favorables, caractérisées par des stress abiotiques sévères (Daoud et Halitim., 1994). Dans ce contexte, l'amélioration génétique de la tolérance du matériel végétal vis-à-vis des stress et notamment le stress salin est un moyen non négligeable pour minimiser la réduction du rendement et maintenir la production agricole dans les environnements contraignants. La mesure de l'aptitude à tolérer le stress est la première phase dans le processus de la sélection végétale afin d'identifier des lignées tolérantes qui peuvent être utilisées directement en production ou bien utilisées comme géniteurs dans des croisements pour générer un matériel tolérant et performant.

Diverses approches sont utilisées pour cribler le matériel végétal vis-à-vis de la tolérance à la salinité (Colmer et *al.*, 2005). La réponse de la germination, la croissance des plantules ainsi que la vitesse de transfert des ions Na^+ dans la tige et la discrimination des ions Na^+ au profit des ions K^+ , sont des indicateurs précieux de la tolérance des cultivars à la salinité (Munns et James, 2003; El-Hendawy et *al.*, 2005).

La mise en place de la céréale suit trois processus, à savoir, la germination, la levée et la croissance des plantules. Ces stades végétatifs sont très sensibles au stress salin, ils servent

comme critères dans le criblage pour la tolérance à la salinité (El-Hendawy et *al.*, 2005; Munns et *al.*, 2006).

Le blé tendre est une espèce modérément tolérante, par rapport au blé dur et à l'orge, même si chacune de ces espèces peut présenter une grande variabilité génétique pour la réponse au stress salin (Royo et Abio, 2003; Steppuhn et *al.*, 2005).

La présente étude a été entreprise pour étudier la réponse de deux variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), Mahon-Démias et Hidhab, à différents niveaux de salinité au stade plantule.

Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal

Les variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) utilisées dans le présent travail ont été fournies gracieusement par l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) de Sétif.

La variété Mahon-Demias (MD), est une sélection généalogique faite à l'intérieur d'une population introduite des Iles Baléares (Laumont et Erroux, 1961). Les souches de cette population ont été isolées puis utilisées comme matériel de départ pour la multiplication par la station expérimentale agricole de Sidi Bel Abbés (Laumont et Erroux, 1961). MD est une variété rustique, à cycle de développement relativement long permettant d'esquiver les gels tardifs qui caractérisent la zone de production. Sa paille fine, haute et demi-pleine, la fait apprécier par les éleveurs qui l'utilisent comme aliment du bétail. Elle se caractérise par une large adaptation aux zones arides et semi-arides et aux hauts plateaux. MD est une variété qui est tolérante aux rouilles jaune et noire, possédant une qualité technologique moyenne et une production faible mais régulière (Amokrane et *al.*, 2002).

La variété Hidhab (HD), dont le pedigree est HD₁₂₂₀/3*Kal/Nac, est une sélection de l'ITGC de Sétif datant de 1985, faite à l'intérieur du matériel végétal provenant de Centre International d'Amélioration du Maïs et du Blé (CIMMYT = Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz et Trigo). C'est une variété à cycle court, précoce à l'épiaison, ce qui lui permet de tolérer les stress hydrique et thermique de fin de cycle. C'est une variété à fort tallage, aux épis blancs, demi-compact, aux barbes divergentes et à paille courte et creuse

(Amokrane et *al.*, 2002). Elle présente une adaptation très large, embrassant toutes les régions du pays, elle est très appréciée par les agriculteurs. Elle remplace la variété Mahon-Demias dans plusieurs zones agro-climatiques. Elle présente une sensibilité élevée à la rouille jaune, et sans une couverture phytosanitaire adéquate, son rendement est faible sous forte attaque de ce pathogène, elle possède de bonnes caractéristiques technologiques pour la panification, c'est un blé de force (Amokrane et *al.*, 2002).

2. Mise en place de l'expérimentation

L'expérience a été conduite au Laboratoire de protection et d'amélioration des plantes (LPAP) du centre de biotechnologie de Sfax (CBS), Tunisie, dans le cadre d'un projet conjoint de recherche, Algéro-Tunisien (2009-2011), dans le domaine des biotechnologies végétales et génétique moléculaire des plantes. Pour la détermination de l'effet de la salinité sur la capacité de germination et croissance des plantules, les graines des deux génotypes ont été stérilisées à l'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 0.5%, pendant 15 minutes puis rincées, par trois fois, à l'eau distillée stérile.

30 graines par boîte de pétri sont mises sur papier filtre humecté à l'eau distillée pour pré-germination pendant 48h à l'obscurité et à température ambiante du laboratoire. Après gonflement, les graines de chaque variété ont été incubées dans une chambre de culture à 25°C sous une photopériode de 16h de lumière / 8h d'obscurité et de 60±10% d'humidité relative pour l'émission des premières racines et feuilles. Après la levée, les plantules sont irriguées avec des concentrations salines, chaque jour, selon le protocole décrit ci-après.

L'essai est mis en place dans un dispositif factoriel en blocs, avec trois répétitions, à raison d'une boîte de pétri par répétition (12 boîtes de pétri ont été utilisées au total pour chaque génotype). Le facteur variété a deux modalités: MD et HD et le facteur salinité prenant trois modalités: 50, 100 et 200mM NaCl, plus le témoin. Les plantules provenant des graines germées, atteignant le stade deux à trois feuilles sont transplantées dans des pots de végétation. Ces derniers sont mis sous les mêmes conditions décrites précédemment de photopériode, d'humidité relative, un rayonnement de 280 mmol.m².s⁻¹, et une température de 25 ± 5°C. Les concentrations salines (0, 50, 100 et 200mM NaCl), ont été appliquées tous les 3 jours.

Les mesures sont effectuées au début du traitement salin pour une première récolte des plantules et les récoltes successives ont été faites à différentes périodes (3, 7, 10 et 14 Jours), après imposition du stress salin.

3. Variables mesurées

3. 1. Taux de germination

La germination est notée par comptage effectué tous les 24 heures, jusqu'au 10^{ième} jour. Le pourcentage de graines germées est déterminé par le rapport entre le nombre des plantules normales développées sur le nombre total de graines incubées (ISTA, 2003), d'où :

$$G(\%) = 100 \left(\frac{NGG}{NTG} \right),$$

Où G (%) est le pourcentage de germination, NGG est le nombre des graines germées et NTG est le nombre total des graines incubées. Toute plantule dont la longueur de la racicule est égale ou supérieure à 2 mm est considérée comme normale (ISTA, 2003).

3. 2. Longueur des racines et des épicotyles

La longueur maximale des racines séminales a été déterminée comme étant la longueur de la racine la plus longue, en moyenne de l'échantillon de dix plantules. La longueur des épicotyles est mesurée, à partir de la couronne ou premier nœud jusqu'à la sortie de la première vraie feuille (Simmons et *al.* 1995).

3. 3. Surface foliaire

La surface moyenne de la feuille la plus développée (avant dernière feuille = la plus jeune adulte feuille), est déterminée à partir d'un échantillon de dix plantules par traitement, par la formule suivante: $SF (cm^2) = Lxl \times 0.709$, où : L est la longueur moyenne du limbe des 10 feuilles, l est la largeur du limbe moyenne du limbe des 10 feuilles et 0.709 représente le coefficient de correction, étant donné que la feuille a une forme triangulaire (Mefti et *al.*, 2008).

3. 4. Potentiel hydrique

Le potentiel hydrique est mesuré sur des disques foliaires de 5mm de diamètre, excisés du limbe foliaire des plantules des différents traitements. Les disques foliaires sont chargés dans la chambre du psychromètre de marque Wescor C-52, dont la lecture donne le potentiel hydrique de l'échantillon soumis (Figure 5).



Figure 5. Type de psychromètre Wescor C-52 utilisé

3. 5. Teneur relative en eau (TRE)

La teneur relative en eau (TRE) est déterminée d'après la méthode de Barrs (1968), décrite par Bajji et *al.*, (2001). L'avant dernière feuille de chaque plantule est prélevée, puis mise dans papier aluminium pour limiter les pertes d'eau transpiration.

Les échantillons foliaires sont pesés directement pour avoir le poids frais (PF). Ils sont ensuite mis dans des tubes à essai remplis à moitié d'eau distillée, stockés au frais et sous obscurité. Le poids turgide (PT) est déterminé 24 heures après. Le poids sec (PS) est déduit suite à la mise des échantillons foliaires dans une étuve ventilée dont la température est portée à 85°C, pendant 48 h. La TRE est déduit par la formule suivante:

$$TRE (\%) = 100 \left[\frac{(PF - PS)}{(PT - PS)} \right]$$

3. 6. Teneur en chlorophylle

La mesure du taux de chlorophylle des feuilles a été effectuée avec un chlorophylle-mètre *minolta SPAD 502* (Spectrum Technology Inc., IL. USA, Figure 6). C'est un radiomètre manuel dont la mesure correspond à un rapport entre les réflectances de la feuille dans le rouge (650nm) et le proche infrarouge (940nm) (Kotchi, 2004).

Les mesures sont effectuées sur l'avant dernière feuille. Trois mesures, en unité arbitraire, sont prises par plantule.



Figure 6. Chlorophylle-mètre minolta SPAD 502

3. 7. Fluorescence chlorophyllienne

La fluorescence chlorophyllienne est mesurée avec un fluoromètre type monitoring system Hansatech (Figure 7). Cet appareil consigne automatiquement la fluorescence initiale (F0): c'est la valeur minimale de la fluorescence lorsque tous les accepteurs d'électrons du photosystème II (PSII) sont complètement oxydés. La fluorescence initiale F0 a pour origine les chlorophylles qui forment les antennes collectrices du PSII. La fluorescence maximale (Fm) correspond à la valeur maximale de la fluorescence obtenue pour la même intensité lumineuse.

Cette valeur est obtenue lorsque toutes les premières quinones accepteurs d'électrons sont complètement réduites et le rendement quantique qui est exprimé par le rapport $(F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$, dans lequel F_v est la fluorescence variable. Le rendement quantique traduit l'efficacité du PSII à utiliser la lumière pour la conversion photochimique (effet Kausky, Figure 8). La valeur du rendement quantique approche la valeur de 0.8 chez une plante non stressée, et diminue chez les plantes soumises à la contrainte (Eyletters et Bourrie, 1996).



Figure 7. Fluoromètre de type monitoring system Hansatech

Pour ce faire le limbe foliaire est placé à l'obscurité durant 30 minutes dans le clip du fluoromètre. Sur le plan physiologique, cette opération supprime le flux des photons source d'énergie pour la photosynthèse, ceci vide la chaîne de transfert d'électrons. Les centres réactionnels sont alors totalement disponibles. Un flash lumineux est envoyé sur la surface testée. Les accepteurs d'électrons du PSII sont saturés.

L'énergie lumineuse excédant les possibilités de collecte du PSII est alors réémise sous forme de fluorescence, selon une cinétique particulière. Ensuite, la chaîne de transfert d'électrons s'enclenche et atteint un régime stationnaire. L'intensité de la fluorescence monte rapidement d'une valeur initiale F0 vers une valeur maximale (Fm) en moins d'une seconde.

Au cours de cette phase, le fluoromètre digitalise les mesures toutes les 10 microsecondes (μsec). Le tracé de la courbe montre des différences sensibles entre les plantes témoins et les plantes stressées (Figure 8).

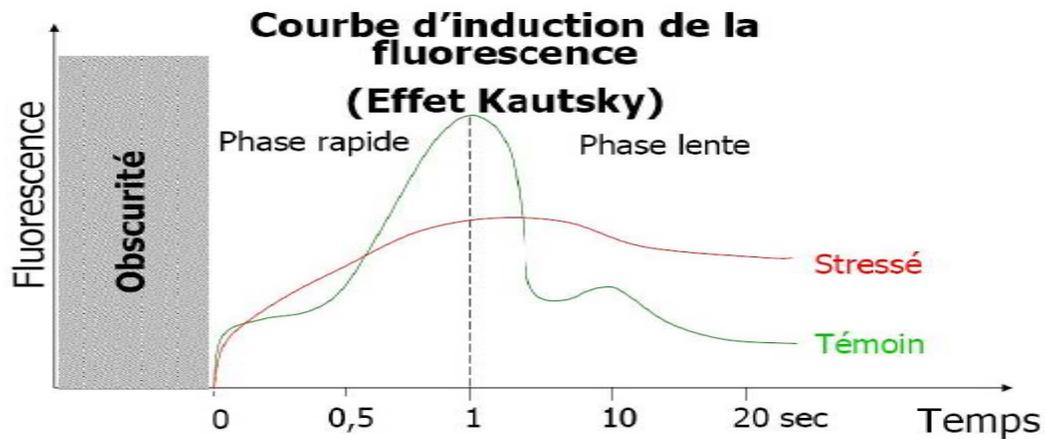


Figure 8. Courbe d'induction de la fluorescence (Oukaroum, 2007)

3. 8. Teneur en sucres solubles

La mesure du taux des sucres solubles est appliquée sur la matière fraîche de l'avant dernière feuille des plantes, les sucres sont dosés par la méthode de Dubois et *al.*, (1956). Selon cette méthode, 100 mg de matière fraîche est met dans des tubes à essai contenant 3ml éthanol 80% pendant 48h à température ambiante pour extraire les sucres. Au moment du dosage, les tubes sont placés dans l'étuve à 80°C pour faire évaporer l'alcool.

Dans chaque tube on ajoute 20ml d'eau distillée, c'est la solution à analyser. Dans d'autres tubes à essai propres, on introduit 1ml de la solution à analyser auquel on ajoute 1ml de phénol à 5% (diluée dans l'eau distillée), après agitation on ajoute 5ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 96% ($d=1.86$) à l'aide d'une burette, en évitant de verser l'acide contre les parois des tubes. Après agitation rapide, les tubes sont maintenus pendant 10 à 20 minutes dans un bain marie à 30°C, et les mesures d'absorbance sont effectuées à une longueur d'onde de 485nm. Les valeurs des densités optiques sont rapportées sur courbe étalon des sucres solubles exprimés en glucose (Figure 9).

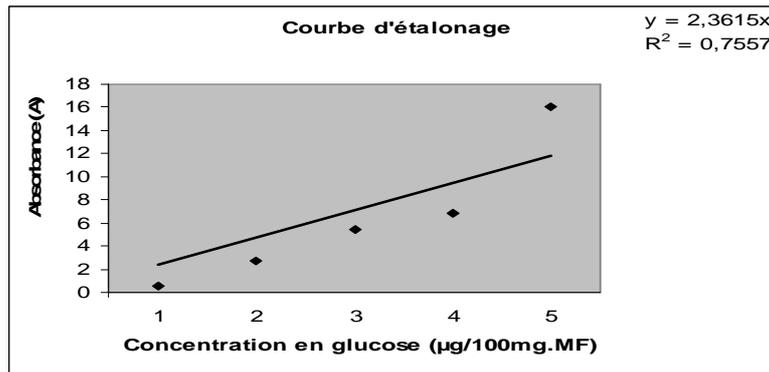


Figure 9. Courbe d'étalonnage des sucres solubles

3. 9. Dosage des ions

Pour le dosage des ions, le matériel végétal a été extrait sec dans de l'acide nitrique (HNO_3) à 0,5% sous une température de 70°C pendant 4 jours. Les ions Na^+ et K^+ ont été estimés par photométrie de flamme (Figure 10). Le principe de la mesure repose sur le fait qu'une partie des ions soumis à la chaleur de la flamme passent à un état excité. Le retour à l'état fondamental des électrons de la couche externe s'effectue avec émission caractéristique de l'ion analysé. L'intensité de l'émission est proportionnelle au nombre d'atomes retournés à l'état initial. La lumière émise est donc proportionnelle à la concentration de l'échantillon.

La loi de Maxwell-Boltzmann permet de déterminer le rapport des électrons dans un état fondamental et dans un état excité en fonction de la température d'où : $N_1/N_0 = g \cdot \exp[-\Delta E/kT]$, avec : g , le rapport statistique des états 1 et 0 ; k , constante des Boltzmann = $1.38 \times 10^{-23} \text{J/K}$; ΔE , écart énergétique en Joule ; T , la température en K [Kelvin, d'où $T (\text{k}) = 298 + 25^\circ\text{C}$]



Figure 10. Photomètre de flamme

4. Analyse des données

Les données ont été traitées par l'analyse de la variance, en utilisant le logiciel Cropstat 7.2.3 (2009). Les moyennes des traitements ont été comparées par Duncan Multiple Range Test (DMRT) au seuil de probabilité de 5%.

Résultats

1. Effet du stress salin sur les caractères morphologiques

1. 1. Germination

L'analyse des mesures effectuées montrent un effet dépressif du sel sur le taux de germination des graines (Tableau 3 et 4). L'effet moyen variété et salinité est significatif ainsi que l'interaction (Variété x Salinité) (Tableau 3). Ceci suggère que le choix d'un génotype est fonction du degré de salinité du milieu ciblé.

Tableau 3. Carrés moyens de l'analyse de la variance du (% G), (LR), (LE) et (SF) des plantules de MD et HD soumises au stress salin.

Source de variation	ddl	% G	LR	LE	SF
Variétés (V)	1	706,77**	1,7*	14,96*	29,88*
Salinité (S)	3	2092,79**	3,47*	1,18*	27,00*
V x S	3	96,78**	0,04 ^{ns}	0,01 ^{ns}	2,99*
Résiduelle	16	0,22	0,04	0,06	0,09

ns, *, ** = effet non significatif et significatif au seuil de 5 et 1%, respectivement. % G = Taux de germination, LR = longueur des racines, LE = longueur des épi cotyles, SF = surface foliaire.

En moyenne des quatre concentrations salines étudiées, le taux de germination de la variété MD est de 76.1% contre 86.9% pour la variété HD. Ces résultats suggèrent que la MD, en moyenne, est relativement plus sensible que HD au stress salin. En effet sous stress salin, 23.9% des graines de MD ne germent pas contre 13.1% pour HD.

Tableau 4. Moyennes du (% G), (LR), (LE), et (SF) des plantules de MD et HD soumises au stress salin.

NaCl (mM)	MD					HD				
	0	50	100	200	MG	0	50	100	200	MG
% G	100 ^a	86,3 ^b	70 ^c	48 ^d	76,1	100 ^a	97,6 ^b	82,6 ^c	67,3 ^d	86,9
LR	5,1 ^a	5 ^a	4,3 ^b	3,3 ^c	4,4	5,6 ^a	5,3 ^{a, b}	4,9 ^{a, b}	4,0 ^b	4,9
LE	4,8 ^a	4,5 ^a	4 ^b	3,9 ^b	4,3	6,4 ^a	6,1 ^{a, b}	5,7 ^b	5,4 ^c	5,9
SF	12,1 ^a	12 ^a	8,4 ^b	6,4 ^c	9,7	13,2 ^a	12,9 ^a	11,9 ^b	10 ^c	11,9

Les moyennes sur la ligne, suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%. %G = pourcentage de germination, LR = longueur des racines, LE = longueur de l'épicotyle, SF = surface foliaire, MD = Mahon-Demias, HD = Hidhab, MG = moyenne générale.

En moyenne des deux variétés, le taux de germination est réduit par (-0.222%) pour toute augmentation de la salinité de (1mM) (Figure11). L'étude de l'interaction (variété x salinité) révèle que le taux de germination diminue de (-0.174%) pour chaque augmentation de la salinité de (1mM) chez MD, contre une diminution de (-0.261%) pour HD (Figure 12). Ces résultats confirment l'effet de la salinité sur le taux de germination des deux variétés de blé tendre comme ils indiquent aussi la différence de sensibilité des deux génotypes vis-à-vis du stress salin. MD se montre plus sensible à mesure que l'intensité de la salinité devient importante par contre HD réagit relativement moins.

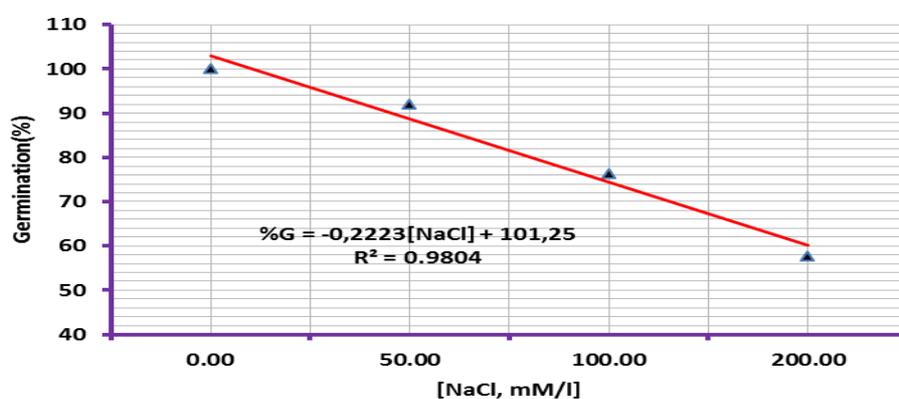


Figure 11. Effet de différentes concentrations de NaCl sur le pourcentage de germination des graines, (moyennes de deux variétés de blé tendre MD et HD).

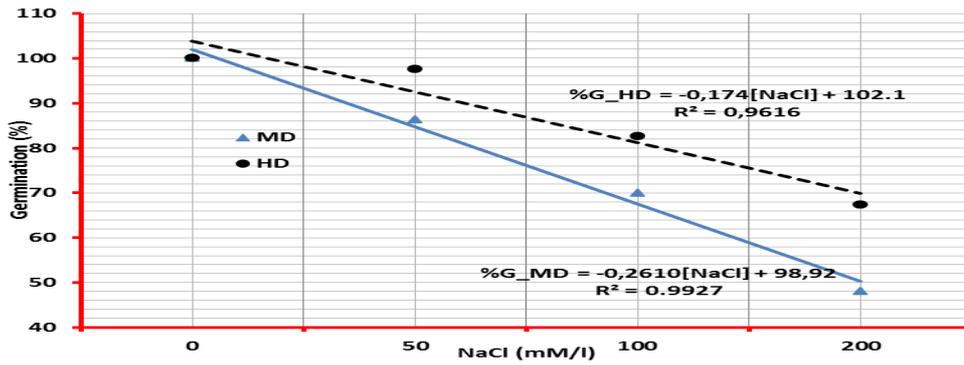


Figure 12. Variation du pourcentage de germination des graines de variétés de blé tendre MD et HD soumises à différentes concentrations de NaCl.

1. 2. Longueur des racines et des épicotyles

L'analyse de la variance de la longueur des racines et celle des épicotyles montre des effets variété et stress salin significatifs, alors que l'interaction ne l'est pas (Tableau 3). Ceci suggère que les différences entre variétés sont indépendantes de l'intensité du stress salin. En effet la moyenne de la longueur des racines est de 4.4 cm pour MD contre 4.9 cm pour HD (Tableau 4). Alors que la moyenne de la longueur des épicotyles est de 4.3 cm pour MD contre 5.9 cm pour HD (Tableau 4). Ces résultats confirment la plus grande sensibilité du cultivar MD par rapport au cultivar HD. En effet MD accuse une plus grande réduction de la longueur des racines et des épicotyles sous l'effet du stress salin comparativement à HD.

Sous l'effet du stress salin, la longueur des racines diminue de (5.4 cm), moyenne du témoin non stressé à (3.7 cm) valeur moyenne mesurée sous stress de 200mM NaCl (Figure 13). La longueur racinaire diminue de (-0.009 cm) pour chaque augmentation de 1mM NaCl. En effet le modèle linéaire prend la forme: $Rac (cm) = -0.009 [NaCl] + 5.5$, $R^2 = 0.9296$.

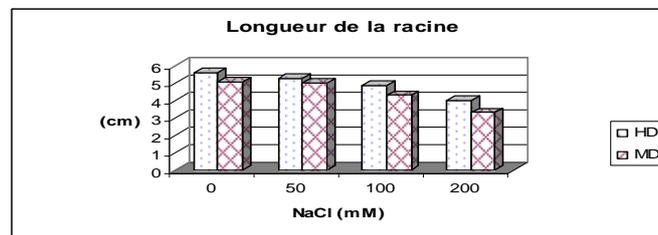


Figure 13. Longueur moyenne des racines des deux variétés de blé tendre, MD et HD sous différentes concentrations de NaCl.

Sous l'effet du stress salin, la longueur des l'épi cotyles diminue de la valeur (5.6 cm), moyenne du témoin non stressé à (4.9 cm), valeur moyenne mesurée sous stress de 200mM NaCl, en moyenne des deux variétés (Tableau 4, Figure 14). La longueur des épi cotyles diminue de (-0.0045 cm) par unité d'augmentation de la salinité. Le modèle linéaire a la forme suivante: $Epic (cm) = -0.0045 [NaCl] + 5.52$, $R^2 = 0.9226$.

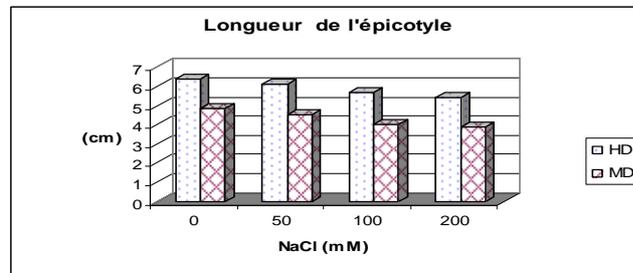


Figure 14. Longueur moyenne des épicotyles des variétés MD et HD sous différentes concentrations de NaCl.

1. 3. Surface foliaire

La surface foliaire est également affectée par le stress salin comme l'indique l'analyse de la variance (Tableau 3). En effet les effets génotypes, stress salin et l'interaction sont significatifs. Dans ce cas seule l'interaction mérite d'être étudiée puisque la réponse au stress salin des deux génotypes varie selon le degré de l'intensité du stress (Tableau 3).

Globalement, MD présente une surface foliaire plus réduite que celle de HD, avec des moyennes de 9.7 et 12.0 cm² respectivement pour les deux génotypes cités dans cet ordre (Figure 15). Ces moyennes sont de 12.5 et 13.5cm en absence du stress salin.

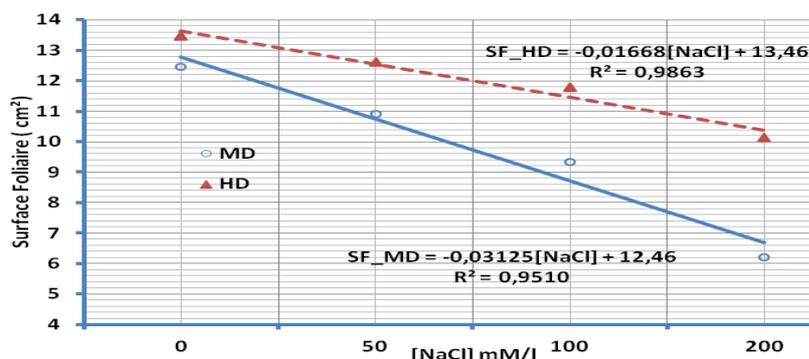


Figure 15. Surface foliaire (cm²) des deux variétés de blé tendre, MD et HD sous différentes concentrations de NaCl.

De plus MD présente une plus grande sensibilité vis-à-vis de la salinité. En effet cette variété réduit sa surface foliaire de (-0.0313 cm²) pour toute augmentation de la salinité d'une unité (1mM), alors que HD répond avec une vitesse de réduction relativement plus faible de (-0.0167 cm²) (Figure 15). Sous le seuil de 200mM NaCl, MD réduit sa surface foliaire de 50.2% ; alors qu'à ce seuil la surface foliaire de HD est réduite de 24.8% uniquement (Figure 16).

Une plus grande surface foliaire est un atout pour la variété en termes d'activité photosynthétique. Ces résultats concordent avec ceux de Garcia-Legaz et *al.*, (1993) qui mentionnent que la réduction de la photosynthèse est due essentiellement à la diminution de la surface foliaire et à la fermeture des stomates par suite de l'accumulation excessive de sodium dans les feuilles des génotypes stressés.

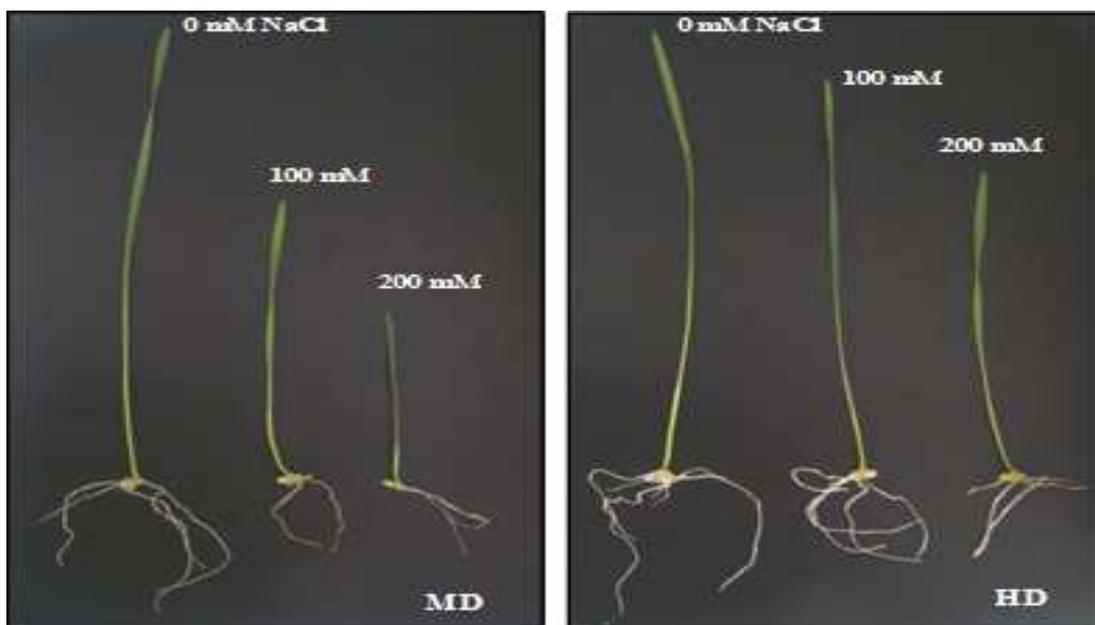


Figure 16. Effet du NaCl sur la croissance foliaire des génotypes MD et HD après 7 jours de traitement salin continu avec 100 et 200mM NaCl.

2. Effet du stress salin sur les caractères physiologiques

2. 1. Potentiel hydrique et teneur relative en eau

D'une valeur de (-1.5MPa) chez les témoins, le potentiel hydrique (Ψ_w) baisse à une valeur de (-3MPa) dans le limbe pour les deux génotypes. Il baisse à des valeurs de

(-2.7MPa) et (-3.2MPa) dans la gaine, respectivement chez MD et HD soumises à un stress de 100mM NaCl (Figure 17).

Après 7 jours sous stress salin de 100mM NaCl, la teneur relative en eau du limbe et de la gaine de HD se stabilise à une valeur de 84%, puis baisse à des valeurs de 48%, et 65% pour le limbe et la gaine, après 14 jours d'exposition à la salinité (Figure 18).

La variation du potentiel hydrique et la teneur relative en eau suggèrent que MD est relativement plus sensible à la salinité que HD. Les mesures de la gaine sont plus discriminantes que celle du limbe foliaire.

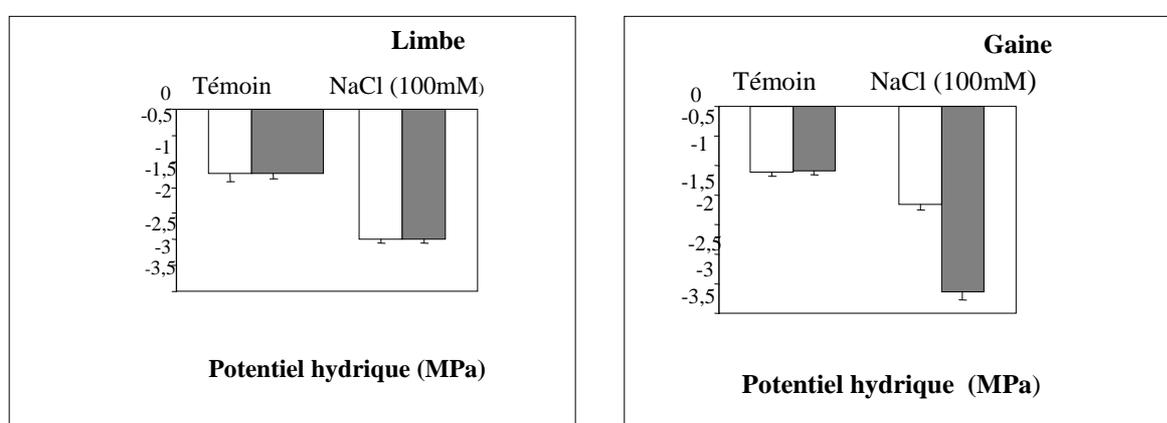


Figure 17. Potentiel hydrique du limbe et de la gaine de MD (Bars blanc) et HD (Bars en gris = HD) au terme de 7 jours de croissance sous stress salin de 100 mM NaCl.

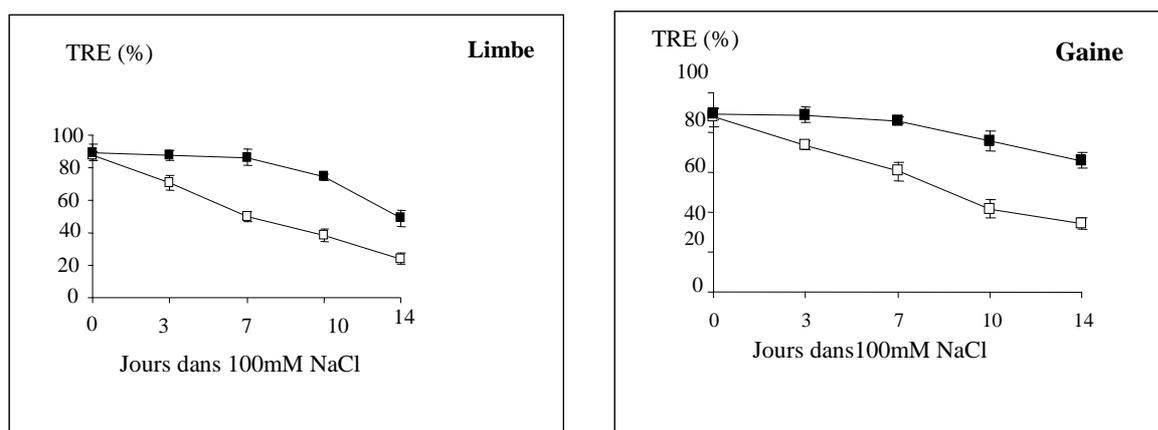


Figure 18. Variation de la teneur relative en eau du limbe et de la gaine de MD (symboles blancs) et HD (symboles noirs) après 14 jours de croissance sous stress salin de 100mM NaCl.

2. 2. Dosage des ions Na^+ et K^+

L'accumulation de l'ion Na^+ est plus importante dans la gaine de HD, par contre l'inverse est vrai pour ce qui est du limbe où MD accumule plus d'ion sodium comparativement à HD. On note peu de différence entre les deux variétés pour ce qui est de l'accumulation de cet ion dans les racines (Figure 19). Ces résultats indiquent une différence de répartition de l'ion sodium, au cours des 14 premiers jours d'expérience, au niveau de la feuille des deux variétés. HD préfère le stockage au niveau de la gaine alors que MD stocke au niveau du limbe.

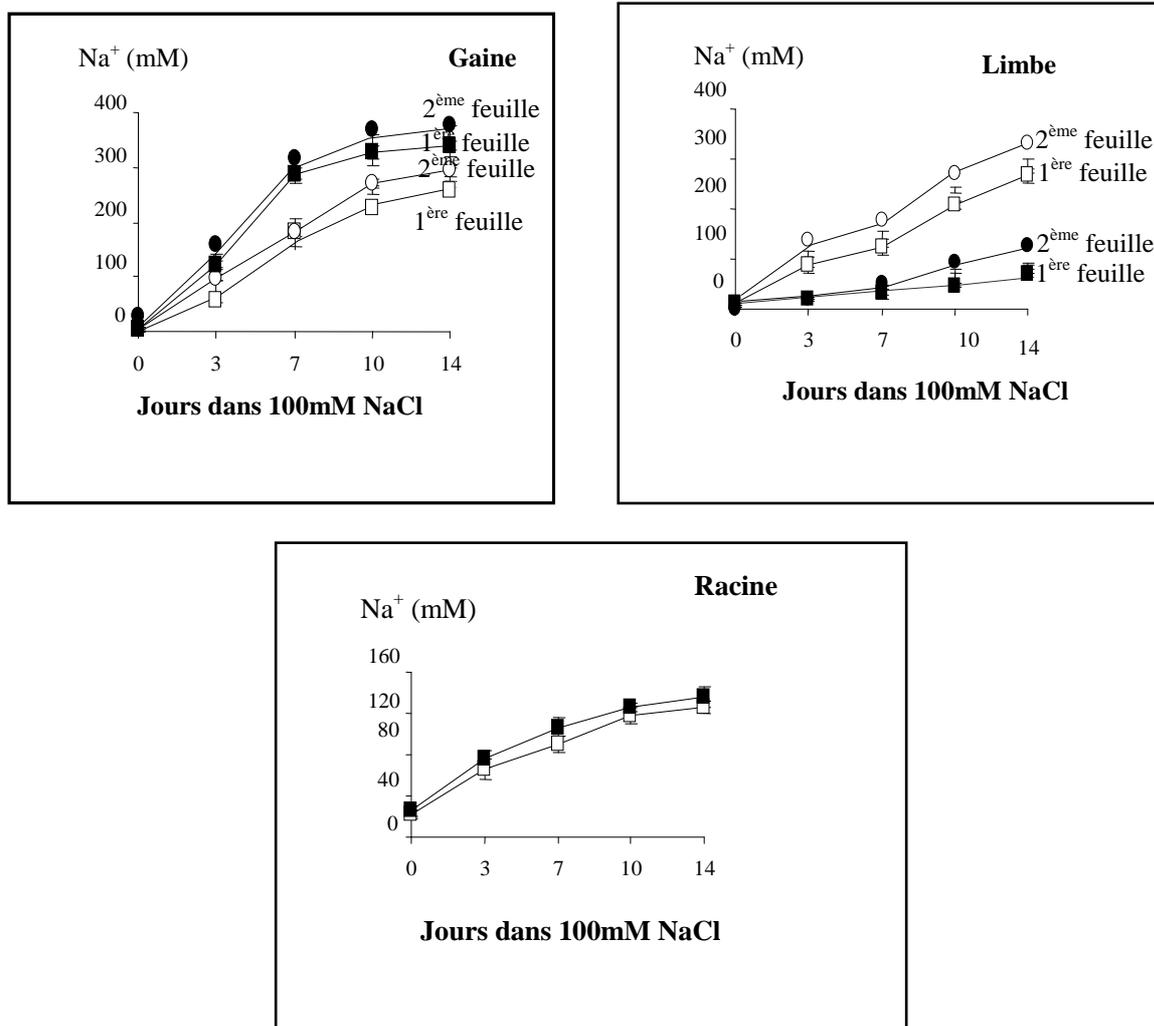


Figure 19. Variation de la teneur en ion Na^+ dans la gaine, le limbe et les racines de HD (symboles noirs) et MD (symboles blancs) au terme de 14 jours de croissance sous stress salin de 100mM NaCl.

Les deux génotypes se caractérisent par une capacité contrastée pour stocker Na^+ dans la gaine et le limbe foliaires. Les gaines des feuilles divergent pour la capacité à extraire l'ion sodium à partir du flux xylémique. En effet HD séquestre plus de 85% de Na^+ total des feuilles dans la gaine contre 65% pour MD (Figure 20). Ces résultats suggèrent que HD met en

jeu un mécanisme supplémentaire pour contrer la salinité, en séquestrant préférentiellement plus de sodium dans la gaine, que dans le limbe à l'inverse du variété MD.

Le suivi de la variation de l'accumulation de l'ion potassium, sous stress salin de 100mM NaCl, montre peu de différence entre les deux génotypes au niveau de la gaine et des différences plus marquées au niveau des racines et surtout du limbe (Figure 21).

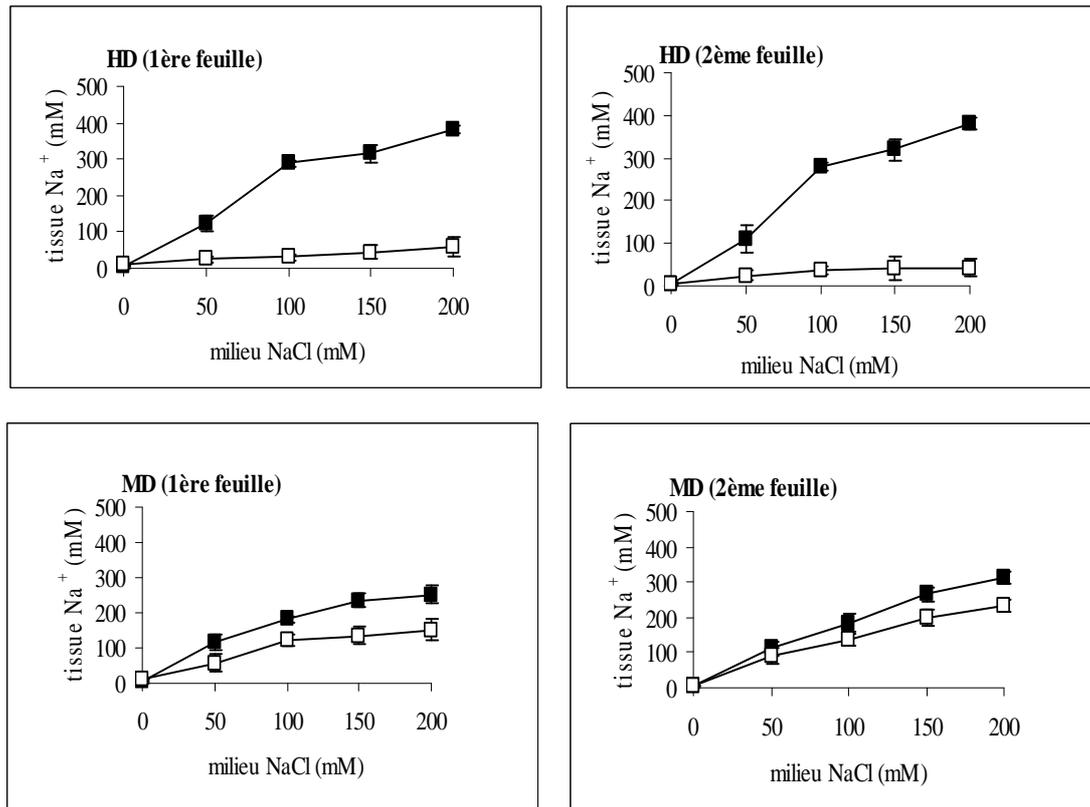


Figure 20. Teneur en Na⁺ du limbe (symboles blancs) et de la gaine (symboles noirs) de la 1^{ère} et 2^{ème} feuille de HD et MD au terme de 7 jours d'exposition à la salinité

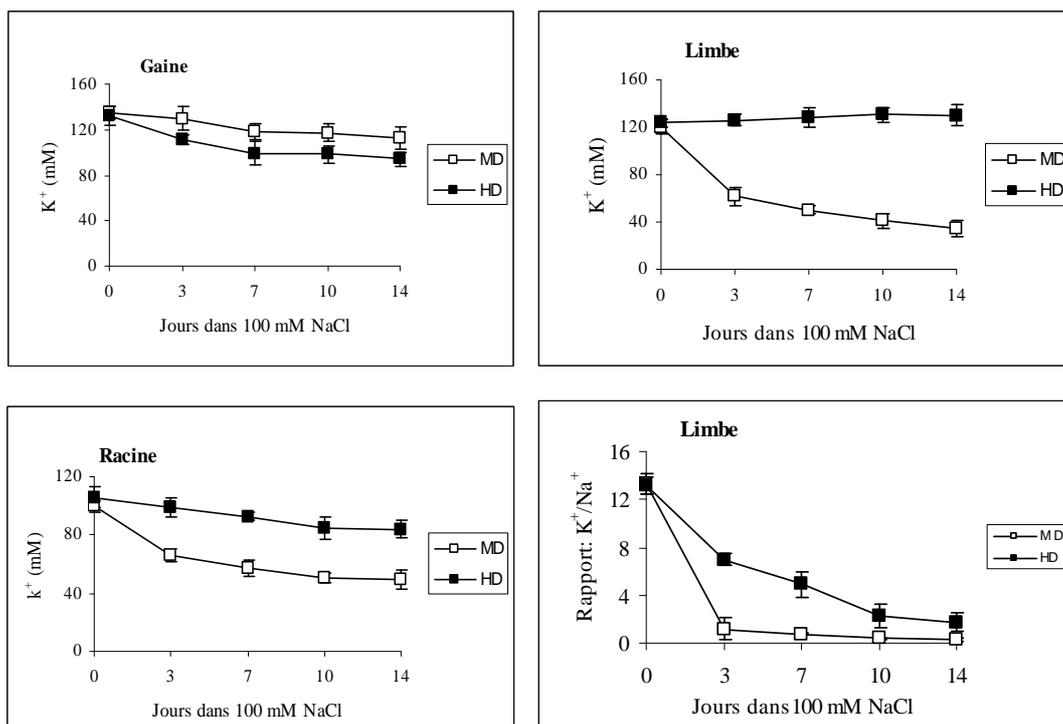


Figure 21. Variation de la teneur en K^+ de la gaine, du limbe et des racines de HD et MD soumises à un stress salin de 100mM NaCl durant 14 jours et ratio K^+/Na^+ du limbe foliaire.

HD présente une plus grande capacité à accumuler l'ion K^+ dans le limbe et au niveau des racines comparativement à MD. Ceci engendre un ratio K^+/Na^+ du limbe foliaire plus élevé chez HD comparativement à celui de MD (Figure 21). L'augmentation de la teneur en K^+ au niveau du limbe foliaire suite à l'effet du stress salin suggère un comportement de réajustement osmotique, qui intervient après l'invasion des ions Na^+ , ce qui assure la survie des plantules.

Ces résultats corroborent ceux de Hamrouni et *al.*, (2011) qui rapportent que la plante adsorbe et véhicule le maximum de potassium vers le limbes foliaire pour les besoins osmotiques. Nos résultats montrent que c'est surtout au niveau des feuilles que HD rétablit l'équilibre de son potentiel osmotique via l'ion potassium et atténue ainsi l'effet du stress osmotique engendré par NaCl. La capacité de HD à pomper une plus grande quantité de potassium de la solution nutritive, puis de la véhiculer vers le limbe, représente donc une stratégie d'adaptation au stress salin via la régulation osmotique de l'ion K^+ .

2. 3. Chlorophylle et fluorescence chlorophyllienne

L'effet variété de la chlorophylle, mesurée en unité *SPAD*, n'est pas significatif, par contre l'effet stress salin et l'interaction (variété x stress) salin sont significatifs (Tableau 5).

Les valeurs moyennes prises par la chlorophylle des deux variétés sont de 38.3 et 40 (unité *SPAD*) respectivement pour MD et HD.

Le stress salin affecte significativement la chlorophylle vu que les valeurs moyennes de l'effet stress des deux variétés, passent de 41.35 à 36.65 (unité *SPAD*), du témoin non stressé au traitement de 200mM NaCl (Tableau 6, Figure 22).

Tableau 5. Carrés moyens de l'analyse de la variance du % (Chl), (TSS) et (Flu) de MD et HD soumises à un stress salin.

Source de variation	ddl	Chl	Flu	Suc
Variétés (V)	1	5,67 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,55 [*]
Salinité (S)	3	26,02 ^{**}	0,07 ^{**}	0,79 ^{**}
V x S	3	10,76 ^{**}	0,02 ^{ns}	0,33 ^{**}
Résiduelle	16	4,05	0,01	0,01

ns, * et ** = effet non significatif, significatif au seuil de 5% et 1 % respectivement.
% (Chl), taux de la chlorophylle ; (TSS), teneur en sucres solubles et (Flu), fluorescence

L'étude de l'interaction (Variété x Salinité) montre que HD tolère mieux la salinité par rapport à MD pour intensité de 100mM NaCl comparativement au témoin, au-delà de ce seuil, elle présente le même degré de sensibilité que MD (Figure 22). Ces résultats corroborent ceux de Mekhliche et *al.*, (2003) qui rapportent que les différences de chlorophylle observées chez les génotypes de blé dur (*Triticum durum* Desf.) sont en fonction de la tolérance au stress.

Acevedo et Ceccarelli (1989) mentionnent eux aussi que la diminution de la chlorophylle chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.) est liée au niveau de tolérance des génotypes au stress hydrique.

Tableau 6. Moyennes des valeurs SPAD de (Chl), (Fv/Fm) et (TSS) de MD et HD sous stress salin.

NaCl (mM)	MD						HD					
	0	50	100	200	Moy	Ppds	0	50	100	200	Moy	Ppds
Chl	40,8	39,1	36,9	36,6	38.3	4.4	41,9	41,5	39,9	36,7	40,0	3.0
Fv/Fm	0,72	0,61	0,60	0,60	0,63	0.1	0,70	0,58	0,56	0,55	0,60	0.1
Suc	1,10	1,23	1,33	1,35	1,26	0.1	0,97	1,59	1,74	1,78	1,52	0.2

Chlorophylle (Chl), Fluorescence (Fv/Fm) et teneur en sucres solubles (TSS)

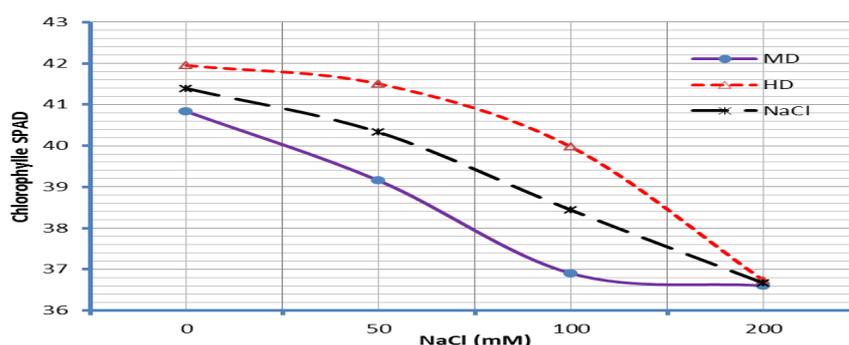


Figure 22. Variation de la teneur en chlorophylle sous l'effet du stress salin chez MD, HD et effet moyen de la salinité.

L'analyse de la variance de la fluorescence indique un effet moyen variété et une interaction salinité x variétés non significatifs, suivi d'un effet moyen salinité significatif (Tableau 5, Figure 23). Le rendement quantique prend les valeurs de 0.63 et 0.60 respectivement pour MD et HD. Les valeurs moyennes de la fluorescence de l'effet moyen du stress salin varient de 0.71 en absence de salinité à 0.57 à 200mM NaCl (Tableau 6, Figure 23). L'interaction non significative indique que la fluorescence est peu différente chez les deux génotypes, en absence comme en présence de sel (Figure 23).

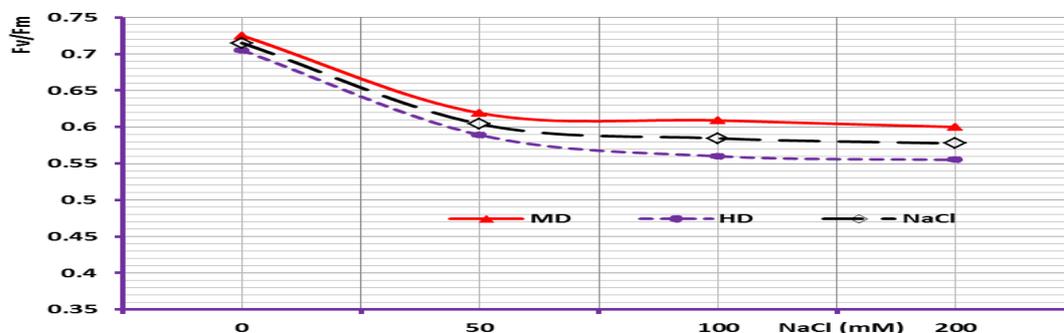


Figure 23. Valeurs de la fluorescence (Fv/Fm) de l'effet moyen salinité et de l'interaction (salinité x variété).

Lorsque la photosynthèse fonctionne avec un rendement maximum, les photons absorbés sont piégés rapidement par les centres de conversion photochimique, ce qui limite leur dissipation par fluorescence. Sous l'effet du sel qui affecte normalement le rendement de la photosynthèse, les photons absorbés par les chlorophylles s'accumulent en grande partie dans l'antenne chlorophyllienne où ils sont dissipés soit par production de chaleur, soit par fluorescence.

L'intensité de la fluorescence est par conséquent liée au fonctionnement de l'appareil photosynthétique. Ainsi la fluorescence chlorophyllienne est un paramètre efficace de détection de la réaction des plantes à la salinité, elle contribue à dissiper l'énergie lumineuse absorbée par les chlorophylles, ce qui réduit de l'efficacité du rendement quantique (Eyletters et Bourrié, 1996 ; Hamrouni *et al.*, 2011). Dans le cas de la présente étude la fluorescence ne semble pas être un caractère discriminant des génotypes étudiés, suite au fait que les deux variétés répondent de manière similaire.

2. 4. Teneur en sucres solubles

L'analyse de la variance révèle des effets significatifs pour les variétés et le stress salin ainsi que leur interaction (Tableau 5). La teneur en sucres solubles prend les valeurs de 1.26 et 1.52 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ de MF, respectivement chez MD et HD (Tableau 6). Les valeurs de l'effet moyen du stress salin passe de 1.03, en absence de stress salin à 1.56 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ de MF sous stress de 200mM NaCl (Tableau 6).

L'interaction (Stress Salin x Variété) indique que la teneur en sucres solubles augmente, sous l'effet de la contrainte saline, plus rapidement chez HD que chez MD (Figure 24). Kameli et losel (1995), Rekika *et al.*, (1998) ainsi que Bajji *et al.*, (2000) notent que les stress induisent une accumulation des sucres dans le limbe foliaire.

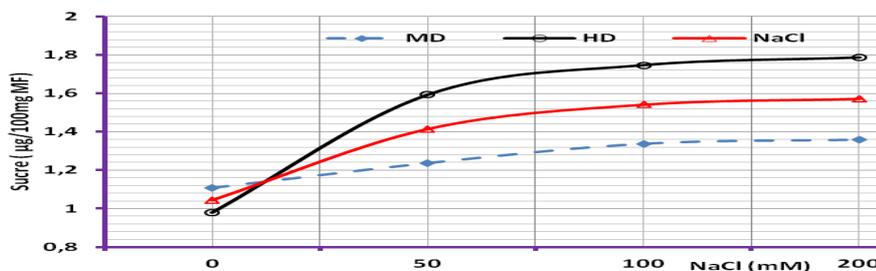


Figure 24. Variation de la teneur en sucres solubles des génotypes MD et HD en fonction de l'intensité du stress salin.

Discussion

La rareté des évènements pluvieux des régions semi-arides et arides, associé à la forte demande climatique accentuent le phénomène de salinisation des sols, les rendant, ainsi, peu à peu impropres aux cultures non tolérantes (Munns et *al.*, 2012). La salinité affecte la rhizosphère et constitue une contrainte aux productions végétales. La recherche des espèces et variétés relativement plus tolérantes à la salinité est une alternative très prometteuse dans de telles situations.

Les caractères morphologiques et physiologiques indicateurs de cette tolérance sont très divers (Khajeh-Hosseini et *al.*, 2003 ; Hamrouni et *al.*, 2011 ; Munns et *al.*, 2012). La réaction des plantes à la salinité produit généralement des modifications morphologiques et physiologiques. L'étude de la tolérance des variétés à la salinité, nécessite d'analyser la variation des caractéristiques discriminantes pour la tolérance.

La tolérance au sel, des génotypes MD et HD, a été évaluée dans la présente étude en utilisant un ensemble de paramètres morfo-physiologiques. Les résultats mettent en relief la sensibilité de MD par rapport à HD, et ceci quelque que soit l'intensité du stress considéré et le caractère mesuré (Tableau 7). La réduction des valeurs prises par le pourcentage de germination, la longueur des racines séminales, la surface foliaire, les taux de chlorophylle et des sucres est progressive, et fonction de l'intensité du stress imposé et du génotype considéré. Celle du rendement quantique ne montre pas de différence significative entre variétés quoique la réduction soit significative sous l'effet du stress salin.

Tableau 7. Pourcentage de réduction des valeurs prises par les variables mesurées sous les différentes intensités du stress salin par rapport au témoin non stressé des variétés MD et HD.

NaCl (mM)	50		100		200	
Génotype	MD	HD	MD	HD	MD	HD
%G	-13.7	-2.4	-30.0	-17.4	-52.0	-32.7
LR	-2.0	-5.4	-15.7	-12.5	-35.3	-28.6
LE	-6.3	-4.7	-16.7	-10.9	-18.8	-15.6
SF	-0.8	-2.3	-30.6	-9.8	-47.1	-24.2
Chl	-4.1	-1.1	-9.6	-4.7	-10.4	-12.4
Fv/Fm	-14.6	-16.5	-16.0	-20.6	-17.2	-21.3
Suc	11.6	62.9	20.7	78.6	22.6	82.7

%G = pourcentage de germination, LR = Longueur des racines, LE = Longueur des épi cotyles, SF= Surface foliaire, Chl = Chlorophylle, Fv/Fm = Rapport fluorescence variable et fluorescence maximale, Suc = Sucre.

Certains caractères discriminent nettement entre les comportements des deux variétés vis-à-vis de la salinité, sous stress sévère (Tableau 7), d'autres le sont sous stress modéré, tel est le cas du pourcentage de germination et du taux d'accumulation des sucres solubles (Tableau 7). Ainsi sous stress modéré de 100mM NaCl, le pourcentage de germination des graines de MD baisse de 30% alors que celui de HD ne baisse que de 17.4%. Le taux des sucres n'augmente que de 11.6% chez MD contre 62.9% chez HD, et ceci sous faible stress de 50mM NaCl (Tableau 7). Alors que les valeurs de la fluorescence ne montrent pas de différence entre MD et HD.

Au niveau de la plante, les ions Na⁺ entrant par les racines, sont véhiculés par la sève xylémique jusqu'au feuillage, où ils sont soit stockés comme c'est le cas des plantes inclusives, soit mobilisés par la sève phloémique jusqu'aux racines comme c'est le cas des plantes exclusives (Hakim *et al.* 2010 ; Munns *et al.*, 2012).

La salinité diminue le potentiel osmotique de la solution du sol, ce qui a pour effet de limiter l'absorption de l'eau par les racines. La turgescence cellulaire baisse suite au phénomène de plasmolyse. Les variétés tolérantes régulent la pression osmotique interne par la synthèse d'osmoprotecteurs, principalement des sucres solubles et des acides aminés comme la proline et la glycinebétaine (Hakim *et al.* 2010 ; Hamrouni *et al.*, 2011). Soumises à l'action du stress salin, les plantes augmentent leurs teneurs en sucres solubles qui sont fortement impliqués dans l'ajustement osmotique pour atténuer les effets négatifs de NaCl.

La teneur en sucres solubles est considérée comme un critère efficace pour détecter la tolérance aux stress abiotiques. L'accumulation des sucres est suggérée comme indice de résistance non seulement au stress salin mais également au stress hydrique du fait que la salinité est également une sécheresse de type physiologique (Munns *et al.*, 2006). L'augmentation de cette caractéristique chez les deux variétés, à des taux très différents, corroborent les résultats d'El Jaafari (1993) qui note une accumulation variable de la proline chez les variétés de blé tendre soumises au stress salin. Les sucres s'accumulent aussi bien chez les glycophytes que chez les halophytes, soumis au stress salin, pour restaurer l'équilibre osmotique entre le cytoplasme et la vacuole. La synthèse des sucres solubles est, dans ce cas, une caractéristique adaptative du génotype HD vis-à-vis de la salinité.

Dans la présente étude, bien que la variation des valeurs prises par la fluorescence soit attribuée aux perturbations photosynthétiques, on note que le rendement quantique est plus élevé sous stress modéré de 50mM, que sous stress sévère de 200mM NaCl (Figure 24, Tableau 6). Dans ce contexte et pour la même caractéristique, Denden et *al.*, (2005) n'observent aucun effet de la fluorescence dû à l'action du sel chez trois espèces de plantes ornementales où le rendement quantique reste supérieure à 80%. Des résultats comparables ont été obtenus sur les feuilles d'autres céréales cultivées sur NaCl, comme le triticale, le blé tendre et l'orge (Bounaqba, 1998 ; Vadel, 1999, Bouaouina et *al.*, 2000).

Il est clairement établi par une multitude de travaux que la salinité se traduit par une réduction de croissance des plantes. Cet effet est essentiellement lié à une réduction de la capacité photosynthétique due à l'effet osmotique de la salinité (Hakim et *al.*, 2010). D'après Munns et James (2003), une perte de turgescence serait responsable d'une diminution de la capacité photosynthétique et, par conséquent, de la croissance. Ainsi on peut conclure que l'effet inhibiteur de NaCl sur leur croissance passe par une perturbation de l'alimentation en eau et la nutrition minérale.

Chez MD, la partie racinaire est plus affectée par la salinité que la partie aérienne. Ainsi, la plante semble s'adapter au stress salin en réduisant en premier lieu son système racinaire préservant la partie aérienne devant maintenir l'activité photosynthétique. Cette différence de sensibilité entre les organes d'absorption et les organes photosynthétiques est caractéristique des glycophytes (Brugnoli et Bjorkman, 1992 ; Bernstein et *al.*, 1993).

Chez HD et sous stress salin, la production de la matière sèche diminue plus au niveau des tiges qu'au niveau des racines. Bouaouina et *al.*, (2000) ont montré que chez le blé dur, la croissance végétative de la variété ' Razzak ' est fortement affectée par les concentrations en NaCl égales ou supérieures à 50mM et que l'effet dépressif du sel concerne plus les organes aériens que les racines, particulièrement les feuilles jeunes en pleine croissance. La résistance du système racinaire au stress salin peut être due à une diminution de l'allocation du carbone pour la croissance foliaire au profit de la croissance racinaire.

Au niveau physiologique, l'arrêt de croissance peut être considéré comme un moyen de préserver les carbohydrates pour le métabolisme et le développement durable, et de constituer des réserves énergétiques nécessaires à la reprise de croissance après la levée du

stress (Bartels et Sunkar, 2005). Ces différences pourraient correspondre à des besoins énergétiques variables (Munns et *al.*, 2012). Walker et *al.*, (2002) ont montré que, chez la vigne, la tolérance à la salinité est influencée par la distribution des racines et implique la contribution de l'exclusion de chlorure.

La réponse immédiate du stress salin est aussi exprimée par une réduction de la surface foliaire et une diminution des matières fraîche et sèche au niveau des feuilles, mais aussi au niveau des tiges et racines. Selon Munns et *al.*, (2006), la diminution de la croissance végétative représente généralement la première réponse des glycophytes exposées au stress. Une forme d'adaptation à la salinité, où la diminution de la surface foliaire tend à minimiser les pertes d'eau par transpiration, ce qui a pour effet aussi d'engendrer une réduction de la capacité photosynthétique.

Selon Munns et *al.*, (2006) le sodium est toxique lorsqu'il est présent à de fortes concentrations au niveau du cytoplasme des cellules foliaires, où il inhibe les réactions enzymatiques, sauf s'il est compartimenté au niveau des vacuoles. Le génotype tolérant, aura tendance à afficher des concentrations élevées de sodium dans les feuilles, tout en compartimentant cet ion dans la vacuole pour protéger le cytoplasme de sa toxicité. Par contre le génotype sensible exclut le sodium dans les cellules des tissus de la tige et des racines où il y a peu de réactions enzymatiques vitales pour la plante.

Chez certaines espèces de plantes la tolérance au stress salin est assurée par la recirculation de l'ion sodium en excès des feuilles vers les racines. Selon Munns et *al.*, (2012), la circulation du sodium de la partie aérienne vers la partie racinaire est assurée par les transporteurs SOS1 et HKT1 chez *Arabidopsis thaliana* et le blé via le phloème. Ainsi, il s'avère que le degré de tolérance de HD est lié à son niveau de vigueur. Par ailleurs, le taux de germination, la surface foliaire, la longueur de l'épicotyle, celle des racines et les teneurs en chlorophylle et en sucres solubles, sont des paramètres très sensibles à la salinité et peuvent, par conséquent, servir comme marqueurs de tolérance ou de sensibilité à la salinité chez le blé tendre.

Conclusion

L'étude des paramètres morphologiques et physiologiques de deux variétés de blé tendre Mahon-Demias et Hidhab, tel que le pourcentage de germination, la longueur des racines et des épicotyles, la surface foliaire, le potentiel hydrique, la teneur relative en eau, le dosage des ions (Na^+ et K^+), le taux de la chlorophylle, la fluorescence chlorophyllienne et la teneur en sucres solubles, ont été évalués pour caractériser le niveau de tolérance vis-à-vis du stress salin.

Différentes concentrations salines allant de zéro à 200mM NaCl avec des durées d'exposition au stress allant de 3 à 14 jours ont été utilisées. Les résultats montrent que le stress salin induit une diminution de la croissance des racines et des parties aériennes chez les deux variétés étudiées. La réduction de la croissance en présence de sel a été interprétée comme étant le résultat d'une réduction de l'alimentation de la plante en eau et en éléments minéraux majeurs et plus particulièrement l'ion K^+ .

La variété MD montre une accumulation des ions Na^+ plus importante dans les parties aériennes, comparativement à la variété HD. Ceci est lié au degré de tolérance au sel, observé chez la variété HD où le xylème limite le transport du Na^+ dans les feuilles.

La tolérance à des concentrations salines élevées chez le blé tendre semble être liée à la capacité d'éviter l'accumulation à des niveaux toxiques du Na^+ dans le limbe de la feuille et à une meilleure capacité d'ajustement osmotique. Cette information est utile pour la sélection du matériel dans les programmes d'amélioration.

Effet du stress salin et thermique sur la prolifération des cals et la régénération des plantules à partir des embryons matures de deux variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), Mahon-Demias et Hidhab

Résumé

La capacité embryogénique et le pouvoir de régénération sous stress thermique et salin ont été étudiés, *in vitro*, chez Mahon-Demias et Hidhab utilisant des embryons matures comme explants. L'expérimentation a été réalisée au laboratoire de génétique, biochimie et biotechnologies végétales (LGBBV) de l'université Constantine1. L'induction des cals est obtenue à partir des embryons matures placés sur milieu MS. Les cals induits sont soumis aux stress salin et thermique. Les résultats montrent que MD répond mieux que HD à la sélection *in vitro*. MD présente un taux d'induction des cals plus élevé, une meilleure prolifération des cals induits, avec cependant moins d'embryons produits par cal induit. Le taux de régénération de plantules, à partir des cals proliférant était nul pour HD et très faible pour MD. L'indice de sensibilité (IS) confirme la tolérance de la variété MD comparativement à la variété HD vis-à-vis du stress salin et thermique en culture *in vitro* à un paramètre donné qui est la longueur des racines. Quoique le protocole de la présente étude, étudie peu de variantes de la composition du milieu, comparativement aux variantes des stress, les résultats obtenus suggèrent la possibilité d'utiliser la technique *in vitro* pour la sélection vis-à-vis des stress, pour peu qu'un protocole adéquat soit maîtrisé.

Mots clés : *Triticum aestivum* L., *In vitro*, Embryons matures, Stress salin, Régénération.

تأثير الإجهاد الملحي و الحراري على تكوين الكالوسات (المورقة و الجذرية)
و التشكل النباتي اعتمادا على أجنة ناضجة للصنفين Mahon-Demias & Hidhab
من القمح اللين (*Triticum aestivum* L.)

ملخص

إن إمكانية التشكل الجنيني و القدرة على إعطاء نباتات كاملة تحت ظروف الإجهاد الملحي و الحراري للصنفين MD و HD من القمح اللين (*Triticum aestivum* L.)، قد تم دراستها مخبريا في الزجاج في مخبر الوراثة الكيمياء الحيوية و البيوتكنولوجيا النباتية بجامعة قسنطينة. إن الحصول على كالوسات قد تم اعتمادا على وضع أجنة ناضجة للصنفين المذكورين في الوسط الغذائي MS . وضعت الكالوسات الناتجة تحت ظروف من الإجهاد الملحي و الحراري، و قد بينت نتائج الدراسة أن الصنف MD يستجيب أحسن من الصنف HD للانتخاب المخبري ، بحيث إن MD تظهر نسبة عالية من تشكل الكالوسات و بنسبة عالية من التفرع أيضا و لكن مع قليل من الأجنة الناتجة عن هذه الكالوسات و التي يمكن أن تعطي نباتات مع استمرار التجربة . إن نسبة التشكل المورفولوجي و إعطاء نباتات كاملة كان معدوما بالنسبة للصنف HD، و قليل جدا بالنسبة للصنف MD . إن مؤشر التحسس (Indice de sensibilité) الخاص بطول الجذور مثلا، يؤكد قدرة التحمل للصنف MD مقارنة مع الصنف HD تجاه الإجهاد الملحي و الحراري المطبق اثناء الزراعة في الزجاج . رغم أن البروتوكول التجريبي المطبق في هذه الدراسة لم نعتمد فيه على كثرة الأوساط الغذائية و تنوعها و ذلك من اجل التحكم أكثر و تحديد وسط غذائي مدروس بعناية من اجل الوصول إلى وسط مثالي يعتمد في برامج التحسين لهذه الأصناف لذلك كان الاهتمام يتعلق بتنوع الإجهاد المطبق باستعمال نفس الوسط الغذائي. إن النتائج المحصل عليها تشجع على استعمال تقنيات الزراعة المخبرية لغرض انتخاب نباتات قادرة على تحمل الإجهاد اللاحيوي.

الكلمات المفتاحية: القمح اللين، زراعة الأنسجة في الزجاج، أجنة ناضجة، الإجهاد الملحي، التشكل النباتي

**Saline and thermal stress effect on callus proliferation and plantlets
regeneration from mature embryos of two bread wheat
(*Triticum aestivum* L.) Varieties, Mahon-Démias and Hidhab**

Abstract

Embryogenesis capacity and higher regeneration under heat and salt stress were studied *in vitro* using mature embryos of two bread wheat cultivars: Mahon-Démias and. Experiment was performed at the genetic, biochemistry and plant biotechnology laboratory (LGBBV) of Constantine University¹. Callus induction is obtained from mature embryos placed on MS medium, then induced callus were subject to heat and salt stresses. Results showed that MD had better response than HD to *in vitro* selection. Higher rate of callus induction and proliferation were observed for MD, with fewer embryos produced. The plantlet regeneration rate from proliferating callus was nil and very low for HD and MD respectively. The sensitivity index (SI) confirmed the tolerance of MD compared to HD for salt and thermal stress on *in vitro* culture at roots length. Although the protocol of this study examine few medium composition variants, composed to stress variants. Results suggested the possibility to use *in vitro* technique to select for heat and salt stresses.

Key words: *Triticum aestivum* L., *In vitro*, mature embryos, Salt stress, Regeneration

Introduction

La culture des tissus joue un rôle important dans la production des plantes cultivées et ornementales et dans la manipulation des plantes pour en améliorer les performances agronomiques. La culture *in vitro* gagne de plus en plus de popularité car elle offre les possibilités d'étudier les processus physiologiques et génétiques des plantes, comme elle présente l'avantage d'aider à l'amélioration et l'augmentation de la variabilité génétique. Les plantes régénérées présentent le même génotype que les plants donneurs, quoique, dans certaines situations, on se trouve en présence de variations soma-clonales (Karp et al., 1987).

Les facteurs génétiques sont les principaux responsables de la réponse à la culture *in vitro* des tissus. Ainsi de grandes différences ont été notées en matière de formation de cals embryonnaires et de régénération des plantules, selon le génotype et la source de l'explant (Ganeshan et al., 2003). Des embryons immatures et matures sont les plus utilisés en culture *in vitro* pour induire la calaugenèse et régénérer des plantules de céréales (Chang et al., 2003). Suite à l'avantage de stockage plus simple et à la disponibilité tout le long de l'année, les embryons matures sont les plus utilisés comme source d'explants.

La composition du milieu, notamment la balance hormonale, est un autre aspect important qui affecte l'induction des cals et la régénération des explants, *in vitro* (Jiang et al. 1998). L'auxine, 2,4-dichlorophenoxy acide acétique, seule ou en combinaison avec les cytokinines est largement utilisée pour promouvoir l'induction caulinaire et la maintenance (Castillo et al., 1998).

La réponse des plantes aux stress est un phénomène complexe. Dans ce cadre la culture *in vitro* est utilisée pour améliorer l'efficacité de sélection vis-à-vis de ces stress. Les lignées tolérantes dérivées des programmes conventionnels de sélection ou bien issues des manipulations transgéniques peuvent être criblées *in vitro*. Ceci est plus efficace pour certains stress abiotiques dont les méthodes appropriées de screening manquent ou présentent une faible efficacité.

La salinité est le principal stress qui a été étudié d'avantage en culture *in vitro*. Des applications pour d'autres stress tels que le stress hydrique et le stress thermique sont aussi mentionnées (Lutts et al., 1996). En fait ces techniques sont actuellement considérées comme

d'importants compléments aux méthodes classiques de sélection (Zalc et *al.*, 2004). La sélection *in vitro* pour la tolérance des stress abiotiques est dépendante du développement d'un protocole efficace d'induction des cals et de régénération d'explants en plantes entières.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'aptitude d'induction des cals et la capacité de régénération de plantules à partir des explants d'embryons matures de deux variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), Mahon Demias et Hidhab, soumises à différent niveaux de salinité et de température.

Matériel et Méthodes

1. Conditions expérimentales

L'expérience a été conduite dans le laboratoire de génétique, biochimie et biotechnologies végétales (LGBBV) de l'université Constantine1. Les deux variétés MD et HD décrites dans le chapitre précédent sont utilisées comme matériel végétal, dans la présente étude. Après désinfection des graines des deux variétés par immersion dans l'alcool à 70% pendant une minute et dans une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) 12%, pendant cinq minutes, les graines sont lavées trois fois successives avec de l'eau distillée stérile pour une durée de cinq minutes chaque fois.

Les embryons matures des variétés MD et HD sont par la suite extraits des graines, sous hôte à flux laminaire, à l'aide de pince et scalpel sous binoculaire. Après excision, les embryons sont placés, scutelum vers le bas, dans des boites de pétri contenant le milieu de culture de Murashigue et Skoog (MS), additionné de 30 g. l⁻¹ saccharose, 8g. l⁻¹ agar et 10 mg. l⁻¹ 2,4.D, pour l'induction des cals (Tableaux 8 et 9).

Le pH des milieux est ajusté à 5.8 avec 0.2N KOH. L'autoclavage du milieu (MS) est assuré à l'aide d'un autoclave de paille à 121°C pendant 30 minutes, alors que les phytohormones sont stérilisées par la méthode de micro-filtrage sous pression à l'aide d'une pompe à vide et ajouté par la suite aux milieux autoclavés, après refroidissement de ceux-ci au dessous de 50°C.

Les boites de pétri, scellées avec des feuilles adhésives de parafilm, sont placées dans une chambre de culture sous une photopériode de 16h de lumière et 8h d'obscurité, à une

température de 22°C. 8 embryons sont ensemencés par boîte de pétri, pour un total de 96 embryons testés par génotype. Après quatre semaines d'incubation, les cals induits sont réensemencés, sous les mêmes conditions dans le même milieu de culture MS, additionné de différentes concentrations de NaCl (0, 5, 10 et 15 g.l⁻¹). La période d'incubation de cals réensemencés est de quatre semaines.

Le même protocole est répété pour tester l'effet de la température sur la capacité de régénération et de croissance des cals des deux génotypes. La seule différence est qu'après 4 semaines d'incubation, les cals induits sont réensemencés, sous les mêmes conditions dans le même milieu de culture MS, et sont placés sous différentes températures ambiantes de 25, 30, 35 et 40°C. La période d'incubation des cals réensemencés est de quatre semaines.

Tableau 8. Milieux de culture utilisés pour callogenèse (MS1), caulogenèse (MS2) et rhizogenèse (MS3).

Milieu de culture	MS1	MS2	MS3
Macroéléments	MS	MS	MS/2
Micro-éléments	MS	MS	MS
Vitamines, Fe-EDTA	MS	MS	MS
Saccharose (g. l ⁻¹)	30	30	30
Agar (g. l ⁻¹)	8	8	8
2,4 D. (mg. l ⁻¹)	10	/	/
BAP (mg. l ⁻¹)	/	2	/
ANA (mg. l ⁻¹)	/	0.5	0.8
KIN (mg. l ⁻¹)	/	/	0.36
pH	5.8	5.8	5.8

Tableau 9. Composition du milieu de base de Murashigue et Skoog (1962)

Macro-éléments	mg/l	Micro-éléments	mg/l	Eléments inorganiques	mg/l	Eléments organiques	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650	KI	0.83	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	Myo-Inositol	100
KNO ₃	1900	H ₃ BO ₃	6.2	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3	Acide Nicotinique	0.5
CaCl ₂ .2H ₂ O	150	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3			Pyridoxine-HCl	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	250	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6			Thiamine-HCl	0.1
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25			Glycine	2
		CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025				
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025				

Les cals produits sont découpées et transférés, à raison de 8 cals par flacon compote, dans un milieu MS (Tableau 8), additionné de 30 g.l⁻¹ saccharose, 8 g.l⁻¹ Agar, 2 mg.l⁻¹ BAP et 0.5 mg.l⁻¹ ANA pour la formation des tiges (caulogénèse), pendant trois semaines. Cette période est complétée par une autre période de 3 semaines, au cours de laquelle les explants sont ensemencés dans un milieu contenant la moitié des sels de base (MS/2, Tableau 8), solidifié avec 8 g.l⁻¹ d'agar, additionné de 30 g.l⁻¹ de saccharose, 0.8 mg.l⁻¹ d'ANA et de 0.36 mg.l⁻¹ de kinétine pour la formation des racines (rhizogénèse).

Les flacons compotes contenant les explants sont placés dans la chambre de culture sous lumière fluorescente et une température de 22°C. Le milieu de culture est changé tous les 15 jours. A la fin de la période d'essai, les cals clairement différenciés, montrant des talles et des racines, sont notés comme cals régénérant. Chaque tissu régénérant est considéré comme cal régénéré, quel que soit le nombre de tiges et de racines émis. Les cals régénérant sont transférés dans un milieu (MS) dépourvu d'hormones et placés dans une chambre éclairée pour favoriser la croissance des plantules.

2. Variables mesurées

Les variables ont été prises sur :

- ✓ Efficacité de calogénèse (induction des cals) = nombre de cals induits/nombre total d'embryonsensemencés x 100.
- ✓ Efficacité de caulogénèse (prolifération des cals) = nombre des cals proliférant/nombre total d'embryons incubés x 100.
- ✓ Surface des cals: $S C = 0.5 \times \text{Long_cal} \times \text{larg_cal} \times 3.14$, (Dale et Deambrogio, 1976).
- ✓ Nombre moyen des plantes régénérées (NMPR) = nombre des cals régénérées/nombre de cals proliférés.
- ✓ Indice de sensibilité (IS), calculé selon la méthode de (Slama, 1982).

3. Analyse des données

Une analyse de variance a été effectuée sur les données en utilisant le logiciel SAS Version 9.00 (2002). Les moyennes des variables mesurées ont été groupées par le Test de Duncan Multiple Range (DMRT), au seuil de probabilité de 5%.

Résultats et discussion

1. Induction des cals sous stress salin et thermique

Sous stress salin, les taux d'induction des cals étaient de 88.5% et 58.3%, respectivement pour les variétés MD et HD. Ces résultats indiquent des différences génotypiques significatives pour la capacité d'induction des cals. HD présente une moindre sensibilité de réponse à la culture *in vitro* comparativement à MD qui se montre plus réactive (Tableau 10).

Tableau 10. Valeurs moyennes des variables mesurées par génotype et traitement salin.

Variété	MD				HD			
Efficacité d'induction des cals								
Total d'embryons incubés	96				96			
Nombre d'embryons avec cals	85				56			
Taux d'induction des calls (%)	88.5				58.3			
Effet du stress salin								
NaCl (g/l)	0	5	10	15	0	5	10	15
Nombre d'embryons incubés	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0
Nombre de cals proliférant	24.0	24.0	21.0	15.0	22.0	20.0	8.0	6.0
Taux de prolifération (%)	100.0	100.0	91.6	62.5	91.6	83.3	33.3	25.0
Longueur des racines (mm)	25.0	20.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0

L'étude statistique portant sur les résultats des paramètres de régénération, à savoir, nombre de cals proliférant (NCP), et longueur des racines en millimètres (LR, mm), sous stress salin, ont permis de mettre en évidence les différences significatives entre les différentes concentrations salines appliqués aux deux génotypes MD et HD.

L'analyse de la variance, a révélé un effet stress salin significatif pour le facteur nombre de cals proliférant (NCP), ainsi le Test Duncan Multiple Range (DMRT) au seuil de 5%, a dégagé des groupes homogènes et mis en évidence les différences significatives existant entre différents traitements salines appliqués.

Cependant, chez la variété MD, l'analyse de variance a révélé un effet stress salin significatif pour (NCP) à partir de la concentration de 10 g. l⁻¹ NaCl, ainsi le DMRT au seuil de 5%, a dégagé trois groupes (a, b et c), alors que chez la variété HD, on distingue quatre groupes (a, b, c et d) pour le même paramètre (NCP). Cependant, l'effet stress salin est significatif au delà de la concentration de 5g.l⁻¹ NaCl. Cela suggère que la sensibilité à la salinité est similaire chez les deux cultivars.

L'analyse de variance a montré un effet stress salin significatif pour la longueur de la racine (LR) au-delà de 10g.l⁻¹ NaCl, chez la variété MD, ainsi le DMRT a dégagé trois groupes pour ce paramètre.

Chez la variété HD, un effet stress salin significatif a été mis en évidence pour la longueur de la racine (LR). Les moyennes sont pratiquement nulles ce qui montre la sensibilité accrue de la variété HD vis-à-vis du stress salin (Tableau 11).

Tableau 11. Effet du stress salin sur la régénération de la variété MD & HD

Variété	MD				HD			
	0	5	10	15	0	5	10	15
NaCl (g. l⁻¹)								
NCP	24±1 ^a	23,6± 0,5 ^a	21±1 ^b	15±1 ^c	22±1 ^a	19,6±0,5 ^b	8,3± 0,5 ^c	6±0 ^d
LR (mm)	25±1 ^a	20±1 ^b	0±0 ^c	0±0 ^c	20±1 ^a	0±0 ^b	0±0 ^b	0±0 ^b

Les valeurs d'une ligne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (N = 24 embryons). NCP = Nombre de cals proliférés et LR = longueur des racines (mm).

Sous stress thermique le taux d'induction des cals était de 46.8% et 36.4% respectivement pour les variétés MD et HD. Les deux variétés sont significativement affectées, quoique MD se montre relativement plus tolérant comparativement à HD qui présente une efficacité d'induction des cals plus faibles de 58.3 contre 88.5 pour MD (Tableau 12).

Tableau 12. Valeurs moyennes des variables mesurées par génotype et stress thermique.

Variété	MD				HD			
Efficacité d'induction des cals								
Total d'embryons incubés	96				96			
Nombre d'embryons avec cals	45				35			
Taux d'induction des cals (%)	46.8				36.4			
Effet du stress thermique (°C)								
Température (°C)	25	30	35	40	25	30	35	40
Nombre d'embryons incubés	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0
Nombre de cals proliférant	15.0	12.0	10.0	8.0	12.0	10.0	8.0	5.0
Taux de prolifération (%)	62.5	50.0	41.6	33.3	50.0	41.6	33.0	20.8
Longueur des racines (mm)	25.0	20.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0

Ces résultats corroborant ceux de Chen et *al.*, (2006) qui observent une variation de la fréquence de l'induction des calls de 11.6 à 89.6%. Rashid et *al.*, (2002) notent aussi des comportements différents selon le génotype pour l'induction des calls et la régénération des plantules chez le blé dur.

Gonzalez et *al.*, (2001) trouvent une variation de l'induction des calls variant de 54 à 100% ; alors que He et *al.*, (1988) rapportent les valeurs de 44 à 89% pour le blé dur. Des amplitudes plus élevées sont mentionnées par Bommineni et Jauhar (1996).

Plusieurs facteurs tels que la composition du milieu, la nature du génotype, et de l'explant utilisé affectent les processus relatifs à la capacité d'induction des cals, et à la régénération des plantules.

Ozgen et *al.*, (1996) font remarquer que les embryons matures comparativement aux embryons immatures, présentent une faible capacité d'induction des cals, qui est compensée par une régénération de plantules plus élevée. Dans la présente étude la variation notée pour la capacité d'induction des cals relève plus de l'effet génotype.

L'étude statistique des paramètres de régénération, mesurées sous stress thermique ont mis en évidence les différences significatives qui existent aussi entre les différents traitements thermiques appliquées aux deux génotypes étudiés MD et HD.

L'analyse de variance, a révélé un effet stress thermique non significatif pour la longueur de la racine chez la variété HD. Le DMRT a dégagé un seul groupe représentatif du témoin pour ce paramètre et l'analyse de la variance n'a montré aucun effet significatif de différents traitements thermiques sur la longueur de la racine.

Chez la variété MD le traitement thermique au-delà de 35°C a un effet négatif sur la régénération des plantules. Pour la longueur des racines, un effet stress thermique modéré (30°C) significatif, et un effet stress thermique moyen et sévère (35°C et 40°C) non significatif (Tableau 13).

Tableau 13. Effet du stress thermique sur la régénération de variété MD & HD

Variété	MD				HD			
	25	30	35	40	25	30	35	40
T (°C)								
NCP	14,6±0,5 ^a	11,6± 0,5 ^b	9,6±0,5 ^c	7,6±0,5 ^d	11,6± 0,5 ^a	9,6±0,5 ^b	7,6±0,5 ^c	4,6±0,5 ^d
(LR, mm)	24,6±0,5 ^a	19,3±0,5 ^b	0±0 ^c	0±0 ^c	19,6±0,5 ^a	0±0 ^b	0±0 ^b	0±0 ^b

Les valeurs de la même ligne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles au seuil de 5% (N = 24 embryons). NCP = Nombre de cals proliférés et LR = longueur des racines

2. Prolifération des cals sous stress salin et thermique

Le nombre de cals qui se subdivise, sous stress salin, chez MD est relativement plus élevé que celui noté chez HD (Tableau 10).

La prolifération des cals chez MD varie de 100%, en absence de stress salin (témoin), à 91.6% et 62.5% respectivement sous stress salin de 10g.l⁻¹ et 15g.l⁻¹ (Tableau 10).

Les cals produits par HD se subdivisent relativement moins que ceux produits par MD. En Effet chez HD l'efficacité de la prolifération varie 91.6%, en absence de stress salin (témoin), à 83.3%, 33.3% et 25.0%, respectivement sous stress d'intensité 5, 10 et 15g.l⁻¹ NaCl (Tableau 10).

Ces résultats indiquent que MD montre la tolérance à la salinité au seuil de 5g.l⁻¹ NaCl, par rapport à HD qui se montre sensible dès ce seuil.

A des niveaux de salinité plus élevés, MD réagit modérément alors que HD montre une sensibilité plus élevée qui se manifeste par une réduction significative de la capacité de prolifération des cals, atteignant le seuil de 25% à 15g.l⁻¹ NaCl (Tableau 10).

MD présente une réponse de type curvilinéaire à la salinité alors que HD montre une réponse de type linéaire (Figure. 25).

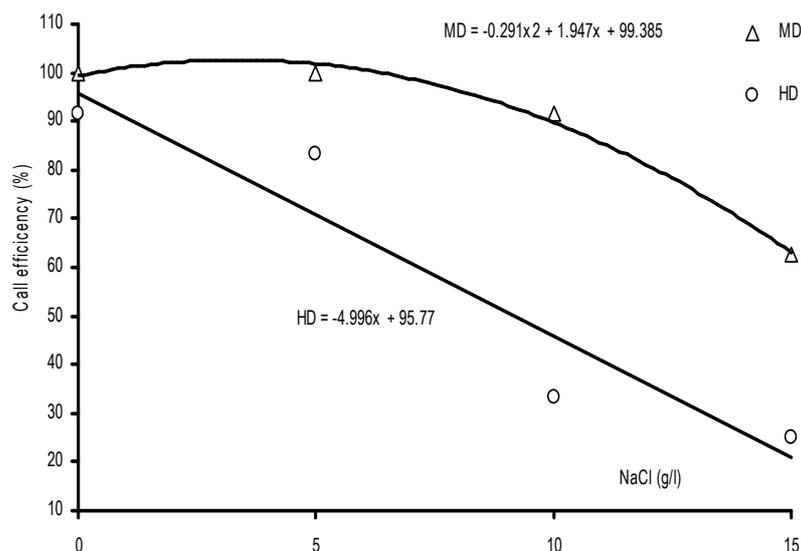


Figure 25. Variation de l'efficacité de la prolifération des cals sous différentes concentrations de NaCl chez les variétés de blé tendre MD et HD.

Chaudhury et Qu (2000) mentionnent que le 2.4-D est généralement la meilleure auxine qui favorise l'induction des cals chez les graminées.

Dans la présente étude, l'auxine 2,4D., a été utilisée à une concentration de 10g.l⁻¹ de milieu MS pour la prolifération des cals. La différence de la prolifération des cals en réponse à la salinité est d'origine génotypique où MD se montre plus tolérant à la salinité que la variété HD, récemment adoptée.

Au niveau modéré de salinité (5g.l⁻¹) l'efficacité de prolifération devient plus faible chez HD, prenant une valeur de 83.3%, comparativement à la valeur prise par MD qui est de 100%. Les différences entre les deux génotypes pour cette caractéristique sont significatives à des niveaux plus élevés de salinité (Tableau 10).

Dans ce contexte Bradley et al., (2001) rapportent que l'ajout du cytokinine, à faible concentration, en particulier la BAP, au milieu de culture pour la production de cals proliférant, favorise la formation des cals embryonnaires. Dans la présente étude le milieu MS était supplémenté avec 2g.l⁻¹ de BAP et 0.5g.l⁻¹ d'ANA pour l'initiation des tiges, de 0.8g.l⁻¹ d'ANA et de 0.36g.l⁻¹ de Kinétine pour la formation des racines (Tableau 8).

Sous stress thermique, le nombre des cals proliférés est moindre que sous stress salin, et pour les deux cultivars (Tableau 12). Sous ce type de stress, on note une diminution progressive de l'efficacité de la prolifération chez les deux cultivars. La diminution est très marquée chez la variété HD où les hautes températures sont plus marquantes sur l'efficacité embryonnaire (Tableau 12).

3. Longueurs des racines sous stress salin et thermique

Lorsque les plantules sont placées dans le milieu destiné à la régénération des racines (MS3 = MS/2, Tableau 1), dit de rhizogenèse, la croissance des racines devient plus rapide en absence de sel et à une température de 25°C.

MD réussit à produire des racines sous stress modéré de 5g.l⁻¹. Par contre HD ne réussit pas cet exploit (Tableau 3). La longueur racinaire en absence de stress est de 25 mm chez MD et 20 mm chez HD; elle est réduite à 20 mm sous stress modéré de 5g.l⁻¹ NaCl chez le génotype MD. Sous l'effet du stress thermique, on remarque une similarité de réponse pour les deux cultivars concernant cette caractéristique (Tableau 12).

Gonzalez et *al.*, (2001) mentionnent que NaCl inhibe la régénération des plantules. Chez la tomate, une corrélation positive entre la réponse à la salinité des cellules issues de la prolifération des cals et la réponse des plantes au stade adulte (Rus et *al.*, 1999). Rus et *al.*, (2000) notent une réduction du taux de croissance relative et du contenu relatif en eau des cals proliférant dans un milieu salé comparativement aux cals proliférant dans un milieu non salé.

Chen et *al.*, (1998) notent que chez *Eucalyptus microcorys* la croissance de la tige était inhibée sous salinité, alors que Abebe et *al.*, (2003) rapportent une réduction de 37% de la croissance des cals en présence du stress salin de 100mM NaCl d'intensité.

4. Surface des cals sous stress salin et thermique

La surface des cals est fortement affectée par le stress salin chez les deux génotypes étudiés (Figure 26). L'effet est plus important chez HD que chez MD. En pourcentage, la réduction de la surface moyenne des cals est de 41,60 % en passant du témoin à 15g.l⁻¹ NaCl, pour HD et de 62,16 % pour MD. Sous stress thermique, HD, dont la surface moyenne des

cals diminue de 42,27 % en passant du témoin non stressé de 25°C à traitement sous stress sévère de 40°C, est plus affectée, comparativement à MD avec 91,28 % en passant du témoin en 25°C à traitement sous stress sévère de 40°C (Figure 27). Des résultats similaires sont rapportés par Dale et Deambrogio (1976).

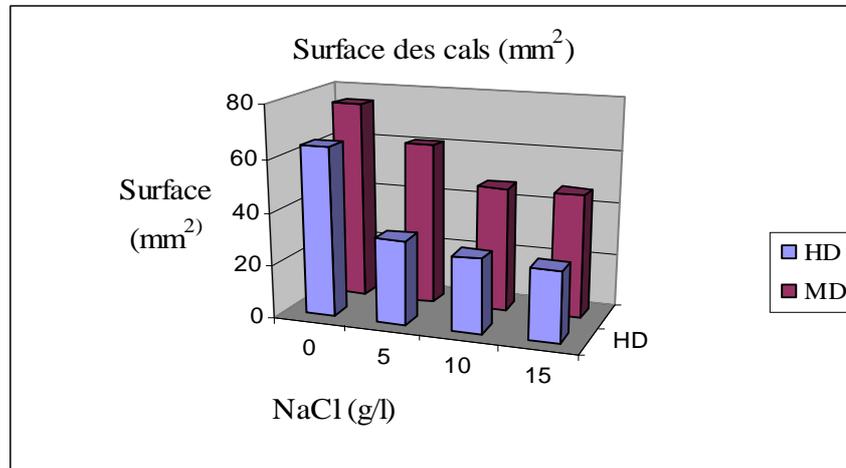


Figure 26: Effet du NaCl sur la surface des cals des deux variétés MD et HD.

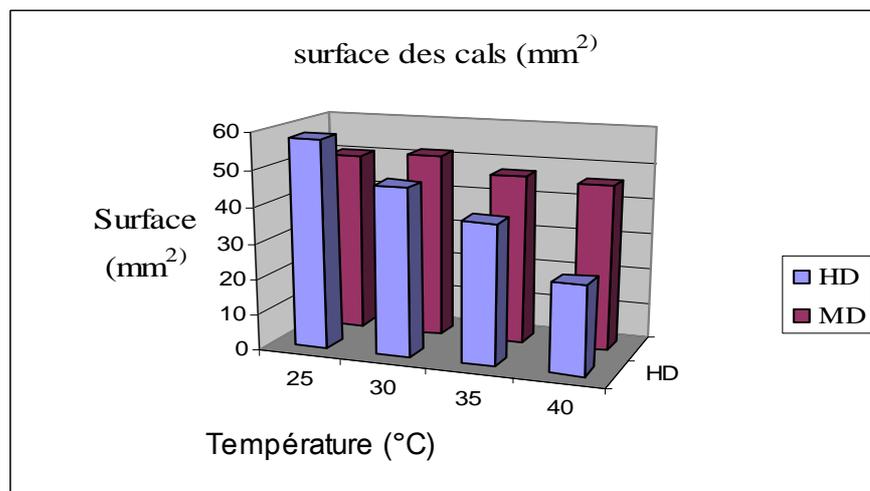


Figure 27. Effet de la température sur la surface des cals des variétés HD et MD.

5. Nombre de plantules régénérées sous stress salin et thermique

Le nombre moyen des plantules régénérées chez la variété MD est plus important que celui de la variété HD sous l'effet du stress salin et thermique. L'efficacité de régénération est le double chez MD comparativement à HD. Des résultats similaires sont notés pour le stress thermique (Tableau 14, Figures 28 et 29).

Tableau 14. Plantules régénérées par cal sous l'effet du stress salin et thermique

Type de stress	Stress salin	Stress thermique
Nombre d'embryons incubés	96	96
Nombre de cals proliférés MD	84	45
Nombre de cals proliférés HD	56	35
Nombre moyen de plantules régénérées HD	1	1
Nombre moyen de plantules régénérées MD	2	2
Pourcentage de plantules régénérées HD (%)	1.78	2.85
Pourcentage de plantules régénérées MD (%)	2.03	4.44

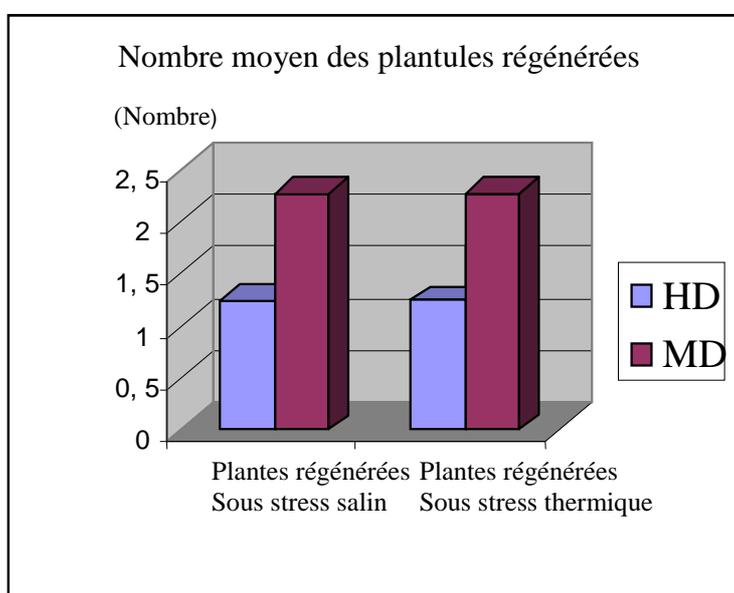


Figure 28. Nombre moyen des plantules régénérées sous l'effet du stress salin et thermique des variétés MD et HD.

Gonzalez et *al.*, (2001) ont signalé que la salinité inhibe la régénération des plantules de tomate. Rus et *al.*, (1999) ont trouvé une corrélation positive entre la réponse à la salinité des cellules résultant de la prolifération des cals et celles des plantes adultes. Rus et *al.*, (2000) ont noté une réduction du taux de croissance relative et la prolifération des cals dans un milieu salé relativement à la prolifération des cals dans les milieux moyennement salés. Chen et *al.*, (1998) ont noté que la croissance des pousses d'*Eucalyptus microcorys* a été inhibée par la salinité. Abebe et *al.*, (2003) ont pu avoir une réduction de 37% de la croissance des cals dans des conditions de stress salin à 100mM NaCl.

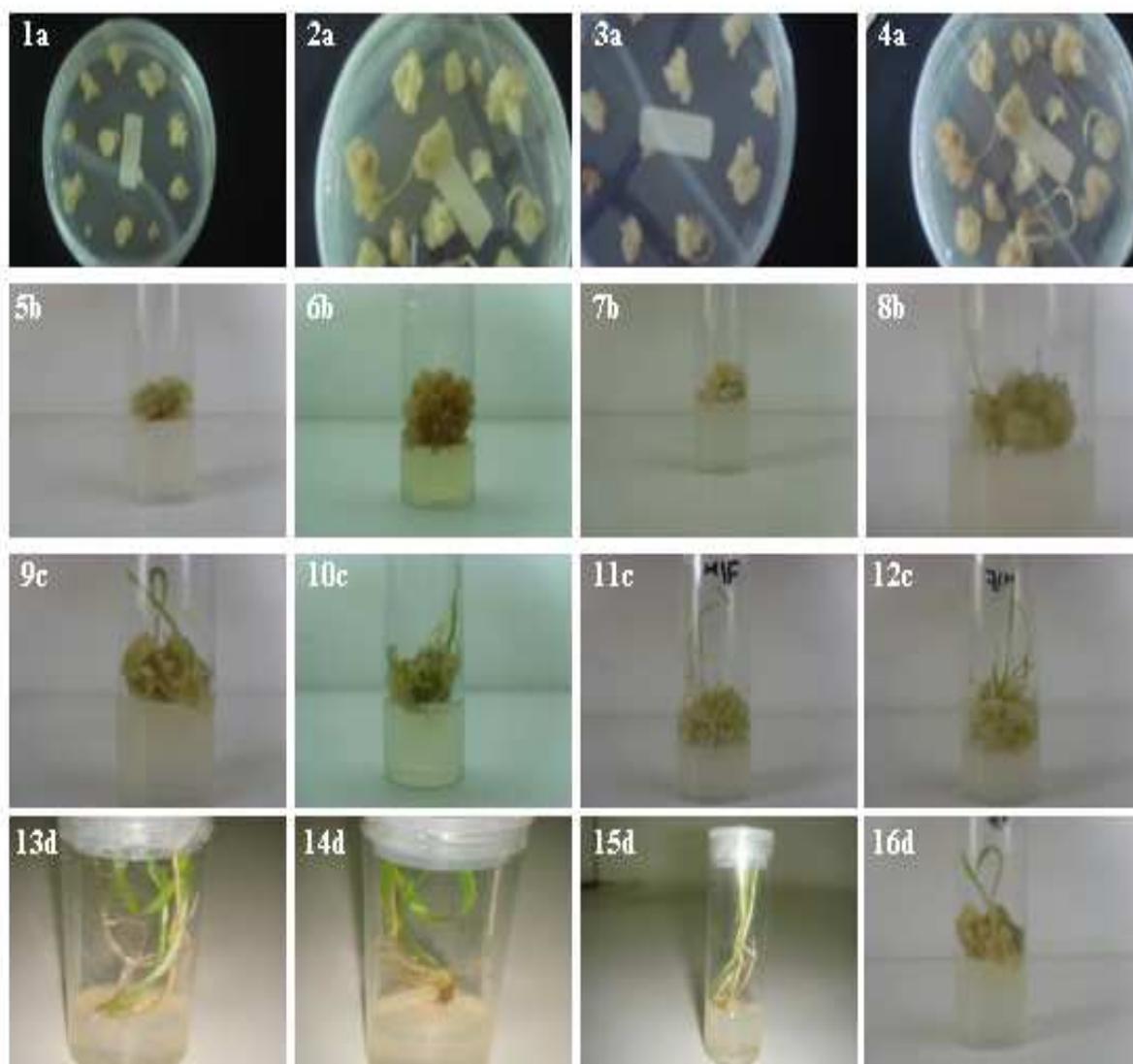


Figure 29. Culture in vitro des embryons matures : a) Induction des Cals, b) Prolifération, c) Formation des tiges et des feuilles, d) formation des racines du cultivar MD (Stress thermique : 1, 5, 9, and 13.), (stress salin : 2, 6, 10 and 14) ; HD (stress thermique : 3, 7, 11 and 15), (stress salin : 4, 8, 12 and 16).

6. Indice de sensibilité

Afin de confirmer l'aptitude à tolérer le sel et/ou la température chez les deux variétés étudiées, nous avons procédé au calcul de l'indice de sensibilité (IS) pour un paramètre donné qui est la longueur des racines (LR). L'indice de sensibilité correspond à l'écart entre les plantules traitées et témoins. Il est calculé selon la formule suivante : $IS = [(Ps - Pt)/Pt] \times 100$, avec (Ps = Plantes stressées), la valeur du paramètre mesuré chez les plantes soumises au stress salin ou thermique et (Pt = plantes témoins), la valeur du même paramètre chez les

plantes témoins, (Slama, 1982). Plus l'indice de sensibilité (IS) est négatif, plus la variété est sensible.

Les résultats obtenus au cours de notre étude, mettent en évidence une différence de la réponse au stress salin et thermique au sein des deux variétés MD et HD. De même, on constate que, chez les deux variétés, la longueur des racines est fortement affectée à 5 g.l⁻¹ NaCl, et à 30°C chez la variété HD, en chiffre, (-100) dans les deux cas par rapport au témoin, comparativement à MD qui accuse des valeurs plus élevées de l'indice de sensibilité dans les mêmes conditions de stress salin et thermique appliqué, en chiffre, (-20) et (-21,54) respectivement, Tableau 15. L'apport de NaCl dans le milieu de culture réduit la longueur des racines des plantules quelque soit la concentration utilisée. A 5, 10 et 15 g.l⁻¹ NaCl, la croissance est complètement inhibée chez la variété HD. Néanmoins, à 5 g.l⁻¹ NaCl, L'élongation des racines est fortement réduite chez la variété MD, alors que dans 10g.l⁻¹ et 15g.l⁻¹, la croissance est inhibée totalement.

L'examen des valeurs de l'indice de sensibilité (IS) montre que la sensibilité au sel dépend étroitement de l'effet de stress et des génotypes (Tableau 15). Le paramètre IS discrimine mieux les génotypes étudiés pour les faibles concentrations salines (5g.l⁻¹) et les températures moins élevées (30°C). Au-delà de cette dose et ce degré, la croissance est fortement, voire complètement inhibée et la comparaison des variétés sur la base de l'IS n'est plus significative. De ce fait, il apparaît que la variété HD est plus sensible comparativement à la variété MD.

Tableau 15. Variation de l'indice de sensibilité au sel et à la température estimé sur la base de la longueur des racines

	Valeur d'IS à				Température (T°)			
	0 g.l ⁻¹	NaCl (g.l ⁻¹)			25°C	30°C	35°C	40°C
		5 g.l ⁻¹	10 g.l ⁻¹	15 g.l ⁻¹				
Génotype								
MD	0	-20	-100	-100	0	-21,54	-100	-100
HD	0	-100	-100	-100	0	-100	-100	-100

Conclusion

Les résultats de la présente étude indiquent que MD présente un taux élevé d'induction des cals comparativement à HD. Une réponse différentielle est également notée pour la capacité des cals à proliférer et à régénérer des plantes sous différentes conditions de stress salin. L'efficacité embryogène de MD est plus faible sous stress salin comparativement à HD. Le taux de régénération des plantes est nul sous stress salin pour HD et faible pour MD sous stress salin modéré. L'indice de sensibilité confirme la tolérance de la variété MD comparativement à la variété HD vis-à-vis le stress salin et thermique. Quoique les résultats obtenus soient basés sur le comportement de deux génotypes, ils indiquent la faisabilité de la sélection *in vitro* vis-à-vis des stress abiotiques tels que le stress salin et/ou thermique.

Effet du stress salin sur l'expression des transporteurs d'ions chez deux variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), Mahon-Demias et Hidhab

Résumé

Cette étude a été conduite au laboratoire de protection et amélioration des plantes (LPAP) du centre de biotechnologie de Sfax (CBS), Tunisie. L'objectif de l'étude est d'analyser le niveau d'expression de cinq gènes candidats en réponse à la salinité. Les résultats indiquent que les deux transporteurs cationiques HKT1;5 et HKT2;1 s'expriment dans les racines, mais pas dans les gaines et limbes, avec une meilleure expression du gène HKT1;5 dans les racines de HD. Ceci suggère un rôle plus important du gène HKT1;5 chez la variété tolérante HD. L'expression de l'antiporteur vacuolaire Na^+/H^+ (TNHX-1), dans les racines, les gaines et limbes est plus élevée chez HD que chez MD. Les racines et gaines des deux génotypes accumulent plus de transcrits de la pyrophosphatase vacuolaire TVP1 que le limbe foliaire. La similitude du type d'expression des gènes TNHX1 et TVP1, notée chez MD et HD, suggère que la compartimentation vacuolaire agit avec une même efficacité chez les deux génotypes. L'anti-porteur Na^+/H^+ localisé au niveau de la membrane plasmique (TaSOS-1) s'accumule plus dans les racines et gaines de MD comparativement à HD, suggérant qu'en plus d'une meilleure efficacité de rétention de l'ion Na^+ dans les gaines, la variété HD évite l'accumulation de l'ion Na^+ dans le limbe foliaire en activant son efflux via une expression élevée du gène TaSOS1 dans ce compartiment. Les résultats de la présente étude indiquent que la tolérance à la salinité chez le blé tendre semble liée à la capacité d'éviter l'accumulation à des niveaux toxiques de l'ion Na^+ , associée à une capacité élevée d'osmorégulation et/ou au maintien d'un niveau acceptable de K^+ , spécialement dans le limbe foliaire. Cette information est utile pour la sélection du matériel végétal plus résilient vis-à-vis de la salinité.

Mots clés: *Triticum aestivum* L, stress salin, transporteurs d'ions, expression génique.

تأثير الإجهاد الملحي على ترجمة نواقل الايونات للصنفين Mahon-Demias و Hidhab من

القمح اللين (*Triticum aestivum* L.)

ملخص

تمت هذه الدراسة في مخبر حماية و تحسين النباتات في مركز البيوتكنولوجيا بصفا قس (CBS)، بالجمهورية التونسية. إن الهدف من هذه الدراسة هو تحليل مستوى ترجمة خمسة جينات مرشحة للاستجابة للإجهاد الملحي. بينت النتائج إن ناقلي الايونات الموجبة HKT1;5 و HKT2;1 تترجم في جذور النباتات و ليس في عنق أو نصل الورقة مع ترجمة عالية و مثالية للجين HKT1;5 في جذور الصنف HD، و هذا ما يفيد أن هناك دورا فعالا لهذا الجين عند الصنف HD الذي يتحمل الملوحة أكثر. إن ترجمة ناقل الضد الفجوي Na^+/H^+ (TNHX-1) في جذور و عنق و نصل الأوراق اعلي عند الصنف HD منه عند الصنف MD. أن الجذور و أعناق الأوراق للصنفين تخزن نسخا من البيروفوسفاتز الفجوي TVP1 مقارنة بالنصل الورقي. إن تشابه ترجمة الجينات TNHX1 و TVP1 الملاحظ عند الصنفين يفيد بان التأثير الفجوي في إحكام هذه الجينات يتم بنفس الفعالية. ان ناقل الضد الفجوي Na^+/H^+ الموجود على مستوى الغشاء البلازمي (TaSOS-1) تتركز في جذور و عنق أوراق الصنف MD مقارنة بالصنف HD يبين فعالية أكبر في إحكام ايونات الصوديوم في أعناق الأوراق. إن الصنف HD يتفادى تخزين ايون الصوديوم Na^+ في نصل الأوراق و يسرع من إخراجه عن طريق الترجمة العالية لجين SOS1 على هذا المستوى. إن نتائج هذه الدراسة تبين أن تحمل الإجهاد الملحي عند القمح اللين مرتبط بالقدرة على عدم تخزين مستويات سامة من ايون الصوديوم Na^+ تزامنا مع الاستطاعة على التنظيم الاسموزي و الحفاظ على مستوى مقبول من تركيز ايون البوتاسيوم K^+ خاصة في نصل الورقة. إن هذه المعلومة تعتبر هامة جدا في الانتخاب النباتي و في برامج تحسين النباتات المنتجة للحبوب خصوصا.

الكلمات المفتاحية: القمح اللين، الإجهاد الملحي، نواقل الأيونات، الترجمة الجينية.

Saline stress effects on candidate ion transporter genes expression in tow bread wheat (*Triticum aestivum* L.), Mahon-Demias and Hidhab

Abstract

This study was conducted at the protection and plant improvement laboratory (PPIL), centre of biotechnology of Sfax (CBS), Tunisia. The objective is to analyze the expression level of five candidate genes for salinity response tolerance. Results indicated that both cationic transporters HKT1; 5 and HKT2; 1, were expressed in roots, but not in sheaths and blades with improved gene expression HKT1; 5 in roots of HD cultivar. This suggests a more active role of HKT1; 5 gene in HD as a tolerant variety. Expression of vacuolar anti-porter Na^+/H^+ , TNHX-1 in roots, sheaths and blades was higher in HD than in MD. Roots and sheaths of both genotypes accumulate more transcripts of vacuolar pyrophosphatase TVP1 than the leaf blade. The similarity type of gene expression, TNHX1 and TVP1, observed in MD and HD, suggesting that vacuolar compartmentalization added with equal efficiency in both genotypes. Na^+/H^+ antiporter localized in the plasma membrane (TaSOS1), more accumulated in MD roots and sheaths compared to HD, suggesting that in addition to better retention efficiency of Na^+ in sheaths, HD prevents the accumulation of Na^+ in the blade by activating its efflux via a high expression of the gene SOS1 in this compartment. Results of this study indicate that salinity tolerance in wheat appears to be related to the ability to prevent the accumulation of Na^+ toxic levels, associated with a high osmoregulation capacity and / or maintaining an acceptable K^+ level, especially in blade. This information is useful for screening bread wheat segregating material for resilience to salt stress.

Keywords: *Triticum aestivum* L, saline stress, ion transporters, genetically expression

Introduction

Les céréales répondent à la salinité soit en excluant les ions du sodium soit en le faisant ré-circuler à l'intérieur de la plante pour le compartimer (Munns et James, 2003). En effet, il semble que plusieurs mécanismes sont mis en jeu dans le contexte de la tolérance à la salinité, ce qui en fait un caractère complexe (Colmer et *al.*, 2005).

Malgré les progrès fait en matière de compréhension des mécanismes moléculaires intervenant dans la réponse des plantes à la salinité, peu de génotypes tolérants le stress salin ont été identifiés (Colmer et *al.*, 2005). Les glycophytes tel que le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) confrontent le stress salin grâce à l'exclusion de l'ion Na^+ des tiges vers les racines (Munns et *al.*, 2003 ; Colmer et *al.*, 2005), et en tolérant des niveaux élevés de l'ion Na^+ dans les tissus (Yeo et Flowers, 1983; Colmer et *al.*, 2005; Munns et *al.*, 2006; Tamam et *al.*, 2008).

Sous conditions de stress salin, le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) se montre généralement plus tolérant que le blé dur (*Triticum durum* Desf.). Ceci s'explique par le fait que le blé tendre se montre plus efficace en termes d'exclusion des ions Na^+ (Colmer et *al.*, 2005). Par contre, selon Maas (1986), l'orge (*Hordeum vulgare* L.) se montre plus tolérante que le blé tendre et le blé dur, malgré qu'elle maintienne une concentration de l'ion Na^+ dans le feuillage similaire à celles du blé. Ceci suggère une plus grande tolérance des tissus de l'orge vis-à-vis de l'ion Na^+ , comparativement à la tolérance qui caractérise les tissus du blé.

Des analyses génétiques du riz (Gregorio et Senadhira, 1993) et du blé (Singh et Singh, 2000) ont montré que la tolérance à la salinité est sous contrôle polygénique avec des effets allant de l'additivité complète à la prépondérance de la dominance et l'interaction épistatique. Des études récentes, conduites pour mieux comprendre et améliorer la tolérance à la salinité se sont intéressées au mécanisme d'exclusion de l'ion Na^+ comme principale critère de sélection (Shavrukov et *al.*, 2010).

Les différences génotypiques d'exclusion de l'ion Na^+ , estimées par la concentration de l'ion Na^+ du limbe foliaire ou de la tige, existent chez le blé, mais la relation avec la tolérance au stress salin n'est toujours mise en évidence (Genc et *al.*, 2010).

Selon Dvorak et *al.*, (1994) ainsi que Tammam et *al.*, (2008), les cultivars de blé tendre expriment un faible taux de transport de l'ion de sodium vers la tige et maintiennent un rapport K^+/Na^+ élevé dans les feuilles. Ce rapport K^+/Na^+ discriminatoire, contribue significativement à la tolérance au stress salin.

Un locus contrôlant ce caractère, le locus *kna1*, a été cartographié sur le chromosome 4DL (Dubcovsky et *al.*, 1996) du blé tendre, alors que le blé dur ne possède pas ce locus. Un locus homologue du locus *kna1* n'a pas encore été identifié dans les génomes A et B des blés tétraploïdes. Munns et *al.*, (2000) rapportent l'existence du phénomène d'exclusion de l'ion Na^+ et d'un rapport K^+/Na^+ élevé dans le limbe foliaire du blé dur similaires à ceux existants chez le blé tendre.

Des analyses génétiques indiquent la présence de deux loci majeurs, le *Nax1* et le *Nax2*, qui contrôlent l'exclusion du Na^+ du limbe foliaire (Munns et *al.*, 2003). Un marqueur moléculaire lié au locus *Nax1* a été récemment identifié et a facilité le transfert rapide de ce locus à des variétés commerciales de blé dur (Lindsay et *al.*, 2004). Des études physiologiques montrent que chez un génotype tolérant, le contrôle de la concentration de l'ion Na^+ dans le limbe foliaire résulte de l'interaction entre le chargement net du xylème et la séquestration au niveau de la gaine (Davenport et *al.*, 2005).

En utilisant des lignées iso-géniques, il a été démontré que le rôle majeur du locus *Nax1* est de conférer la tolérance à la salinité en retirant plus de Na^+ du flux xylémique des racines et de la gaine, réduisant ainsi la concentration du Na^+ au niveau du limbe foliaire (James et *al.*, 2006). Les systèmes de transport HKT (High Affinity K^+ Transporters) sont actifs au niveau de la membrane plasmique et il a été démontré qu'ils fonctionnent comme Na^+/K^+ symports et comme un Na^+ sélectif uni-port (Horie et Schroeder, 2004; Garciadeblas et *al.*, 2003).

Des analyses phylogénétiques des séquences HKT montrent la présence de deux sous familles codées 1 et 2 (Platten et *al.*, 2006). Il a été suggéré que la sous famille 1 (HKT1; x) intègre les transporteurs HKT seulement perméables au Na^+ ; alors que la sous famille 2 (HKT2;y), représente les transporteurs qui sont perméables aux ions Na^+ et K^+ . Selon Laurie et *al.*, (2002), les HKT semblent jouer un rôle important dans le contrôle du transport de l'ion Na^+ chez le blé tendre et probablement aussi chez le blé dur.

La compartimentation des ions Na^+ dans les vacuoles est un mécanisme efficace pour éviter leurs effets toxiques au niveau du cytosol. Le transport de l'ion Na^+ vers les vacuoles est assuré par des cations/anti-porteurs H^+ dont l'activité est facilitée par un gradient électrochimique de protons généré par des enzymes vacuolaires H^+ -translocation, la H^+ -ATPase et la H^+ -PPase. En effet ces phosphatases génèrent le gradient des protons nécessaire à l'activité des Na^+/H^+ anti-porteurs (Chinnusamy et al., 2005). Les transporteurs vacuolaires NHX (échange Na^+/H^+) jouent des rôles significatifs dans la régulation endosomique du pH (Yamaguchi et al., 2001), l'homéostasie du K^+ et l'expansion cellulaire (Apse et al., 2003), le trafic vésiculaire et le ciblage des protéines (Bowers et al., 2000; Sottosanto et al., 2004).

Une corrélation a été trouvée entre l'expression des gènes codants les anti-porteurs NHX et la tolérance à la salinité chez le coton (Wu et al., 2004). Des résultats similaires ont été observés chez le blé (Saqip et al., 2005). Ils suggèrent qu'une expression élevée des antiporteurs Na^+/H^+ endogènes vacuolaires dans les racines et les tiges des géotypes de blé résistant à la salinité, facilite l'exclusion du Na^+ du cytosol et améliore la tolérance à la salinité (Saqip et al., 2005).

Des études antérieures indiquent que la surexpression des gènes NHX améliore la tolérance à la salinité chez plusieurs espèces de plantes, suggérant l'implication de ces gènes dans la séquestration vacuolaire de Na^+ (Apse et al., 1999 ; Zhang et Blumwald, 2001; Tester et Davenport, 2003; Yamaguchi et Blumwald, 2005; Brini et al., 2007). Les résultats de ces études montrent que les protéines NHX agissent comme des anti-porteurs Na^+/H^+ et possèdent une activité efficace d'échange K^+/H^+ (Venema et al., 2002).

La caractérisation fonctionnelle des Na^+/H^+ anti-porteurs (TNHX1), et de la pompe vacuolaire H^+ -PPase (TVP1), a été rapportée récemment chez le blé par Brini et al., (2005). Les plantes transgéniques de l'arabette (*Arabidopsis thaliana*) sur-exprimant les anti-porteurs vacuolaires du blé Na^+/H^+ , TNHX1 et H^+ -PPase, TVP sont plus résistantes à des concentrations élevées de NaCl et au manque d'eau que les géotypes sauvages (Brini et al., 2007). L'efflux du sodium des cellules racinaires évite l'accumulation de cet ion à des niveaux toxique dans le cytosol et son transport dans les tiges. Des analyses génétiques moléculaire du gène SOS (Salt Overly Sensitive) chez des mutants de l'arabette ont conduit à l'identification d'un anti-porteur Na^+/H^+ de la membrane plasmique, SOS_1 , qui joue un rôle

crucial dans l'exclusion de l'ion Na^+ des cellules épidermiques des racines sous l'effet de la salinité (Shi et Zhu, 2002).

Mieux comprendre les bases moléculaires des mécanismes de la tolérance et des signaux du stress salin chez le blé est aujourd'hui nécessaire pour pouvoir créer et cribler des génotypes plus tolérants au stress salin. L'objectif de ce travail est une analyse moléculaire de l'expression des transporteurs de sodium pour la tolérance au stress salin chez deux génotypes contrastés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), Mahon-Demias (MD) et Hidhab (HD).

Matériel et Méthodes

1. Conditions expérimentales

Une expérimentation portant sur l'étude du stress salin, similaire à celle décrite dans le chapitre précédent, a été conduite, avec le même matériel végétal au niveau du laboratoire de protection et d'amélioration des plantes (LPAP) du centre de biotechnologie de Sfax (CBS), Tunisie. Les graines des deux variétés ont été stérilisées dans 0.5 % NaOCl durant 15 minutes puis lavées abondamment avec de l'eau distillée stérile et placées dans des boîtes de pétri sur une feuille de papier filtre pour la germination. Les boîtes de pétri ont été incubées à 25°C dans une chambre de culture sous une photopériode 16h de lumière et 8h d'obscurité et 60 ± 10% d'humidité relative.

Des plantules âgées de 4 jours sont transférées dans des tubes Eppendorf et flottant dans des conteneurs portant une solution Hoagland à moitié diluée (Epstein, 1972). Lorsque les plantules atteignent le stade de 3 feuilles, des concentrations de NaCl (0, 50, 100 et 200 mM) sont appliquées progressivement aux différents conteneurs représentant les différents traitements et variétés (Benderradji et *al.*, 2011).

2. Extraction des ARN totaux des plantes par la méthode du Trizol

Cent milligramme de matériel végétal est broyé dans de l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine qui est transvasée dans un tube Eppendorf en ajoutant 1 ml de Trizol. L'ensemble est bien mélangé et incubé pendant 5 minutes à température ambiante afin de dissocier le complexe nucléoprotéiques. Ensuite, on ajoute 200 µl de chloroforme et on agite vigoureusement pendant 15 secondes. Le mélange est incubé pendant 2 minutes à température ambiante puis centrifugé à 12000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. A la phase aqueuse récupérée, on ajoute 0,5 ml d'isopropanol et on incube pendant 10 minutes à

température ambiante. Après centrifugation à 12000 rpm pendant 10 minutes à 4°C, le culot est lavé avec de l'éthanol 70%. Enfin, le culot est repris dans 50 µl H₂O traitée au DEPC.

3. Synthèse des cDNAs par transcriptase reverse (RT-PCR)

Une reverse transcriptase est réalisée à partir d'une population d'ARN dans laquelle se trouve le messenger que l'on veut visualiser. Le cDNA correspondant à ce messenger est ensuite amplifié par la réaction de PCR. L'ARN est tout d'abord traité par la DNase pendant 1h à 37°C :

Le mélange contient : - 10µg d'ARN

- 1µl DNase-RNase free (10 unités/µl)

- q.s.p 20 µl H₂O

L'enzyme est inactivé à 65°C pendant 15 minutes, ensuite les ARNs sont précipités et le culot est repris dans 10 µl H₂O DEPC.

La synthèse du cDNA se fait comme suit :

9 µl d'ARN sont dénaturé à 80°C pendant 5 minutes puis placé immédiatement dans la glace.

A cet ARN dénaturé, on ajoute :

- Tampon 5X	4 µl
- dNTPs (10mM)	2 µl
- OligodT	2 µl
- RNase inhibitor	1 µl
- Enzyme MMLV (5U/µl); (Invitrogen)	2 µl

On incube à 37°C pendant 1h, ensuite à 65°C pendant 15 minutes pour inactiver l'enzyme. Le produit de la réaction de reverse transcription est dilué pour l'utiliser comme matrice pour des amplifications par PCR.

4. Amplification des cDNAs par PCR

La technique d'amplification par PCR consiste à effectuer des cycles multiples de répllication de l'ADN ou du cDNA *in vitro* et cela en utilisant des oligonucléotides de synthèse qui s'hybrident avec des séquences complémentaires bordant la séquence à amplifier (Tableau 15). Chaque cycle comprend une étape de dénaturation de la matrice, une étape

d'hybridation des amorces et une étape de polymérisation. Les conditions d'amplification adoptées sont les suivantes:

ADN (50 ng/μl)	1 μl
Tampon PCR 10X	2,5 μl
MgCl ₂ (25mM)	1,5 μl
dNTPs (10mM)	1 μl
Amorce 1 (50 ng/μl)	1 μl
Amorce 2 (50 ng/μl)	1 μl
Taq DNA polymérase	1 μl
H ₂ O	Q.s.p 25 μl

Le premier cycle de la réaction commence par une dénaturation de l'ADN pendant 30 secondes à 94°C, suivie d'une hybridation (ADN-amorce) pendant 30 secondes à T_m°C et d'une polymérisation pendant 2 minutes à 72°C. La température d'hybridation T_m entre les oligonucléotides et les matrices est donnée par la formule suivante :

$T_m = 4(C+G) + 2(A+T)$; Cette formule ne peut être utilisée que pour des amorces composées de 18 à 28 nucléotides. Une fois les 30 cycles sont achevés, le produit de l'amplification est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %.

Tableau 16. Oligonucléotides synthétiques utilisés pour l'amplification du cDNA cible

Désignation	Séquence
HKT8-F3	5'-CTGTCGCTCTTCTGCGCCAT-3'
HKT8-R3	5'-TATACTATCCTCCATGCCT-3'
HKT2-F3	5'-GATCCACTCAACTTCTCCAC-3'
HKT2-R3	5'-TCATACTTTCCAGGATTTAC-3'
B3-F	5'-TCGGAAAATTCCTCTACCTA-3'
B4-R	5'-AGAACAACAATGATTGTGCT-3'
TVP-F	5'-GTCAGCAGAGCTGGTGTGAAG-3'
TVP-R	5'-TCAGCTTGATGAGGATGTTGA-3'
KM1-F	5'-GCATCTTATTGGAAGGATTT-3'
KM2-R	5'-CCTCTCAGGTGAGACTGCTA-3'
Actin- F	5'-GTGCCCATTTACGAAGGATA-3'
Actin- R	5'-GAAGACTCCATGCCGATCAT-3'
Oligo-(dT) ₁₈	5'- ACGCGTATCGATGTTCGAC (dT) ₁₈ -3'

5. Electrophorèse

Le produit d'amplification PCR est analysé sur un gel d'agarose en présence de BET (bromure d'ethidium 1µg/ml). Le tampon de dépôt utilisé est concentré 6X (0,25% bleu de bromophénol ; 40% saccharose). Le tampon de migration est le TAE (1X). Les ADNs sont par la suite visualisés sous UV.

Résultats et discussion

- Analyse de l'expression de gènes candidats HKT1;5, HKT2;2, TNH1, TVP1 et TaSOS1 chez MD et HD

Il a été prouvé antérieurement que de nombreux gènes jouent d'importants rôles dans le maintien de l'homéostasie des ions K^+ ou Na^+ chez les plantes supérieures. Dans la présente étude, le niveau d'expression de cinq gènes candidats, impliqués dans l'absorption, le transport et la séquestration des ions Na^+ , est analysé.

Une analyse par RT-PCR de deux gènes codants pour deux sous familles de HKT, à savoir, HKT1;5 antérieurement nommé HKT8 et HKT2;2 antérieurement nommé HKT2 chez les cultivars MD et HD, soumis à 100mM NaCl, montre un niveau élevé d'expression des deux gènes dans les racines, mais pas dans les gaines ou dans les limbes foliaires. Alors que le gène HKT2;2 montre une expression identique dans les racines des deux génotypes, les transcrits du gène HKT1;5 s'accumulent à des niveaux plus élevés dans les racines de HD. En ce qui concerne l'antiporteur vacuolaire Na^+/H^+ (TNHX-1), les niveaux des transcrits dans les racines, les gaines et les limbes foliaires sont plus élevés chez HD que chez MD. Plus de transcrits semblent s'accumuler dans les racines et les gaines que dans les limbes des deux génotypes.

Le niveau d'expression de la pyrophosphatase vacuolaire H^+ -PPase (TVP1) est comparable à celui observé pour les transcrits du gène TNH1. Les racines et les gaines des deux génotypes accumulent plus de transcrits de TVP1 que les limbes foliaires. Pour le gène TaSOS-1, un antiporteur Na^+/H^+ localisé au niveau de la membrane plasmique, plus de transcrits s'accumulent dans les racines et les gaines de MD comparativement à HD (Figure 30).

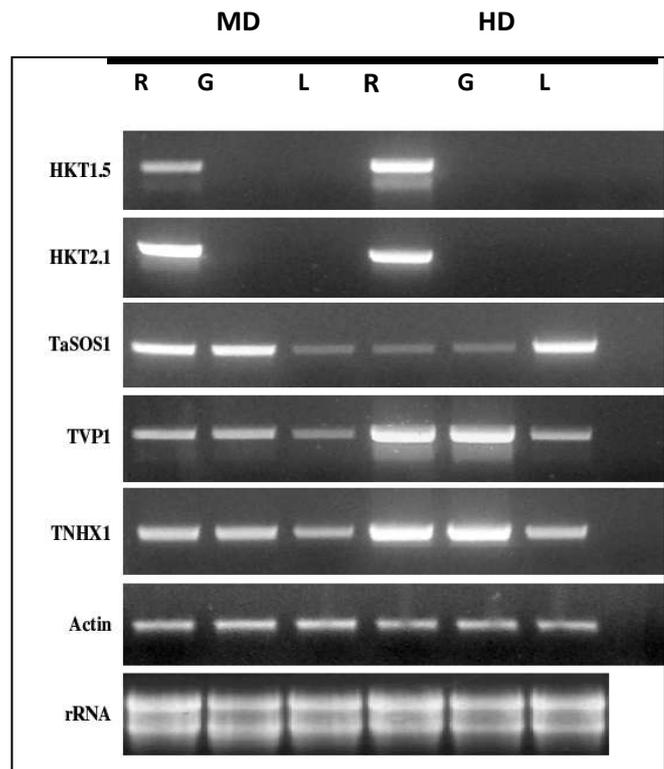


Figure 30. Profil d'expression des gènes *HKT1.5* ; *HKT2.1* ; *TaSOS1* ; *TVP1* et *TNHX1* dans les racines (R), la gaine (G) et le limbe (L) de MD et HD.

La tolérance à la salinité reflète la capacité de la plante à exclure l'ion Na^+ ainsi que les mécanismes associés à la tolérance des tissus à accumuler l'ion Na^+ . Ces composantes de la tolérance à la salinité fonctionnent indépendamment de sorte que la tolérance à la salinité reste dépendante de leurs effets relatifs respectifs. Le rapport K^+/Na^+ est contrôlé par un QTL lié au locus *Kna1* situé sur le chromosome 4DL du blé tendre (Gorham et al., 1987; Dubcovasky et al., 1996). Plusieurs études apportent la preuve qu'au cours de l'absorption racinaire, la discrimination K^+ sur Na^+ devient un caractère important qui contribue à la tolérance à la salinité. De ce fait ce rapport est largement utilisé comme paramètre discriminant de la tolérance à la salinité des génotypes de céréales et chez d'autres espèces de plantes (Gorham et al., 1990; Santa-Maria et Epstein, 2001; Munns et James, 2003).

La réduction de l'efflux du K^+ , induit par la salinité, permet la contribution de cet ion à l'osmorégulation, annulant le besoin d'un investissement élevé dans la production de solutés organiques et autorisant le maintien à un niveau critique du rapport K^+/Na^+ du cytosol (Cuin et al., 2008). La tolérance à la salinité est dépendante des transporteurs HKT qui assurent le transport spécifique des ions Na^+ et jouent un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie du

Na⁺ (Rodriguez-Navarro et Rubio, 2006; Munns et Tester, 2008). Plusieurs gènes appartenant à la famille des HKT ont été étudiés chez le blé tendre. TaHKT1 a été le premier gène HKT à être cloné à partir des plantes supérieures, montrant une expression dans les cellules corticales (Schachtman et Schroeder, 1994).

La sous régulation du gène TaHKT2;1 chez le blé, augmente le poids frais des tiges de 50 à 100% sous salinité d'intensité de 200 mM de NaCl et en absence de K⁺ (Laurie et *al.*, 2002). Suite à la sous régulation du gène TaHKT2;1, les plantes transgéniques de blé se caractérisent par une réduction de la dépolarisation des cellules corticales des racines et un faible influx de l'ion Na⁺, indiquant que le gène TaHKT2;1 intervient dans le contrôle de l'influx de l'ion Na⁺ (Laurie et *al.*, 2002).

Chez le blé dur, le gène homologue du gène TmHKT7-A2, existant chez (*Triticum monococcum*), qui est le meilleur représentant du locus Nax1, peut contrôler le déchargement de l'ion Na⁺ du xylème des racines et de la gaine de la lignée 149, tolérante à la salinité, mais pas du cultivar sensible Tamaroi (James et *al.*, 2006).

Sous salinité, l'expression des deux gènes HKT, utilisés dans la présente étude, sont détectés uniquement au niveau des racines des deux cultivars testés. Alors que le gène HKT2;2 présente le même degré d'expression chez les deux cultivars, une différence d'accumulation des transcrits a été notée pour HKT1;5 qui montre une surexpression dans les racines de HD. Ces résultats suggèrent que les deux gènes HKT interviennent dans le transport des ions Na⁺/K⁺, à travers la membrane plasmique des cellules corticales des racines, avec cependant un rôle plus actif du gène HKT1;5 chez la variété tolérante HD.

Le niveau d'expression du gène anti-porteur, TNHX1, sous conditions de stress salin, a été aussi étudié. Les transcrits de ce gène s'accumulent à un niveau élevé dans les racines et les gaines des deux cultivars MD et HD, comparativement à l'accumulation dans le limbe. Cette expression élevée des transcrits, dans les racines et les gaines, fait suite à une accumulation accrue de l'ion Na⁺ dans les vacuoles.

Le niveau d'expression du gène TVP1, dans les différents tissus des deux génotypes évalués, est similaire à celui du gène TNHX1, suggérant que l'anti-porteur Na⁺/H⁺ agit, en concert, les H⁺-PPase et ATPase vacuolaires pour séquestrer les cations dans la vacuole et les compartiments pré-vacuolaires. La similitude du type d'expression des gènes TNHX1 et

TVP1, notée chez MD et HD, suggère que la compartimentation vacuolaire agit avec une même efficacité chez les deux génotypes.

L'induction de l'expression du gène V-PPase, sous salinité élevée, dans les racines a été aussi observée pour les gènes AVP1, HVP1, HVP10 et TsVP (Fukuda et *al.*, 2004; Gao et *al.*, 2006). La compartimentation vacuolaire des ions Na⁺, en excès, fournit un moyen peu coûteux, en termes d'énergie, pour réaliser l'osmorégulation sous salinité. Ce type d'osmorégulation est similaire à celui réalisé par la rétention de l'ion K⁺ dans le cytosol. En effet la surexpression, dans les plantes d'arabette transgéniques, de l'anti-porteur du tonoplaste Na⁺ (K⁺)/H⁺, AtNHX1, dont la capacité est d'accroître l'influx du Na⁺ vers la vacuole, améliore la tolérance du Na⁺ sans en accroître le contenu dans les plantes transgéniques (Xue et *al.*, 2004).

L'accumulation des transcrits de l'anti-porteur Na⁺/H⁺ de la membrane plasmique, TaSOS1, était plus faible dans les racines et les gaines de HD que de MD ; alors que dans le limbe, l'expression du gène TaSOS1 était plus élevée chez HD que chez MD. Ce type d'expression suggère qu'en plus d'une meilleure efficacité de rétention de l'ion Na⁺ dans les gaines, la variété HD évite l'accumulation de l'ion Na⁺ dans le limbe foliaire en activant son efflux via une expression élevée du gène SOS1 dans ce compartiment. Des résultats similaires ont été rapportés par Brini et *al.*, (2009) qui notent l'existence d'une corrélation entre le type d'expression du gène TaSOS1 dans les racines et les gaines et le flux de l'ion Na⁺ des racines vers les feuilles. Par contre Genc et *al.*, (2007) n'ont pas observé une telle corrélation entre le contenu en Na⁺ du feuillage et la tolérance à la salinité chez le blé. Ceci suggère que l'exclusion du Na⁺, seule, n'est pas toujours suffisante pour améliorer la tolérance à la salinité ; et de ce fait d'autres mécanismes physiologiques doivent être pris en considération.

Conclusion

Parmi les cinq gènes candidats étudiés, les HKT1;5 et HKT2; 2 s'expriment dans les racines, mais pas dans la gaine et dans le limbe foliaires, avec une meilleure expression du gène HKT1;5 qui s'accumule à des niveaux plus élevés dans les racines de HD. Ceci suggère que ces deux gènes interviennent dans le transport des ions Na^+/K^+ , à travers la membrane plasmique des cellules corticales des racines, avec cependant un rôle plus actif du gène HKT1;5 chez la variété tolérante HD. Les niveaux des transcrits de l'anti-porteur vacuolaire Na^+/H^+ TNHX-1, dans les racines, la gaine et le limbe sont plus élevés chez HD que chez MD. Cette différence d'expression s'explique par la différence d'accumulation de l'ion Na^+ dans les vacuoles.

Le niveau d'expression de la pyrophosphatase vacuolaire H^+ -PPase, TVP1 est comparable à celui observé pour les transcrits du gène TNHX1. Les racines et la gaine des deux génotypes accumulent plus de transcrits de TVP1 que le limbe foliaire. La similitude du type d'expression des gènes TNHX1 et TVP1, notée chez MD et HD, suggère que la compartimentation vacuolaire agit avec une même efficacité chez les deux génotypes. Plus de transcrits du gène TaSOS-1, un antiporteur Na^+/H^+ de la membrane plasmique, s'accumulent dans les racines et la gaine de MD comparativement à HD. Ce type d'expression suggère qu'en plus d'une meilleure efficacité de rétention de l'ion Na^+ dans les gaines, la variété HD évite l'accumulation de l'ion Na^+ dans le limbe foliaire en activant son efflux via une expression élevée du gène SOS1 dans ce compartiment.

Les résultats de la présente étude indiquent que la tolérance à la salinité chez le blé tendre semble liée à la capacité d'éviter l'accumulation à des niveaux toxiques de l'ion Na^+ , associée à une capacité élevée d'osmorégulation et/ou au maintien d'un niveau acceptable de K^+ , spécialement dans le limbe foliaire.

Synthèse

La production Algérienne en matière de céréales reste marginale, quoiqu'elle ait connu des augmentations significatives depuis les années 1960, atteignant plus de 35 millions de quintaux (FAO, 2009). Les importations connaissent, elles aussi, des augmentations importantes, atteignant les 80 millions de quintaux, suite aux besoins, toutes céréales confondues, qui dépassent largement les 100 millions de quintaux (Hervieux et *al.*, 2006). La production des zones arides et semi-arides est très faible et irrégulière. L'élévation de la température et la rareté des événements pluvieux, tard au cours du cycle de développement de la plante et particulièrement après l'anthèse, représentent des contraintes à l'augmentation des rendements en zone semi-aride.

L'effet se manifeste par une accélération de la sénescence foliaire et un arrêt de la croissance du grain (Condon et *al.*, 2004). La salinité qui est l'accumulation des sels dissous dans la solution du sol à un niveau qui inhibe la croissance et le développement des plantes, représente une autre contrainte à la production des cultures des zones arides et semi-arides (Munns et *al.*, 2006). De plus la salinité est associée à l'eau qui est un important facteur d'augmentation des productions végétales.

La recherche d'une meilleure adaptation à la variation environnementale est devenue donc une nécessité pour améliorer les rendements de ces régions. La variation des rendements est engendrée par la sensibilité des nouveaux cultivars aux divers stress biotiques et abiotiques qui caractérisent le milieu de production. La sélection directe basée sur le rendement s'est révélée, le plus souvent, inefficace dans l'identification de génotypes adaptés et tolérants les stress (Rodrigues et *al.*, 2008). La réponse des plantes aux divers stress abiotiques est une caractéristique sous contrôle génétique complexe. Elle est déterminée en partie par les propriétés cellulaires (Bajji et *al.*, 2001).

Les biotechnologies représentent une approche privilégiée pour la mise en œuvre de tests de criblage applicables au niveau cellulaire (Eleuch et *al.*, 2008). Leur emploi s'est avéré efficace dans la compréhension des mécanismes intervenants dans la tolérance aux stress (Baum et Johnson, 2007). L'identification de gènes induits en condition de stress, constitue une approche prometteuse en amélioration des plantes. En effet, l'isolement de gènes

candidats et leur caractérisation devrait permettre à court terme leur transfert à d'autres fonds génétiques plus performants, et qui sont généralement plus sensibles aux stress abiotiques (Baum et Johnson, 2007).

Le présent travail se propose comme objectifs d'évaluer la réponse de deux variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), Mahon-Demias (MD) et Hidhab (HD), à la salinité à travers l'étude du comportement morpho-physiologique sous stress salin, la réponse à la culture *in vitro* et l'étude du niveau d'expression de cinq gènes codants pour les transporteurs de Na⁺. Les résultats de l'étude de la réponse à la salinité des variétés MD et HD indiquent la réduction, sous l'effet de la salinité, du pourcentage de germination, la longueur des racines et des épicotyles, la surface foliaire, le contenu en chlorophylle, la teneur relative en eau, le potentiel hydrique, la fluorescence et l'augmentation des sucres solubles. Hormis la fluorescence qui ne discrimine pas entre les deux génotypes étudiés, la réduction des autres variables mesurées est en faveur de HD comparativement à MD.

Greenway et Munns (1980) mentionnent que la salinité affecte la croissance par l'effet du déficit hydrique, la toxicité des ions absorbés en excès et par le déséquilibre ionique qui résulte de l'antagonisme entre les ions en excès et ceux qui sont en déficit et qui sont nécessaire à l'activité enzymatique. Termatt et Munns, (1986) ; Munns, (1993) ainsi que Zhao et *al.*, (2007) expliquent que la réduction de la croissance est la conséquence de plusieurs causes, dont entre autres le statut hydrique, le déséquilibre ionique, la répartition et l'utilisation des hydrates de carbone.

Plusieurs études rapportent que l'effet de la salinité se manifeste par une réduction de la croissance qui fait suite à une réduction de la photosynthèse causée par l'effet osmotique de la salinité (perturbation de l'alimentation hydrique et minérale), et la perte de la turgescence (Munns et James, 2003 ; Hakim et *al.*, 2010 ; Munns et *al.*, 2012). Chez MD, la partie racinaire est plus affectée par la salinité que la partie aérienne. Sous l'effet de la salinité, MD réduit son système racinaire au profit de la partie aérienne pour maintenir l'activité photosynthétique. Alors que HD investit plus dans les racines au détriment de la partie aérienne.

Ces comportements représentent des stratégies caractéristiques des glycophytes, selon Brugnoli et Bjorkman, (1992) et Bernstein et *al.*, (1993). En effet Bouaouina et *al.*, (2000) notent chez le blé dur que la croissance des organes aériens est plus affectée que celles des

racines. Ces auteurs expliquent que la plante, dans ce cas précis, privilégie d'allouer plus d'assimilats aux racines pour avoir accès à un volume du sol plus important et rétablir la turgescence foliaire. Dans ce contexte, Bartels et Sunkar, (2005) expliquent que l'arrêt de croissance, aérienne ou racinaire, permet à la plante stressée de constituer des réserves énergétiques qu'elle utilise, une fois le stress est levé.

Munns *et al.*, (2006) expliquent que la diminution de la surface foliaire, représente une forme d'adaptation à la salinité, qui minimise les pertes d'eau par transpiration. A cet effet Zhao *et al.*, (2007) mentionnent que la réduction de la surface foliaire est induite par la réduction de la turgescence plus que par l'effet ionique, parce que cette réduction est observée bien avant que la concentration interne de la plante en Na^+ n'atteint le seuil toxique. Hu et Schmidhalter, (1998) ainsi que Zhao *et al.*, (2007) expliquent la réduction de la surface foliaire des génotypes sensibles par le fait que le Na^+ absorbé n'est pas éliminé du flux de la transpiration et s'accumule à un niveau toxique dans le feuillage.

Selon Hakim *et al.* (2010) ainsi que Hamrouni *et al.*, (2011), les variétés tolérantes régulent la pression osmotique interne par la synthèse d'osmoprotecteurs, principalement des sucres solubles et des acides aminés. La synthèse des sucres solubles est, dans le cas de la présente étude, une caractéristique de tolérance du génotype HD vis-à-vis de la salinité. Hazegawa *et al.*, (2000) ainsi que Serraj et Sinclair, (2002) notent que les plantes tolèrent le stress salin en réduisant le potentiel osmotique cellulaire, suite à l'accumulation de solutés compatibles. Serrano et Gaxiola, (1994) ainsi que Hasegawa *et al.*, (2000) mentionnent que pour réaliser l'ajustement osmotique, la cellule compartimente les ions toxiques dans la vacuole et en même temps synthétise et accumule les solutés compatibles dans le cytoplasme pour maintenir l'équilibre osmotique entre les deux compartiments. Il apparaît donc que les plantes supérieures tolèrent la salinité en développant des stratégies pour maintenir la concentration des sels toxiques dans le cytoplasme à des niveaux raisonnables avec l'activité métabolique.

La salinité réduit le contenu chlorophyllien, dans cette étude. Cette réduction est dépendante de l'intensité du stress et du degré de tolérance de la plante, elle est moindre chez HD comparativement à MD. Velegaleti *et al.*, (1990) rapportent que la réduction de la chlorophylle est corrélée avec l'accumulation du Cl^- dans les tissus. Dans la présente étude, on note que le rendement quantique est plus élevé sous stress modéré que sous stress sévère.

La variation, de même ordre de grandeur chez MD et HD, des valeurs prises, par la fluorescence est attribuée aux perturbations photosynthétiques induite par la salinité.. Bounaqba, (1998) ; Vadel, (1999) ; Bouaouina et *al.*, (2000) ; et Denden et *al.*, (2005) n'observent pas d'effet de la salinité sur la fluorescence chez diverses espèces de plantes ornementales, triticale, blé tendre et orge.

Le suivi du contenu en ions indique que l'accumulation de Na^+ est plus importante dans la gaine de HD, et le limbe de MD, avec peu de différence entre variétés pour le contenu en Na^+ des racines. Ceci suggère que HD met en jeu un mécanisme supplémentaire pour contrer la salinité, en séquestrant préférentiellement plus de sodium dans la gaine, que dans le limbe à l'inverse de la variété MD. HD présente une plus grande capacité à accumuler l'ion K^+ dans le limbe et au niveau des racines comparativement à MD. Ceci engendre un ratio K^+/Na^+ du limbe foliaire plus élevé chez HD comparativement à celui de MD. Ceci suggère que c'est surtout au niveau des feuilles que HD rétablit l'équilibre de son potentiel osmotique via le K^+ et minimise ainsi l'effet du stress osmotique engendré par NaCl .

La capacité de HD à pomper plus de K^+ de la solution nutritive, puis de le véhiculer vers le limbe, représente donc une stratégie d'adaptation au stress salin via la régulation osmotique. En effet selon Zhu (2003), les fonctions cellulaires végétales sont tributaires d'un rapport K^+/Na^+ élevé, et sous salinité, les ions Na^+ entrent en compétition avec les ions K^+ . Ce déséquilibre ionique engendre la toxicité de Na^+ et des concentrations en K^+ insuffisantes pour les réactions enzymatiques et l'ajustement osmotique. Munns et *al.*, (2006) expliquent que le sodium est toxique lorsqu'il est présent à de fortes concentrations au niveau du cytoplasme des cellules foliaires. Dans ce cas il inhibe les réactions enzymatiques, sauf s'il est compartimenté au niveau des vacuoles. Le génotype tolérant, aura tendance à afficher des concentrations élevées de sodium dans les feuilles, tout en compartimentant cet ion dans la vacuole pour protéger le cytoplasme de sa toxicité.

Chez certaines espèces de plantes la tolérance au stress salin est assurée par la recirculation de l'ion sodium en excès des feuilles vers les racines. Munns et *al.*, (2012) mentionnent que la circulation du sodium de la partie aérienne vers la partie racinaire est assurée par les transporteurs SOS1 et HKT1 chez *Arabidopsis* et le blé via le phloème.

Ces résultats mettent en relief la tolérance à la salinité de HD comparativement à MD qui se montre plutôt sensible. Ils suggèrent que la tolérance de la salinité chez le blé tendre semble être liée à la capacité d'éviter l'accumulation du Na^+ à des niveaux toxiques, dans le limbe foliaire et à la capacité d'ajustement osmotique. Ils indiquent aussi que le pourcentage de germination, la surface foliaire, la longueur de l'épicotyle, celle des racines et les teneurs en chlorophylle et en sucres, ainsi que le contenu en cations Na^+ et K^+ , sont des paramètres très sensibles à la salinité et peuvent, par conséquent, servir comme marqueurs de tolérance à la salinité chez le blé tendre. Cette information est utile pour la sélection du matériel végétal dans le programme d'amélioration génétique du blé tendre.

Les résultats de l'étude portant sur l'analyse de l'aptitude d'induction des cals et la capacité de régénération de plantules à partir d'embryons matures, soumis indépendamment aux stress salin et thermique indiquent que MD répond mieux que HD. Cet avantage est observé dans le taux de d'induction des cals qui prend les valeurs 88.5% et 58.3%, sous stress salin et de 46.8% et 36.4%, sous stress thermique, respectivement pour MD et HD. Sous stress salin, la réduction de la prolifération des cals est relativement moindre chez MD, passant de 100% à 62.5% et de 91.6% à 25.0%, chez HD. La formation des embryons est cependant plus faible, sous salinité, chez MD, prenant une valeur relative de 8.3%, comparativement à la valeur prise par HD qui est de 12.5%.

On note cependant l'effet inverse sous stress thermique où HD présente une efficacité embryonnaire plus faible. Le taux de régénération de plantules, à partir des cals proliférant de la variété HD était nul et faible pour MD, prenant des valeurs de 0.0 et 4.2% sous salinité. Sous stress thermique des taux similaires sont mesurés. MD émet des racines au contraire de HD qui n'en produit pas, aussi bien sous salinité que sous stress thermique. La longueur racinaire, de 25 mm en absence de stress, est réduite à 20mm sous stress modéré. La surface des cals est fortement affectée par les stress chez les deux génotypes étudiés avec un effet plus important sur HD. Quoiqu'en faible nombre, la variété MD réussit à régénérer plus de plantules que HD, sous l'effet des stress étudiés.

Ces résultats corroborent partiellement ceux d'autres études. Ainsi, He et *al.*, (1986) et Jiang et *al.*, (1998) stressent l'importance de la composition du milieu de culture dans la réussite d'un protocole de sélection *in vitro*. Balli et *al.*, (1993) ; Bregitzer et *al.*, (1998) ainsi que Ganeshan et *al.*, (2003) notent que la régénération des plantules vertes est

dépendante du génotype et de la concentration du 2.4-D utilisée. Une large variation du taux d'induction des cals est observée par Chen *et al.*, (2006). La nature de l'explant utilisé est aussi une source de variation des résultats, ainsi les embryons matures, comparativement aux embryons immatures, présentent une faible capacité d'induction des cals (Ozgen *et al.*, 1996, Chang *et al.*, 2003).

Sous milieu artificiel, la sensibilité du matériel végétal est plus accrue, ainsi Abebe *et al.*, (2003) rapportent une forte réduction de la croissance des cals en présence d'un stress salin d'intensité modère. Ceci peut expliquer les faibles résultats obtenus sous des intensités élevées de stress, aussi bien salin que thermique, utilisées dans la présente étude. De plus, dans le protocole de la présente étude, peu de variantes de la composition du milieu ont été étudiées. Cependant les résultats obtenus suggèrent la possibilité d'utiliser la technique *in vitro* pour la sélection vis-à-vis des stress, pour peu qu'un protocole adéquat soit identifié et maîtrisé.

Les résultats de l'étude du profil d'expression des gènes candidats de la tolérance au stress salin montrent un niveau élevé d'expression des gènes HKT1;5 et HKT2;2 dans les racines, mais pas dans les gaines et les limbes foliaires des deux cultivars. Les transcrits du gène HKT1;5 s'accumulent à des niveaux plus élevés dans les racines de HD. Il en est de même de l'accumulation des transcrits de l'anti-porteur vacuolaire Na^+/H^+ TNHX-1, dont les niveaux dans les racines, la gaine et le limbe sont aussi plus élevés chez HD. Le niveau d'expression de la pyro-phosphatase vacuolaire H^+ -PPase TVP1 est comparable à celui observé pour les transcrits du gène TNHX1. Ces résultats indiquent que les racines et les gaines des deux génotypes accumulent plus de transcrits de TVP1 que les limbes foliaires. Pour le gène TaSOS-1, un anti-porteur Na^+/H^+ de la membrane plasmique, plus de transcrits s'accumulent dans les racines et les gaines de MD comparativement à HD. Laurie *et al.*, (2002) rapportent que l'expression du gène HKT1 chez le blé réduit de l'assimilation du Na^+ par les racines, tout en favorisant la croissance sous salinité.

Les transporteurs HKT assurent le transport spécifique des ions Na^+ et régulent l'homéostasie du Na^+ , assurant ainsi la tolérance à la salinité (Rodriguez-Navarro et Rubio, 2006; Munns et Tester, 2008). Chez le blé dur, l'expression d'un homologue du gène TmHKT7-A2 contrôle le déchargement du Na^+ du xylème des racines et de la gaine chez les lignées tolérantes à la salinité, mais pas chez les lignées sensibles (James *et al.*, 2006).

Les résultats de la présente étude suggèrent que les deux HKT gènes interviennent dans le transport des ions Na^+/K^+ , à travers la membrane plasmique des cellules corticales des racines, avec cependant un rôle plus actif du gène HKT1;5 chez la variété HD.

Les transcrits du gène TNHX1 s'accumulent à un niveau élevé dans les racines et les gaines des deux cultivars MD et HD, comparativement à l'accumulation dans le limbe. Cette expression élevée des transcrits, dans les racines et les gaines, fait suite à une accumulation accrue du Na^+ dans les vacuoles. Selon, Zhang et Blumwald, (2001), la surexpression du gène AtNHX1 chez la tomate entraîne une amélioration appréciable de la tolérance à la salinité. Selon Zhu, (2003), la séquestration vacuolaire du Na^+ permet d'abaisser les concentrations cytoplasmiques en Na^+ et contribue à l'ajustement du potentiel osmotique. Elle est assurée par des antiports Na^+/H^+ dont l'activité dépend de pompes à protons vacuolaires du type H^+ -ATPase et H^+ -PPase. La surexpression des pyrophosphatase de type AVP1 augmentent la séquestration vacuolaire du Na^+ et maintient le potentiel hydrique des feuilles, ce qui améliore la tolérance au stress salin (Gaxiola et al., 2001).

Le niveau d'expression du gène TVP1, dans les différents tissus des deux génotypes évalués, est similaire à celui du gène TNHX1, suggérant que l'anti-porteur Na^+/H^+ agit, en concert, les H^+ -PPase et ATPase vacuolaires pour séquestrer les cations dans la vacuole et les compartiments pré-vacuolaires. La similitude du type d'expression des gènes TNHX1 et TVP1, notée chez MD et HD, suggère que la compartimentation vacuolaire agit avec une même efficacité chez les deux génotypes. La compartimentation vacuolaire des ions Na^+ , en excès, fournit un moyen peu coûteux, en termes d'énergie, pour réaliser l'osmorégulation sous salinité. Ce type d'osmorégulation est similaire à celui réalisé par la rétention du K^+ dans le cytosol. L'accumulation des transcrits du gène TaSOS1, de la membrane plasmique, était plus faible dans les racines et les gaines de HD que de MD ; alors que dans le limbe, l'expression du gène TaSOS1 était plus élevée chez HD que chez MD.

Ce type d'expression suggère qu'en plus d'une meilleure efficacité de rétention de l'ion Na^+ dans les gaines, la variété HD évite l'accumulation de l'ion Na^+ dans le limbe foliaire en activant son efflux via une expression élevée du gène SOS1 dans ce compartiment. Des résultats similaires ont été rapportés par Brini et al., (2009) qui notent l'existence d'une corrélation entre le type d'expression du gène TaSOS1 dans les racines et les gaines et le flux

de l'ion Na^+ des racines vers les feuilles. Par contre Genc *et al.*, (2007) n'observent pas une telle corrélation entre le contenu en Na^+ du feuillage et la tolérance à la salinité chez le blé. Ceci suggère que l'exclusion du Na^+ , seule, n'est pas toujours suffisante pour améliorer la tolérance à la salinité ; et de ce fait d'autres mécanismes physiologiques doivent être pris en considération. Le gène *SOS1* affecte l'efflux du sodium des cellules racinaires et son transport vers la tige. La surexpression de ce gène augmente la tolérance d'*Arabidopsis* au stress salin (Shi et Zhu, 2002 ; Shi *et al.*, 2003). A la lumière de ces résultats, un modèle de fonctionnement des gènes transporteurs est proposé pour expliquer les mécanismes de transport mis en jeu (Figure 31).

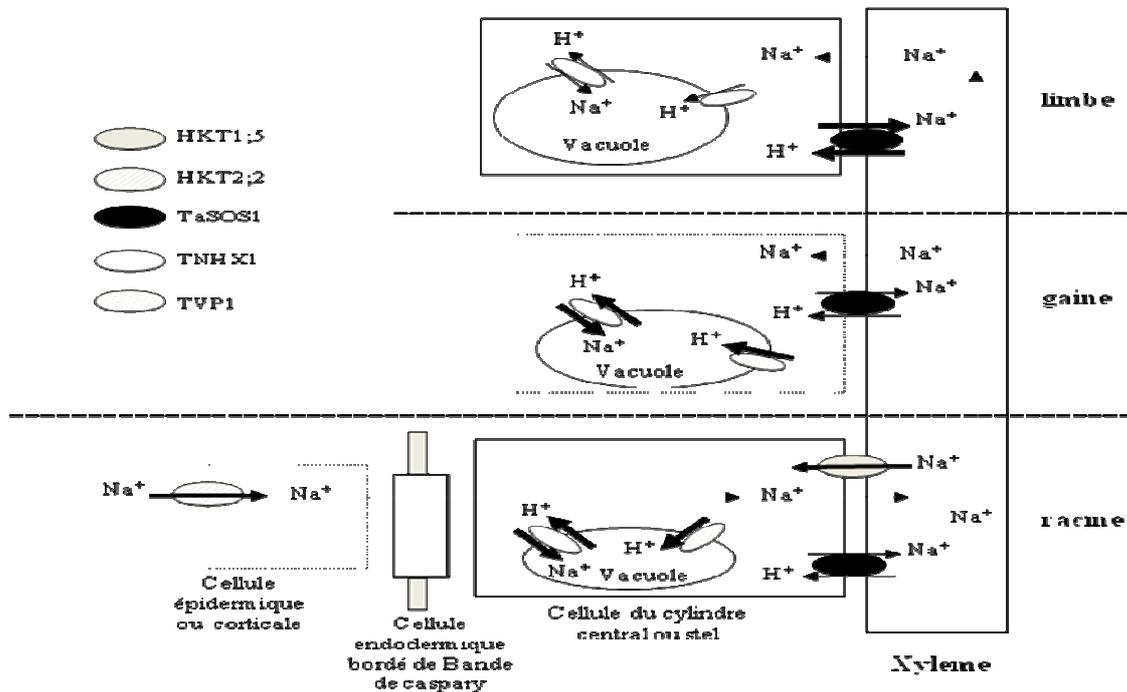


Figure 31. Model d'explication des mécanismes de transport de sodium: déchargement et séquestration vacuolaire chez la variété tolérante au sel.

Conclusion générale

Dans la présente étude, nous avons étudié les paramètres morphologiques et physiologiques de deux variétés de blé tendre Mahon-Demias (MD) et Hidhab (HD) tel que le pourcentage de germination, la longueur des racines et des épicotyles, la surface foliaire, le potentiel hydrique, la teneur relative en eau, le dosage des ions (Na^+ et K^+), le taux de la chlorophylle, la fluorescence chlorophyllienne et la teneur en sucres solubles. Ces paramètres ont été évalués afin de caractériser le niveau de la tolérance de ces deux variétés vis-à-vis du stress salin. Nous avons utilisé différentes concentrations salines (0, 50, 100 et 200mM NaCl), avec des durées d'exposition au stress allant de 3 à 14 jours.

Les résultats ont montré que le stress salin induit une diminution de la croissance des racines et des parties aériennes chez les deux variétés de blé étudiées. La réduction de la croissance en présence de sel a été interprétée comme étant le résultat d'une réduction de l'alimentation de la plante en eau et en éléments minéraux majeurs et plus particulièrement l'ion K^+ . La variété MD montre une accumulation des ions Na^+ plus importante dans les parties aériennes, comparativement à la variété HD. Ceci est en relation avec le niveau de tolérance au sel, observé chez la variété HD où le xylème pourrait limiter le transport de Na^+ dans les feuilles. La tolérance à des concentrations salines élevées chez le blé tendre semble être liée à une capacité à éviter l'accumulation des niveaux toxiques de Na^+ et une meilleure capacité d'ajustement osmotique et/ou de maintenir des niveaux adéquats, en particulier dans le limbe de la feuille.

La régénération *in vitro* des plantules de deux variétés a été étudiée en utilisant les embryons matures comme source d'explants. Les résultats ont indiqué que MD présente un taux élevé d'induction des cals comparativement à HD. Une réponse différentielle est également été notée pour la capacité des cals à proliférer et à régénérer des plantes dans différentes conditions de stress salin. L'efficacité embryogène de MD est plus faible sous stress salin comparativement à HD. Le taux de régénération des plantes est nul sous stress salin pour HD et faible pour MD sous stress salin modéré. L'indice de sensibilité (IS) confirme la tolérance de la variété MD comparativement à la variété HD vis-à-vis du stress salin et thermique à un paramètre donné qui est la longueur des racines.

Cet effet génotypique de la réponse à la culture *in vitro* des embryons de blé suggère refaire l'expérience en utilisant plusieurs cultivars, pour déterminer un protocole approprié pour l'étude de la capacité génotypique à induire de la prolifération des cals et la régénération des plantes à partir d'embryons matures. Ce protocole est indispensable pour les études de sélection vis-à-vis des stress.

L'expression moléculaire de quelques gènes candidats codant pour la tolérance au stress salin sous l'effet de différentes concentrations salines, allant de 0 à 200 mM NaCl, a fait l'objet d'une étude de cinq gènes candidats. Les HKT1;5 et HKT2; 2 s'expriment dans les racines, mais pas dans la gaine et dans le limbe foliaires, avec une meilleure expression du gène HKT1;5 qui s'accumule à des niveaux plus élevés dans les racines de HD. Ceci suggère que ces deux gènes interviennent dans le transport des ions Na^+/K^+ , à travers la membrane plasmique des cellules corticales des racines, avec cependant un rôle plus actif du gène HKT1;5 chez la variété tolérante HD.

Les niveaux des transcrits de l'anti-porteur vacuolaire Na^+/H^+ TNHX-1, dans les racines, la gaine et le limbe sont plus élevés chez HD que chez MD. Cette différence d'expression s'explique par la différence d'accumulation de l'ion Na^+ dans les vacuoles. Le niveau d'expression de la pyrophosphatase vacuolaire H^+ -PPase, TVP1 est comparable à celui observé pour les transcrits du gène TNHX1. Les racines et la gaine des deux génotypes accumulent plus de transcrits de TVP1 que le limbe foliaire. La similitude du type d'expression des gènes TNHX1 et TVP1, notée chez MD et HD, suggère que la compartimentation vacuolaire agit avec une même efficacité chez les deux génotypes.

Plus de transcrits du gène TaSOS-1, un anti-porteur Na^+/H^+ de la membrane plasmique, s'accumulent dans les racines et la gaine de MD comparativement à HD. Ce type d'expression suggère qu'en plus d'une meilleure efficacité de rétention de l'ion Na^+ dans les gaines, la variété HD évite l'accumulation de l'ion Na^+ dans le limbe foliaire en activant son efflux via une expression élevée du gène SOS1 dans ce compartiment.

Les résultats de la présente étude indiquent que la tolérance à la salinité chez le blé tendre semble liée à la capacité d'éviter l'accumulation à des niveaux toxiques de l'ion Na^+ , associée à une capacité élevée d'osmorégulation et/ou au maintien d'un niveau acceptable de

K⁺, spécialement dans le limbe foliaire. Ces informations sont importantes dans la sélection du matériel végétal pour les futurs programmes d'amélioration des céréales.

Perspectives

Cette étude a permis de décrire les comportements variés vis-à-vis les contraintes abiotiques qui règnent dans l'environnement de la céréaliculture Algérienne et en particulier de distinguer celui des variétés améliorées (variété HD, améliorée à partir des années quatre vingt dix), de celui des variétés locales (variété MD, introduite pendant la période coloniale par des colons français).

Les résultats obtenus laisse entrevoir de nombreuses perspectives non seulement dans un but de sélection et d'amélioration des variétés très répandu, et plus cultivées, mais aussi dans le but d'approfondir nos connaissances sur les caractères morpho-physiologiques et l'aptitude à la régénération *in vitro* à travers le déterminisme d'un protocole expérimental solide en précisant les meilleures balances hormonales en s'intéressant surtout à l'aspect de la génétique moléculaire de la tolérance aux stress salin et thermique comme étant deux facteurs limitant la production en matière céréalière en région arides et semi arides.

Pour faire face à telle situation difficile, on envisage à encourager la recherche pour sélectionner des variétés adaptées aux conditions marginales des zones défavorisées où les stress salin, hydrique et thermique entravent l'augmentation de la production céréalière nationale. Les progrès durant cette dernière décennie en biologie moléculaire et génie génétique des plantes ouvrent une nouvelle ère aux chercheurs et aux agriculteurs. L'ingénierie de plantes mieux adaptées à leur environnement est aujourd'hui possible.

Bien que l'adaptation à un stress biotique ou abiotique soit un phénomène très complexe et à caractère multi-génique, le transfert d'un seul gène grâce à la transformation génétique des plantes notamment par *Agrobacterium*, peut améliorer la tolérance de la plante.

Références bibliographiques

1. Abbo, S., Lev-Yadun, S., Gopher, A. (2010) Yield stability: an agronomic perspective on the origin of Near Eastern agriculture. *Veget Hist Archaeobot*, 19: 143-150.
2. Abebe, T., Guenzi, B., Martin, J.C., Cushman, A.C. (2003) Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol*, 131: 1748 -1755.
3. Acevedo, E. (1989) Improvement of winter wheat crops in Mediterranean environments use of yield, morphological traits. In: *Physiology breeding of winter cereals for stressed Mediterranean environments. Les Colloques* 55: 273-305.
4. Acevedo, E., Ceccarelli, S. (1989) Role of physiologist-breeder in a breeding program for drought tolerance conditions. In : FWG Baker, ed. *Drought resistance in cereals*, CAB International Wallingford , UK, PP. 117-139.
5. Acevedo, E., Silva, P. C., Silva, H. R., Solar, B. R. (1999) Wheat production in Mediterranean environments. In: *Satorre, E. H., Slafer, G. A (Eds.) Wheat ecology and physiology in yield determination. Food products press, an imprint of the Hayworth press, Binghamton, N. Y*: 141-159.
6. Adjabi, A., Bouzerzour, H., Lelarge, C., Benmahammed, A., Makhlof, A., Hannachi, A. (2007) Relationships between grains yield performance, temporal stability and carbone isotope discrimination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) under Mediterranean conditions. *Journal of Agronomy*, 6(2): 294-301.
7. Alberico, G. L., Cramer, G. R. (1993) Is the salt tolerance of maize related to sodium exclusion? Preliminary screening of seven cultivars. *J. Plant Nutr*, 16 (11): 2289-2303.
8. Allen, R. D. (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol*, 107: 1049-1054.
9. Alloy, M. (1992) Effect of different levels of salinity on yield and yield components of varieties of barley. Proceeding of second congress. Warwick University 23-28 August. *European society of agronomy*. Warwick UK. 437P.
10. Alscher, R. G., Neval, E., Lenwood, S. H. (2002) Role of superoxide dismutase's (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 372 (53): 1331-1341.

11. Amokrane, A., Bouzerzour, H., Benmahammed, A., Djekoun. A. (2002) Caractérisation des variétés locales, syriennes et européennes de blé dur évaluées en zone semi-aride d'altitude. *Revue Sciences et Technologie* (Univ. Mentouri, Constantine). *Numéro spécial D*, 33-38.
12. Annicchiarico, P., Abdellaoui, Z., Kelkouli, M., Zerargui, H. (2005) Grain yield, straw yield and economic value of tall and semi dwarf durum wheat cultivars in Algeria. *Journal of Agricultural Science*, 143: 57- 67.
13. Annicchiarico, P., Bellah, F., Chiari, T. (2006) Repeatable genotype \times locations interaction and its exploitation by conventional and GIS based cultivar recommendation for durum wheat in Algeria. *Eur. J. Agr.* 24 : 70-81
14. Apse M. P., Sottosanto, J.B., blumwald, E. (2003) Vacuolar cation $/H^+$ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AT NHX1, the *Arabidopsis* vacuolar Na^+/H^+ antiporters. *The plant journal*, 36: 229-239
15. Apse, M. P., Aharon, G. S., Snedden, W. A., Blumwald, E. (1999) Salt tolerance conferred by over expression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 285: 1256 -1258.
16. Araus, J. L., Villegas, D., Aparicio, N., Garcia del Moral, L. F., El Hani, S., Rharrabti, Y., Ferrio, J. P., Royo, C. (2003) Environmental factors determining carbon isotope discrimination and yield in durum wheat under Mediterranean conditions. *Crops Science*, 43: 170-180.
17. Ashraf, M. (2002) Exploitation of genetic variation for improvement of salt tolerance in spring wheat. PP.113-121. In: *Ahmad, R. and Malik, K. A. (eds.) Prospects for saline agriculture. Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands.*
18. Ashraf, M., McNeilly. T (1988) Variability in salt tolerance of nine spring wheat cultivars. *J. Agron. Crop. Sci*, 160: 14-21.
19. Bahlouli, F., Bouzerzour, H., Benmahammed, A., Hassous, K. S. (2005) Selection of high yielding and risk efficient durum wheat (*Triticum durum* Desf.), cultivars under semi arid conditions. *Pak. J. Agro*, 4: 360-365.
20. Bajji, M., Lutts, S., Kinet, J. M. (2000) Physiological changes after exposure to and recovery from polyethylene glycol-induced water deficit in callus culture issued from durum wheat (*Triticum durum*), cultivars differing in drought resistance. *J. Plant Physiol*, 156: 75-83.

21. Bajji, M., Lutts, S., Kinet, J-M. (2001) Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.), cultivars performing differently in arid conditions. *Plant Sci.* 160: 669 - 681.
22. Balli, A. M. R., Rosnagel, B. G., Kartha, K. K. (1993) Evaluation of 10 Canadian barley (*Hordeum vulgare* L.), cultivars for tissue culture response. *Can .J. Plant. Sci.*, 73: 171-174.
23. Barrs, H. (1968) Determination of water deficit in plant tissues. In: Water deficit and plant growth, Koslowski.(eds): Academy press New York.
24. Bartels, D., Sunkar, R. (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci*, 24: 23-58.
25. Baum, B. R., Johnson, D. A. (2007) The identification of six rowed spring malting barley cultivars by single nucleotide polymorphisms (SNP) detected by allele specific PCR., 5th International Symposium on the Taxonomy of Cultivated Plants, Wageningen University, Wageningen, Netherlands, October 15-19.
26. Benderradji, L., Brini, F., Ben Amar, S., Kellou, K., Azaza, J., Masmoudi, K., Bouzerzour, H., Hanin, M. (2011) Sodium transport in the seedlings of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes showing contrasting salt stress tolerance. *Australian Journal of Crop Science*, 5(3): 233-241
27. Benmahammed, A., Kribaa, M., Bouzerzour, H., Djekoun, A. (2010) Assessment of stress tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) advanced breeding lines under semi arid conditions of the eastern high plateaus of Algeria *Euphytica*, 172 (3): 383-394.
28. Berger, M. (1985) Etude des caractères morpho-physiologiques des composantes du rendement et de leurs corrélation génétiques et environnementales chez le blé tendre, Thèse Docteur Ingénieur, ENSA, Toulouse, 182 pages.
29. Bernstein, N., Läuchli, A., Silk, W. K. (1993) Kinematics and dynamics of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) leaf development at various Na⁺/Ca⁺⁺ salinities. I. Elongation and growth. *J. Plant Physiol*, 103: 1107-1111.
30. Bertrand, E. (1996) Les sites antiques. La lettre du Pays de Tronçais, 2: 1- 48.
31. Bhandal, I. S., Malik, C. P. (1988) Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. *Int Rev Cytol*, 110: 205-254.
32. Bommineni, V. R., Jauhar, P. P. (1996) Regeneration of plantlets through isolated scutellum culture of durum wheat. *Plant Sci*, 16: 197-203.

33. Bouaouina, S., Zid, E., Hajji, M. (2000) Tolérance à la salinité, transports ioniques et fluorescence chlorophyllienne chez le blé dur (*Triticum turgidum* L.). *Options méditerranéennes* 40: 239-243.
34. Bounaqba, S. (1998) Analyse des déterminants de la tolérance à NaCl chez le blé tendre, le triticale et l'orge. Utilisation de la fluorescence chlorophyllienne dans le diagnostic de l'état fonctionnel du photosystème II. Doctorat de Biologie, Faculté des Sciences, Univ. Tunis II.
35. Bouzerzour, H., Benmahammed, A., Mekhlouf, A., Harzallah, D. (1998) Evaluation de quelques techniques de sélection pour la tolérance aux stress chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) en zone semi aride d'altitude. *Céréaculture*, 33: 27-33 .
36. Bouzerzour, H., Djekoun, A. (1996) Etude de l'interaction génotype x lieu de rendement de l'orge en zone semi aride. *Science & technologies*, 7: 16-28.
37. Bowers, K., Levi, B.P, Patel F.I., Stevens, T.H. (2000) The sodium/proton exchanger NHX1 is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 11: 4277- 4294.
38. Bradley, D. E., Bruneau, A. H., Qu, R. (2001) Effects of cultivar explants treatment, and medium supplements on callus induction and plantlet regeneration in perennial ryegrass. *Int. Turfgrass. Soc. Res. J*, 9: 152-156.
39. Bregitzer, P., Dahleen, L. S., Campbell, R. D. (1998) Enhancement of plant regeneration from embryonic callus of commercial barley cultivars. *Plant Cell Rep*, 17: 941-946.
40. Brini, F., Amara, I., Feki, K., Hanin, M., Khoudi, H., Masmoudi, K. (2009) Physiological and Molecular analysis of seedlings of two Tunisian durum wheat (*Triticum turgidum* L. sub sp. Durum [Desf.]) varieties showing contrasting tolerance to salt stress. *Acta Physiol. Plant*, 31: 145-154.
41. Brini, F., Gaxiola, R. A., Berkowitz, G. A., Masmoudi, K. (2005) Cloning and characterization of a wheat vacuolar cation / proton antiporter and pyrophosphatase proton pump. *Plant Physiol Biochem*, 43: 347-354.
42. Brini, F., Hanin, M., Lumbreras, V., Amara, I., Khoudi, H., Hassairi, A., Pagès, M., Masmoudi, K. (2007) Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 26 (11) : 2017-2026
43. Brini, F., Hanin, M., Mezghanni, I., Berkowitz, G., Masmoudi, K. (2007) Over expression of wheat Na⁺/H⁺ antiporters TNHX1 and H⁺-pyrophosphatase TVP1

- improve salt and drought stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plants. J. Exp. Bot*, 58: 301- 308.
44. Brugnoli, E., Bjorkman, O. (1992) Chloroplast movements in leaves influence on chlorophyll fluorescence and measurements of light-induced absorbency changes related to delta-pH and zeaxanthin formation. *Photosynthesis Research*, 32: 23-35.
 45. Burk, L. G., D. F. Matzinger. (1976) Variation among anther-derived doubled haploids from an inbred line of tobacco. *Journal of Heredity*, 67: 381-384.
 46. Castillo, A. M., Egan, B., Sanz, J. M., Cistue, L. (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. *Plant Cell Rep*, 17: 902- 906.
 47. Cattivelli, L., Baldi, P., Crossati, N., Di Fonzo, N., Stanca, M. (2002) Chromosome regions and stress related sequences involved in resistance to abiotic stress in *Triticeae*. *Plant molecular biology*, 48: 649 - 665.
 48. Chang, Y., Zitzewitz, J., Hayes, P. M., Chen, T. H. H. (2003) High frequency plant regeneration from immature embryos of elite barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Rep*, 21: 733 - 738.
 49. Chaudhury, A., Qu, R. (2000) Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type *Bermuda grass*: Effects of 6-benzyladenine in callus induction medium. *Plant Cell Tissue. Org. Cult*, 60: 113 - 120.
 50. Chaves, M. M., Pereira, J. S. (2003) Understanding plant responses to drought-from genes to the whole. *Funct. Plant. Biol*, 30: 239 - 264.
 51. Chen, J. Y., Yue, R. Q., Xu, H. X., Chen, X-J. (2006) Study on plant regeneration of wheat mature embryos under endosperm-supported culture. *Agricultural Sciences in China*, 5: 572-578.
 52. Chen, JM., Xue, X., Caid Jensen, B., Chatterton, NJ. (1998) Development and characterization of *Elymus rectisetus* species and accession-specific RAPD markers. In: Slinkkard AE [ed.], Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium, Vol. 3, 98-101. Univ. Extension Press, University of Saskatchewan, Saskatoon.
 53. Chen, T. H. H., Murata, N. (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 250-257.
 54. Cheong M.S., D.J. Yun. (2007) Salt-Stress Signaling. *Journal of Plant Biology*, 50: 148-155.
 55. Chinnusamy, V., Jagendorf, A., Zhu, J. K. (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, 45: 437- 448.

56. Clarke, J. M., McCraig, T. M. (1982) Evaluation of techniques for screening for drought resistance in wheat. *Crop Sci*, 22: 503 - 506.
57. Colmer, T. D., Munns, R., Flowers, T. J. (2005) Improving salt tolerance of wheat and barley: Future prospects. *Aust. J. Exp. Agr*, 45: 1425 - 1443.
58. Condon, A. G., Richards, R. A., Rebetzke, G. J., Farquhar, G. D. (2004) Breeding for high water-use efficiency. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 55, N° 407, Water-Saving. *Agriculture Special Issue*, PP. 2447- 2460.
59. Cramer, G. R. (2002) Sodium-calcium interactions under salinity stress. In: Salinity Environment-Plants-Molecules (Läuchli, A. and Lüttge, U., eds.), Dordrecht, the Netherlands: *Kluwer Academic Publishers*, pp. 205–227.
60. Cramer, G. R., Lauchli. A., Polito, V. S. (1994) Displacement of Ca⁺⁺ by Na⁺ from the plasmalema of root cells. A primary response to salt stress. *Tissue and Organ Culture*, 39: 13 - 18.
61. Crop stat 7. 2. 3. (2009) Free Statistics Package by IRRI, Manila, Philippines.
62. Cuin, T.A., Betts, S.A., Chalmandrier, R., Shabala. S. (2008). Root's ability to retain K⁺ correlates with salt tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 59: 2697-2706
63. Dale, P. J., Deambrogio, E. (1976) A comparison of callus induction and plant regeneration from different explants of (*Hordeum vulgare* L.). *Z. Pflanzenzuecht*, 94: 65- 77.
64. Daoud. Y., Halitim. A (1994) Irrigation et salinisation au Sahara Algérien. *Sécheresse*, 5: 151-161.
65. Davenport, R., James, R.A., Zakrisson-Plogander, A., Tester, M., Munns, R. (2005) Control of sodium transport in durum wheat. *Plant Physiol* , 137: 807-818.
66. De Vita, P., Li Destri Nicosia, O., Nigro, F., Platani, C., Riefolo, C., Di Fonzo, N ., Cattivelli, L. (2007) Breeding progress in morpho-physiological, agronomical and qualitative traits of durum wheat cultivars released in Italy during the 20th century. *European Journal of Agronomy*, 26: 39 - 53.
67. Denden, M., Bettaieb, T., Salhi, A., Mathlouthi, M. (2005) Effet de la salinité sur la fluorescence chlorophyllienne, la teneur en proline et la production florale de trois espèces ornementales, *Tropicultura*, 23(4): 220 - 225.
68. Drozdowicz, Y. M., Rea, P. A. (2001) Vacuolar H⁺ pyrophosphatases from the evolutionary backwaters into the mainstream trends. *Plant Sci*, 6: 206 - 211.

69. Dubcovdky, J., Luo, M.-C., Zhong, G.-Y., Bransteiter, R., Desai, A., Kilian, A., Kleinhofs, A., Dvorak, J. (1996) Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. *Genetics*, 143: 983 - 999.
70. Dubois, M., Gills, K. A., Hamilton, J. K., Roberts, P. A., Smith, F. (1956) Colorometric methods for the determination of sugars and related substances. *Ann. Chem*, 28 (3): 350 - 356.
71. Dvôrak, J., Noamam, M. M., Goyal, S., Gorham, J. (1994) Enhancement of the salt tolerance of (*Triticum turgidum* L.) by the *Kna1* locus transferred from the (*Triticum aestivum* L.) chromosome 4D by homoeologous recombination. *Theor Appl Genet*, 87: 872 - 877.
72. Eagle, A. J., Bird, J. A., Hill, J. E., Horwath, W. R., van Kessel, C. (2001) Nitrogen dynamics and fertilizer use efficiency in rice following straw incorporation and winter flooding. *Agron. J*, 93: 1346 - 1354.
73. Ehdaie, B., Alloush, G. A., Madore, M. A., Waines, J. G. (2006) Genotypic variation for stem reserves and mobilization in wheat: Post anthesis changes in internodes dry matter. *Crop Science*, 46: 735 - 746.
74. El Jaafari, S. (1993) Contribution à l'étude des mécanismes biophysiques et biochimiques de résistance à la sécheresse chez le blé. Doctorat-Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux, Belgique, 214 p.
75. Eleuch, L., Jilal, A., Grando, S., Ceccarelli, S., Von Korff Schmising, M., Tsujimoto, H., Hajer, A., Daaloul, A., Baum, M. (2008) Genetic diversity and association analysis for salinity tolerance, heading date and plant height of barley germplasm using simple sequence repeat markers. *J. Integr. Plant Biol*, 50 (8): 1004 - 1014.
76. El-Hendawy, S. E., Hu, Y., Schmidhalter, U. (2005) Growth, ion content, gas exchange and water relations of wheat genotypes differing in salt tolerance. *Aust. J. Agric. Res*, 56: 123 - 131.
77. Epstein, E. (1972) Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. Wiley, New York.
78. Eyletters, M., Bourrié, B. (1996) La fluométrie: Un outil pour étudier les déficiences nutritionnelles de la vigne et mesurer l'effet des apports d'engrais, *Phytoma*, 489: 58-60.
79. FAO, production data base. (2009) <http://www.fao.org>.
80. Farshadfar, E., Kőszegi, B., Tischner, T., Sutka, J. (1995) Substitution analysis of drought tolerance in wheat. *Plant Breeding*, 114: 542-544.

81. Fellah, A., Benmahammed, A., Djekoun, A., Bouzerzour, H. (2002) Sélection pour améliorer la tolérance aux stress abiotiques chez le blé dur (*Triticum turgidum* L.). *Actes de l'IAV, Hassan II (Maroc)*, 22: 161-170.
82. Fischer, R. A. (1985) Number of kernels in wheat crops and the influence of solar radiation and temperature. *J. Agric. Sci*, 105: 447- 461.
83. Fortmeier, R., Schubert, S. (1995) Salt tolerance of maize (*Zea mays* L.), the role of sodium exclusion. *Plant Cell Environ*, 18: 1041-1047.
84. Fukuda, A., Nakamura, A., Tagiri, A., Tanaka, H., Miyao, A., Hirochika, H., Tanaka, Y. (2004) Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from rice. *Plant Cell Physiol*, 45: 149 - 159.
85. Ganeshan, S., Baga, M., Harwey, B. L., Rossnagel, B. G., Scoles, G. J., Chibbar, R. N. (2003) Production of multiple shoots from thiadiazuron-treated mature embryos and leaf-base/apical meristems of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 73: 57- 64.
86. Gao, F., Gao, Q., Duan, X. G., Yue, G. D., Yang, A. F., Zhang, J. R. (2006) Cloning of an H⁺-PPase gene from *Thellungiella halophila* and its heterologous expression to improve tobacco salt tolerance. *J. Exp. Bot*, 57: 3259 - 3270.
87. Garbarino, J., Dupont, F. M. (1988) NaCl induce a Na⁺/H⁺ antiporter in tonoplast vesicles from barley roots. *Plant Physiology*, 86: 231- 236.
88. Garcíadeblas, B., Senn, M.E., Banuelos, M.A., Rodríguez-Navarro, A. (2003) Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *Plant J*, 34: 788-801.
89. Garcia-Legaz, M. F., Ortiz, J. M., Garcia-Lidon, A., Cerda, A. (1993) Effect of salinity on growth, ion content and CO₂ assimilation rate in lemon varieties on different rootstocks. *Physiologia Plantarum*, 89: 427- 432.
90. Gâte, P. (1995) Ecophysiologie du blé de la plante à la culture. In: *Techniques & Documentation*, p. 429, Paris.
91. Gaxiola, R. A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L. M., Allen, G. J., Alper, S. L., Fink, G. R. (2001) Drought and salt tolerant plants result from over expression of the AVP1 H⁺ pump. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 98: 11444-11449.
92. Genc, Y., McDonald, G.K., Tester, M. (2007) Reassessment of tissue Na⁺ concentration as a criterion for salinity tolerance in bread wheat. *Plant, Cell and Environ*, 30: 1486 -1498.

93. Genc, Y., Oldach, K., Verbyla, A. P., Lott, G., Hassan, M., Tester, M., Wallwork, H., McDonald, G. K. (2010) Sodium exclusion QTL associated with improved seedling growth in bread wheat under salinity stress. *Theoretical and Applied Genetics* 121: 877- 894.
94. Gill, P. K., Sharma, A. D., Singh, P., Bhullar, S. S. (2003) Changes in germination, growth and soluble sugar contents in (*Sorghum bicolor* L.) moench seeds under various abiotic stresses. *Plant growth regul*, 40: 157-162.
95. Gonzalez, J. M., 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 Breeding*, 120: 513 - 517.
96. Gorham, J. (1993) Genetics and physiology of enhanced K^+/Na^+ discrimination. In: Randall, P. eds. genetic aspects of plant mineral nutrition. *Kluwer academic publishers*, Dordrecht the Netherlands, PP: 151-159.
97. Gorham, J., Hardy, C., Wyn Jones, R.G., Joppa, L.R., Law, C.N. (1987) Chromosomal location of a K^+/Na^+ discrimination character in the D genome of wheat. *Theor. Appl. Genet*, 74: 584 - 588.
98. Gorham, J., Wyn Jones, R.G., Bristol, A. (1990) Partial characterization of the trait for enhanced K^+-Na^+ discrimination in the D genome of wheat. *Planta*, 180: 590- 597.
99. Greenway, H., Munns, R. (1980) Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 31: 149 - 190.
100. Gregorio, G.B., Senadhira, D. (1993) Genetic analysis of salinity tolerance in rice (*Oryza. sativa* L.). *Theor. Appl. Genet*, 86: 333 - 338.
101. Hakim, M. A., Juraimi. A.S., Begum. M., Hanafi. M.M., Ismail. M.R., Selamat, A. (2010) Effect of salt stress on germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *African Journal of Biotechnology*, 9 (13): 1911-1918.
102. Hamrouni, L., Mohsen. H., Abdelly, C., Ghorbel, A. (2011) Exclusion du chlorure et inclusion du sodium : Deux mécanismes concomitants de tolérance à la salinité chez la vigne sauvage *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* (var. Séjnéne). *Base*, 15: 387- 400.
103. Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K., Bohnert, H. J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 463-499.

104. He, D. G., Tanner, G., Scott, K. J. (1986) Somatic embryogenesis and morphogenesis in callus derived from the epiblast of immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci*, 45: 119 - 224.
105. He, D.G., Yang, Y. M., Scott, K. J. (1988) A comparison of epiblast callus and scutellum callus induction in wheat: the effect of embryo age, genotype and medium. *Plant Sci*, 57: 225 - 233.
106. Hervieu, B., Capone, R., Abis. S. (2006) The challenge posed by the cereals sector in the Mediterranean. *Ciheam Analytical Note*, N° 9, 14 p.
107. Horie, T., Schroeder, J. I. (2004) Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiol*, 136: 2457- 2462.
108. Hospital, F. (2001) Size of donor chromosome segments around introgressed loci and reduction of linkage drag in marker-assisted backcross programs. *Genetics*, 158: 1363 - 1379.
109. <http://www.fao.org/docrep/011/ai482e/ai482e13.htm>
110. Hu, Y., Schmidhalter, U. (1998) Spatial distributions of inorganic ions and sugars contributing to osmotic adjustment in the elongating wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf under saline soil conditions. *Australian J. Plant Physiol*, 25: 591-597.
111. Ibrahim, A. M. H., Quick, J. S. (2001) Genetic control of high temperature tolerance in wheat as measured by membrane thermal stability. *Crop Science*, 41: 1405-1407.
112. IGC: International Grains Council. (2009) Canada Square Canary Wharf - London, E14 5AE, England.
113. ISTA. (2003) International Rules for Seed Testing. Zurich, Switzerland.
114. James, R. A., Davenport, R. J., Munns, R. (2006) Physiological characterization of two genes for Na⁺ exclusion in durum wheat, NaX1 and NaX2. *Plant Physiology*, 142: 1537- 1547.
115. James, R. A., Rivelli, A. R., Munns, R., Von Caemmerer, S. (2002) Factors affecting CO₂ assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat. *Functional Plant Biology*, 29: 1393 - 1403.
116. Jang, I. C., Oh, S. J., Seo, J. S., Choi, W. B., Song, S. I., Kim, C. H., Kim, Y. S., Seo, H. S., Choi, Y. D., Nahm, B. H., Kim, J. K. (2003) Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiol*, 131: 516 - 524.

117. Jiang, W., Cho, M. J., Lemaux, P. G. (1998) Improved callus quality and prolonged regenerability in model and recalcitrant barley (*Hordeum vulgare* L.), cultivars. *Plant Biotechnology*, 15: 63 - 69.
118. Jones, C. J., Edwards, K. j., Castaglione, S., Winfield, M. O., Sala, F., Vandewiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevski, A., Marmioli, N., Aeret, R., Volckaert, G., Rueda, J., Liacero, R., Vazquez, A., Karpp, A. (1997) Reproductibility testing of RADP.AFLP and SSR markers in plants by a network of european laboratories. *Mol. Breed*, 3: 387-390.
119. Kacem, N. S. (2005) Embryogènèse somatique et variation somaclonale chez le blé dur et tendre (culture d'embryons matures et immatures). Mémoire de magister, Université, Mentour- Constantine. PP 126.
120. Kadi, Z., Adjel, F., Bouzerzour, H. (2010) Analysis of the genotype x environment interaction of barley grain yield (*Hordeum vulgare* L.) under semi-arid conditions. *Advances in Environmental. Biology*, 4: 34 - 40.
121. Kameli, A., Losel, D. M. (1996) Growth and sugar accumulation in durum wheat plants under water stress. *New Phytol.*, 132: 57- 62.
122. Kamoshita, A., Chandra Babu, R., Manikanda Boopathi, N., Fukai, S. (2008) Phenotypic and genotypic analysis of drought-resistance traits for development of rice cultivars adapted to rainfed environments, *Field Crops Research*, 109: 1- 23.
123. Karpp, A., Steel, S. H., Parmar, S., Jones, M. G. K., Shewry, P. R., Breiman, A. (1987) Relative stability among barley plants regenerated from cultured immature embryos. *Genome*, 29: 405- 412.
124. Khajeh-Hosseini, M., Powell, A. A., Bingham. I. J. (2003) The interaction between salinity stress and seed vigour during germination of soybean seeds. *Seed Sci. & Technol*, 31: 715-725.
125. Kirby, E. J. M. (2002) Botany of the wheat plant. In "Bread wheat: Improvement and Production", Curtis, B. C., Rajaram, S., Gomez-Macpherson. H, eds. *Food and agriculture organisation*, Rome.
126. Kirby, E. J. M., M. Appleyard (1984) Cereal development guide, 2nd ed. Arable Unit, National Agriculture Centre, Stoneleigh, Kenilworth, War-wickshire. England. 95p.
127. Kobaiissi, A. (2001) Gynogènèse en conditions de stress salin, source de vitro-variation orientée, pour la création de tolérance à la salinité chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.) et

- le blé dur (*Triticum durum* Desf.). Doctorat INPL, Option *Génét. et Biotechno*, Vandoeuvre, 190 p.
128. Kotchi, S. O. (2004) Détection du stress hydrique par thermographie infrarouge: Application à la culture de la pomme de terre. Maitrise es-sciences, Université Québec, Canada.
 129. Kramer, D. (1984) Cytological aspects of salt tolerance in higher plants. In: Staples, R. C., Toeniessen, G. H, eds. Salinity tolerance in plants. *Strategies for crop improvement*. PP 3 - 15. John Wiley & Sons Inc., New York.
 130. Langridge, P., Paltridge, N., Fincher, G. (2001) Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals, *genomic and proteomic journal*, 4: 343 - 354.
 131. Laumont, P., Erroux, J. (1961) Inventaire des blés durs rencontrés et cultivés en Algérie. In: *mémo Sociologie et histoire naturelle de l'Afrique du Nord*, (Alger), N°5.
 132. Laurie, S., Feeney, K.A., Maathuis, F.J.M., Heard, P.J., Brown, S.J., Leigh, R.A. (2002) A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant. J*, 32: 139-149.
 133. Lecomte, C. (2005) L'évaluation expérimentale des innovations variétales. Proposition d'outils d'analyse de l'interaction génotype-milieu adaptés à la diversité des besoins et des contraintes des acteurs de la filière semences. UR LEG INRA. Paris, *AgroParisTech*. Thèse de doctorat: 262p.
 134. Lee, G. J., Vierling, E. (2000) A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat denatured protein. *Plant Physiol*, 122: 189- 198.
 135. Lev-Yadun, S., Gopher, A., Abbo, S. (2000) The cradle of agriculture. *Science*, 288: 1602-1603.
 136. Lindsay, M.P., Lagudah, E.S., Hare, R.A., Munns, R. (2004) A locus for sodium exclusion (Nax1) a trait for salt tolerance, mapped in durum wheat. *Funct. Plant. Biol*, 31: 1105-1114.
 137. Lutts, S., Kinet, J. M., Bouharmont, J. (1996) Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.), cultivars differing in salinity resistance. *Plant Growth Regul*, 19: 207-218.
 138. Maas, E.V. (1986) Crop tolerance to saline soil water. In: Prospects for Biosaline Research. Proceedings of U.S Pakistan Biosaline Workshop (Eds R. Ahmad & A. San Pietro), 205-219. Karachi University, Karachi, Pakistan.
 139. Mass, E. V., Poss, J. A. (1989) Salt sensitivity of cowpea at various growth stages. *Irrigation Science*, 10: 313 - 320.

140. Mahajan, S., Tuteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 444: 139 - 158.
141. Matoh, T., Ishikawa, T., Takahashi, E. (1989) Collapse of ATP-induced pH gradient by sodium ions in microsomal membrane vesicles prepared from (*Atriplex gmelini*) leaves. *Plant Physiol*, 89: 180-183.
142. Mefti, M., Bouzerzour, H., Abdlguerfi, A., Nouar, H. (2008) Morphological and growth characteristics of Perennial Grass, cultivars grown under semi-arid conditions of the Algerian high plateaus. *Journal of agronomy*, 7 (2): 138 - 147
143. Mekhlouf, A., Bouzerzour, H., Benmahammed, A., Hadj-Sahraoui, A., Harkati, N. (2006) Adaptation des variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) au climat semi-aride. *Sécheresse*, 17(4): 507-513.
144. Mekliche, A., Boukecha, D., Hanifi-Mekliche, L. (2003). Etude de la tolérance a la sécheresse de quelques variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) .I. Effet de l'irrigation de complément sur les caractères phénologiques, morphologiques et physiologiques, 24 (1, 2): 97-110.
145. Moorby, J., Besford, R. T. (1983) Mineral nutrition and growth. In: Encyclopedia of Plant Physiology New Series Vol.15 B: Iorganic Plant Nutrition. Eds. A laüchli and R L Bielecki. *Springer-Verlag, Berlin*. PP: 481-515.
146. Morgan, J. M. (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol*, 35: 299 - 319.
147. Munns, R. (1993) Physiological processes limiting plant growth in Saline soils: Some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ*, 16: 15 - 24.
148. Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Envi*, 25: 239 - 250.
149. Munns, R., Hare, R.A., James, R.A., Rebetzke, G.J. (2000) Genetic variation for improving the salt tolerance of durum wheat. *Aust. J. Agric. Res*, 51: 69 - 74.
150. Munns, R., James, J. A., Xu, B., Athman, A., Conn, S. J., Jordans, C., Byrt, C. S., Hare, R. A., Tyerman, S. D., Tester, M., Plett, D., Gilliam, M. (2012) Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nature Biotechnology*, 30: 360 - 364.
151. Munns, R., James, R. A. (2003) Screening methods for salinity tolerance: A case study with tetraploid wheat. *Plant Soil*, 253: 201-218.
152. Munns, R., James, R. A., Lauchli, A. (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot*, 27: 1025-1043.

153. Munns, R., Rebetzke, G.J., Husain, S., James, R.A., Hare, R.A. (2003) Genetic control of sodium exclusion in durum wheat. *Aust. J. Agric. Res.*, 54: 627- 635.
154. Munns, R., Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 59: 651-681.
155. Najimi, B., El jaafari, S., jlibène, M., Jacquemin, J. M. (2003) Application des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 7: 17- 35.
156. Neumann, P. M. (1995a) Inhibition of root growth by salinity stress: Toxicity or an adaptive biophysical response? In structure and function of roots. Developments in plant and soil sciences (eds. Baluska, F., Ciamporova, M., Gasparikova, O., Barlow, P.W.) pp. 299-304. *Kluwer Academic publishers*, Dordrecht, Netherlands.
157. Neumann, P. M. (1995b) The role of cell wall adjustment in plant resistance to water deficits. *Crop science*, 35: 1258- 1266.
158. Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U., Zhu, J.K. (2003) A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *PNAS*, 100 (20): 11771 - 11776.
159. Oukarroum, A. (2007) Vitalité des plantes d'orge (*Hordeum vulgare* L.) en conditions de stress hydrique et thermique analysée par la fluorescence chlorophyllienne. Thèse de doctorat, Université de Genève, 2007, 196 pages. <http://archive-ouverte.unige.ch/unige:488>
160. Ozgen, M., Tiiret, M., Ozcan, S., Sancak, C. (1996) Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter and durum wheat genotypes. *Plant Breeding*, 115: 455- 458.
161. Passioura, J. (2004) Increasing crop productivity when water is scarce: From breeding to field management In: Proceeding of the 4th *International Crop science Congress*. New direction for a diverse planet. Brisbane, Australia. PP: 12, www.regional.org-au/au/cs.
162. Paterson, A. H., Tanksley, S. D., Sorrells, M. E. (1991) DNA markers in plant improvement. *Adv Agron*, 46: 39 - 90.
163. Perspective alimentaires : Analyse des marchés mondiaux. (2007) <http://www.fao.org/01/0/ah864f/ah864f00.htm>. (31.5.2008/13:28).
164. Pessarakli, M., Huber, J. T. (1991) Biomass production and protein synthesis by *Alfa alfa* under salt stress. *J. Plant. Nutrition*, 14: 283 - 293.

165. Platten, J.D., Cotsaftis, O., Berthomieu, P., Bohnert, H., Davenport, R.J., Fairbairn, D.J., Horie, T., Leigh, R.A., Lin, H.X., Luan, S., Mäser, P., Pantoja, O., Rodríguez-Navarro, A., Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., Sentenac, H., Uozumi, N., Véry, A.A., Zhu, J.K., Dennis, E.S., Tester, M. (2006) Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci*, 11: 372 - 374.
166. Rashid, H., Ghani, R. A., Chaudhry, Z., Naqvi, S. M. S., Quraishi, A. (2002) Effects of media, growth regulators and genotypes on callus induction and regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biotechnology*, 1: 46 - 54.
167. Rebetzke, G. J., Richards, R. A., Fettell, N. A., Long, M., Condon, A. G., Forrester, R. I., Botwright, T. L. (2007) Genotype increases in coleoptile's length improves stand establishment, vigor and grain yield of deep sown wheat. *Field Crops Research*, 100: 10 - 23.
168. Rebetzke, G.J., Condon, A.G., Richards, R.A., Farquhar, G.D. (2002) Selection for reduced carbon-isotope discrimination increases aerial biomass and grain yield of rainfed bread wheat. *Crop Science*, 42: 739 - 745
169. Rekika, D., Nachit, M.M., Araus, J.L., Monneveux, P. (1998) Effects of water deficit on photosynthesis rate and osmotic adjustment wheats. *Photosynthetica*, 32, 129 - 138.
170. Reynolds, M., Dreccer, F., Trethowan, R. (2007) Drought adaptive traits derived from wheat wild relatives and landraces. *J. Exp. Bot*, 58: 177- 186.
171. Rodriguez, M. L., Nakayasu, E. S., Oliveira, D. L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J. D., Almeida, I. C., Casadevall, A. (2008) Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus* informants contain protein components associated with virulence. *Eukaryot. Cell*, 7: 58-67.
172. Rodríguez-Navarro, A., Rubio, F. (2006) High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *J. Exp. Bot*, 57: 1149 - 1160.
173. Royo, A., Abió, D. (2003) Salt tolerance in durum wheat cultivars. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1: 27- 35.
174. Rus, A. M., Rios, S., Olmos, E., Santa-Cruz, A., Bolarin, M. C. (2000) Long term culture modifies the salt responses of callus lines of salt-tolerant and salt-sensitive tomato species. *J. Plant Physiol*, 157: 413 - 420.
175. Rus, A., Panoff, M., Perez-Alfocea, F., Bolarin, M. C. (1999) NaCl responses in tomato calli and whole plants. *J. Plant Physiol*, 155: 727- 733.
176. San Noeum, L. H. (1976) Haploïdes de (*Hordeum vulgare* L.), par culture *in vitro* d'ovaires non fécondés. *Ann Amélior Plantes*, 26 (4): 751-754.

177. Santa-Maria, G.E., Epstein, E. (2001) Potassium/sodium selectivity in wheat and the amphiploid cross wheat X *Lophopyrum elongatum*. *Plant Sci*, 160: 523 - 534.
178. Saqib, M., Zorb, C., Rengel, Z., Schubert, S. (2005) The expression of the endogenous vacuolar Na⁺/H⁺ antiporters in roots and shoots correlates positively with the salt tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci*, 169: 959- 965.
179. SAS Version 9.00. (2002) Institute Inc., Cary, NC, USA. Proprietary Software.
180. Schachtman, D. P., Bloom, A., Dvôrak, J. (1989) Salt-tolerance (*Triticum x Lophopyrum*), derivatives limit the accumulation of sodium and chloride ions under saline-stress. *Plant, cell and environment*, 12: 47- 55.
181. Schachtman, D.P., Schroeder, J.I. (1994) Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature*, 370: 655-658.
182. Seemann, J. R., Critchley, C. H. (1985) Effects of salt stress on the growth, Ion content, stomatal behaviour and photosynthesis capacity of a salt sensitive species (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta*, 164: 151-162.
183. Serraj, R., Sinclair, TR. (2002) Osmolyte acumulation: Can it really help increase crop under drought conditions? *Plant Cell Environ.* 25: 333 - 341
184. Serrano, R., Gaxiola, R. (1994) Microbial models and salt stress tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant. Sci*, 13: 121-138.
185. Shavrukov, Y., Gupta, N. K., Miyazaki, J., Baho, M. N., Chalmers, K. J., Tester, M., Langridge, P., Collins, N. C. (2010) HvNax3, a locus controlling shoot sodium exclusion derived from wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*). *Funct Integr Genomics*, 10: 277- 291.
186. Shen, B., Jensen, R. G., Bohnert, H. J. (1997) Increased tolerance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiology*, 113: 1177-1183.
187. Shi, H., Lee, B.-H., Wu, S.-J., Zhu, J.-K. (2003) Over expression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter improves salt tolerance in *Arabidopsis*. *Nature Biotechnology*, 21: 81- 85.
188. Shi, H., Zhu, J. K. (2002) SOS4, a pyridoxal kinase gene, is required for root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 129: 585 - 593.
189. Sibi, M. (1976) La notion de programme génétique chez les végétaux supérieurs : Aspect expérimental. Obtention de variant par culture de tissus sur (*Lactuca sativa* L.). Apparition de vigueur chez les croisements. *Ann Amélior Pantes*, 26 (4): 523-547.

190. Sibi, M. (1996) Vitro-variation, potentialités nouvelles et sélection *in vitro*. In: *AUPELF-UREF*. éd. *Biotechnologies Végétales*. Rennes. *CNED*, 7- 54.
191. Sibi, M., Fakiri, M. (1994) Gynogénèse chez des génotypes marocains d'orge (*Hordeum vulgare* L.). In: *AUPELF-UREF* éd. Quel avenir pour l'amélioration des plantes? Paris: *John Libbey Eurotext*, 337- 344.
192. Sibi, M., Kandil, M. (1993) Marqueurs biochimiques de la vitro-variation chez l'orge (*Hordeum Vulgare* L.). In: *AUPELF-UREF* éd. Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes? Paris: *John Libbey Eurotext*, 283 - 299.
193. Simmonds, N. W. (1991) Selection for local adaptation in a plant breeding programme, *Theor. Appl. Genet*, 82: 363-367.
194. Simmons, S. R., Oelke, E. A., Anderson, P. M. (1995) Growth and development guide for spring wheat. Site web: <http://www.extension.umn.edu/distribution/cropssystems/dc2547.html>
195. Singh, S., Singh, M. (2000) Genotypic basis of response to salinity stress in some crosses of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 115: 209 - 214.
196. Slafer, G. A., Andrade, F. H., Feingold S. E. (1990) Genetic improvement of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) in Argentina. Relationship between nitrogen and dry matter. *Euphytica*. 50: 63 - 71.
197. Slafer, G. A., Araus, J. L., Royoand, C., Garcia Del Moral, L. F. (2005) Promising eco-physiological traits for genetic improvement of cereal yields in Mediterranean environments, *Ann Applied Biol*, 146: 61-70.
198. Slama, F. (1982) Effet du chlorure de sodium sur la croissance et la nutrition minérale : Étude comparative de six espèces cultivées, thèse, faculté des sciences de Tunis, université Tunis-2, 214 p.
199. Sottosanto, J.B., Gelli, A., Blumwald, E. (2004) DNA array analyses of *Arabidopsis thaliana* lacking a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporters: impact of AtNHX1 on gene expression. *Plant J*, 40: 752 - 771.
200. Steppuhn, H., Van Genuchten, M. T., Grieve, C. M. (2005) Root-zone salinity. I. Selecting a product-yield index and response functions for crop tolerance. *Crop Science*, 45: 209 - 220.
201. Sutka, J. (2001) Genes for frost resistance in wheat. *Euphytica*, 119: 167-172.
202. Tammam, A. A., Abou Alhamad, M.F., Hemeda, M.M. (2008) Study of salt tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar Banysoif 1. *Aust. J. Crop Sci*, 1 (3): 115-125.

203. Tardieu, F. (2003) Virtual plants: modeling as a tool for the genomic of tolerance to water deficit, *Trends in Plant Sciences*, 8: 9 -14.
204. Tattini, M., Gucci, R., Coradeschi, M. A., Ponzio, C., Everard, J. D. (1995) Growth, gas exchange and ion content in *Olea europaea* plants during salinity and subsequent relief. *Physiologia Plantarum*, 95: 117 - 124.
205. Termatt, A., Munns, R. (1986) Whole plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol*, 13: 143 -160.
206. Tester, M., Davenport. R.J. (2003) Na⁺ transport and Na⁺ tolerance in higher plants. *Ann Bot (Lond)*, 91: 503 - 527.
207. Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, K., Wada, H. (1999) A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photo-autotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cell*, 11: 1195-1206.
208. Vadel, A.M. (1999) Evaluation écophysiologicalue de la tolérance aux contraintes abiotiques chez le triticale (X-Triticosecale Wittmack) et le sorgho (*Sorgho bicolor* L.). Doctorat de Biologie, Faculté des Sciences de Tunis, Univ. Tunis II.
209. Velegaleti, R. R., Kumar, D., Marsh, S., Reichenbach, N. G., Fleischman, D. E. (1990) Some approaches to rapid and presumptions diagnosis of chemicals stress in plants. In: Wang, W., Gorsuch, J. W., Lower, W. R., (éds.) Plants for toxicity assessment. *American Society for Testing and Material*; Philadelphia, pp. 333 - 345.
210. Venema, L., Quintero, F.J., Pardo, J.M., Donaire, J.P. (2002) The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ exchanger catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted vesicles. *J. Biol. Chem*, 277: 2413 - 2418.
211. Walker, R. R., Blackmore, D. H., Clingeleffer, P. R., Correll, R. L. (2002) Rootstock effects on salt tolerance of irrigated field-grown grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. 'Sultana') .I. Yield and vigour inter-relationships. *Aust. J. Grape Wine Res*, 8: 3 -15.
212. Witcombe, J. R., Hollington, P. A., Howarth, C. J., Reader, S., Steele, K. A. (2008) Breeding for abiotic stress for sustainable agriculture. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 363: 703 - 716.
213. Wu, Y.Y., Chen, G.D., Meng, Q.W., Zheng, C.C. (2004) The cotton GhNHX1 gene encoding a novel putative tonoplast Na⁺/H⁺ antiporters plays an important role in salt stress. *Plant Cell Physiol*, 45: 600- 607.
214. Wyn Jones, R. G., Gorham, J. (1983) Aspects of salt and drought tolerance in plants. In: *Genetic Engineering of Plants*, eds. Kosuge, T., Meredith, C. P., Hollaender, A. *Plenum*, New York. PP: 355- 370.

215. www.igc.org.uk/downloads/gmrsummary/gmrsumme.pdf
216. Wardlaw, J. F., Moncur, L. (1995) The response of wheat to high temperature following anthesis I: the rate and duration of grain filling. *Aust J. Plant. Physiol*, 22: 391 - 397.
217. Wardlaw, I. F. (2002) Interaction between drought and chronic high temperature during kernel filling in wheat in a controlled environment. *Ann. Bot*, 90: 469 - 476.
218. Wardlaw, I. F., Blumenthal, C., Larroque, O., Wrigley, C. W. (2003) Contrasting effects of chronic heat stress and heat shock on kernel weight and 1270 flour quality in wheat. *Funct. Plant Biol*, 29: 25-34.
219. Worland, A. J., Borner, A., Korzun, V., Li, W. M., Petrovic, S., Sayers, E. J. (1998) The influence of photoperiod genes to the adaptability of European winter wheat. *Euphytica*, 100: 385 - 394.
220. Xue, Z.Y., Zhi, D.Y., Xue, G.P., Zhang, H., Zhao, Y.X., Xia, G.M. (2004) Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporters gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na⁺. *Plant Sci*, 167: 849 – 859.
221. Yamaguchi, T., Blumwald, E. (2005) Developing salt tolerant crop plants: Challenges and opportunities. *Trends Plant Sci*, 12: 615- 620.
222. Yamaguchi, T., Fukada-Tanaka, S., Inagaki, Y., Saito, N., Yonekura-Sakakibara, K., Tanaka, Y., Kusumi, T., Iida, S. (2001) Genes encoding the vacuolar Na⁺/H⁺ exchanger and flower coloration. *Plant Cell Physiol*, 42,451- 61.
223. Yang, S. X., Zhao, Y. X., Zhang, Q., He, Y. K., Zhang, H., Hali, L. (2001) Mediated salt adaptation in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Res*, 11: 142-148.
224. Yang, T., Poovaiah, B. W. (2003) Calcium / Calmodulin-mediated signal network in plant. *Trends plant Science*, 8: 505-512.
225. Yeo, A. (1998) Molecular biology of salt tolerance in the context of Whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany*, 49: 915 - 929.
226. Yeo, A. R., Flowers, T. J. (1983) Varietal differences in the toxicity of sodium ions in rice leaves. *Physiol. Plant*, 59: 189-195.
227. Yokoi, S., Quintero, F. J., Cubero, B., Ruitz, M. T., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., Pardo, J. M. (2002) Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress responses. *Plant J*, 30 (5): 529 - 539.

228. Zalc, J. M., Wicr, H. B., Kidwell, K. K., Steber, C. M. (2004) Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 76: 277- 281.
229. Zeng, L., Shannon, M. C., Grieve, C. M. (2002) Evaluation of salt tolerance in rice genotypes by multiple agronomic parameters. *Euphytica*, 127: 235 - 245.
230. Zhang, H. X., Blumwald, E. (2001) Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnoogyl*, 19: 765-768.
231. Zhao, H., Dai, T. B., Jing, Q., Jiang, D., and Cao, W. X. (2007) Leaf senescence and grain filling affected by post-anthesis high temperatures in two different wheat cultivars. *Plant Growth Regul*, 51: 149-158.
232. Zhu, Z., Wu, H. (1979) *In vitro* production of haploid plantlets from the unpollinated ovaries of (*Triticum aestivum* L.) and (*Nicotiana tabacum* L.). *Acta Genet Sin*, 5: 181-183.
233. Zhu, J-K. (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Science*, 6: 66 - 71.
234. Zhu J.K. (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol*, 6: 41- 45.

Méthode de Trizol pour extraction d'ARN total

1. Tampon

- RNase Free.
- Azote liquide pour congeler rapidement l'échantillon.
- Eau DEPC : (DEPC = Diéthylpyrocarbonate) à 0,1% v/v.
- Trizol : de chez Invitrogen.
- Chloroforme, Isopropanol
- Ethanol : à 75% en Eau DEPC
- Tubes Eppendorf stériles
- Micropipettes à cônes stériles
- Centrifugeuse de paillasse à 4°C.
- Bain Marie : à 55°C ou 60°C.
- Cuves de spectrophotomètre nettoyées en HCl 1N et Eau DEPC.

2. Préparation des extraits à partir d'organes végétaux

Il est préférable de broyer les organes extemporanément dans le Trizol ou de les congeler dans un tube placé dans l'azote liquide et de les conserver à -80°C. Mettre dans TRIZOL l'organe congelé, le laissez se décongeler juste un peu puis broyer avec politron (mortier) et bien homogénéiser. On utilise 1 ml Trizol / 50 à 100 mg d'organe végétal. Centrifuger les cellules et enlever le surnageant avec prudence. Le culot repris dans 1 ml de Trizol / 5 à 10 x 10⁶ cellules végétales. À ce stade, après homogénéisation et avant l'ajout du Trizol, les échantillons peuvent être conservés à -80°C.

3. Phase d'extraction : Les conditions sont données pour 1 ml de Trizol.

On incube l'extrait végétal par Trizol pendant 5 min à Température ambiante, afin de permettre la dissociation complète de nucléoprotéines. On ajoute 0,2 ml de chloroforme et on ferme bien le tube et on homogénéise vigoureusement à la main pendant 15 secondes, puis on incube à température ambiante pendant 2 à 3 min. La centrifugation se fait en microfuge de paillasse pendant 15 min à 4°C à 12000g.

Après centrifugation, 2 phases se séparent, à savoir, une phase rouge (phénol/chloroforme) au dessous et une autre phase aqueuse, translucide au dessus qui est

l'ARN à environ 0,6 ml. Il faut faire attention, parce que les phases peuvent être inversées en raison de la concentration en ARN.

4. Précipitation

On fait transférer la phase aqueuse, translucide dans un tube neuf sans prendre la « galette ou débris au fond du tube», et on ajoute 0,5 ml d'Isopropanol. Après mélanger par retournement, on incube à température ambiante pendant 10 min. La centrifugation se fait à 12000g pendant 10-30 min à 4°C. L'ARN peut être invisible à ce stade, ce qui nécessite de faire attention en éliminant le surnageant.

5. Lavage

On enlève le surnageant et on lave le culot avec 1 ml d'éthanol à 75%, puis on fait vortexer et centrifuger à 12000g pendant 5 min à 4°C. Le culot d'ARN peut être conservé dans l'éthanol à 75% à 4°C pendant au moins une semaine, ou au moins un an à -20°C.

6. Dissolution du culot d'ARN

On enlève le surnageant et on fait sécher le culot légèrement à l'air libre puis on reprend dans 20-40 ml d'eau DEPC. On incube pendant 10 min à 55- 60°C et on fait vortexer légèrement et on conserve l'ARN à -80°C.

7. Dosage

On dilue 1 ml d'ARN dans 50 ml d'eau DEPC (le témoin est l'eau DEPC). Et on mesure la densité optique (DO à 260 et 280 nm). On fait par la suite le rapport 260/280 : $1,6 < \text{rapport} < 1,8$. On calcul : $1 \text{ U DO} = 40 \text{ mg/ml}$, en tenant compte de la dilution, soit $\text{DO} \times 40 \times \text{dilutions} \rightarrow \text{concentration de l'ARN en g/ml}$.

8. Tampon de dépôt d'ARN

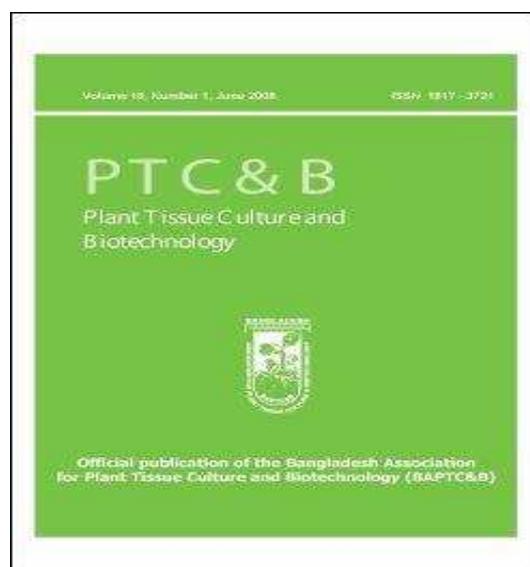
50 mg Xylène cyanol FF

50 mg Bleu de bromophénol

10 ml H₂O.

Liste des Articles Publiés Faisant l'Objet de Cette Thèse

Article 1



PTC&B

Plant Tissue Cult. & Biotech. **17**(1): 19-27, 2007 (June)

Effects of NaCl Stress on Callus Proliferation and Plant Regeneration from Mature Embryos of Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars Mahon-Demis and Hidhab

L. Benderradji, H. Bouzerzour¹, A. Djekoun², N. Yekhlef² and A. Benmahammed¹

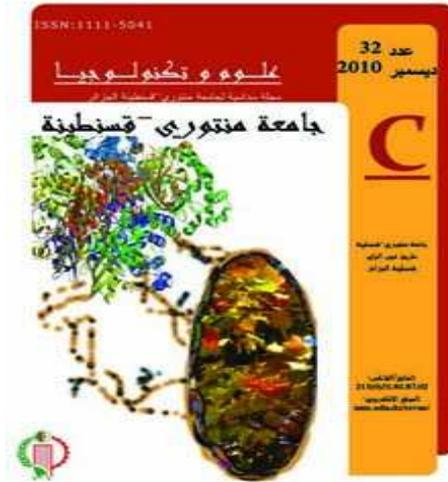
Biology Department, Faculty of Sciences, M'sila –University, Algeria

¹*Biology Department, Faculty of Sciences, Sétif University, Algeria.*

²*Genetics, Biochemistry and Plant Biotechnology Laboratory, Constantine University, Algeria.*

Author corresponding: Laid BENDERRADJI, Natural and Life Sciences *Department*, Faculty of Sciences, M'sila University. B P 166 ICHBELIA. **Tél:** 213+ (0)35 55 06 09 **Fax:** 213+ (0)35 55 04 04- Algeria. E-mai: benderradjilaid@yahoo.fr

Article 2



Sciences & Technologie C – N°32 décembre (2010), pp.23-30.

Etude des mécanismes de tolérance à la salinité chez deux variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) soumises à un stress salin

Reçu le 10-05-2010 – Accepté le 24-11-2010

L. BENDERRADJI¹, H. BOUZERZOUR², K. KELLOU¹, N. YKHLEF¹, F. BRINI³, K. MASMOUDI³, A. DJEKOUN¹

¹*Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales (LGBBV),
Université Mentouri - Constantine-Algérie*

²*Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Sétif - Algérie*

³*Laboratoire de Génétique Moléculaire des Plantes, Centre de Biotechnologies
de Sfax (CBS) –Tunisie*

***Author corresponding:** Pr. Abdelhamid DJEKOUN. Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales (LGBBV). Route de Ain El bey. Téléfax: +21331670182, Constantine- Algérie, Email:

djakoun@umc.edu.dz.

Article 3



March 2011, AJCS - [5(3) 2011]: Pages 233-241
1835-2707

ISSN:

*Sodium transport in the seedlings of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.)
genotypes showing contrasting salt stress tolerance*

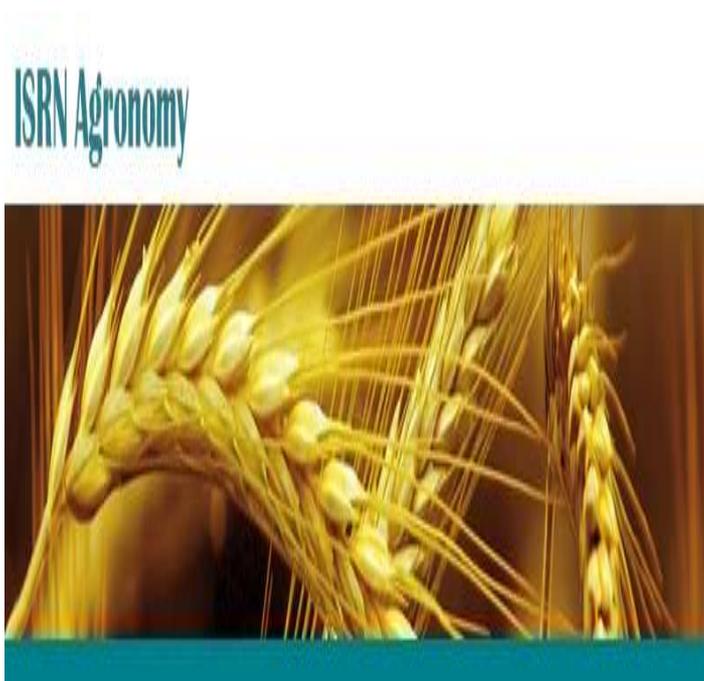
Laid Benderradji¹, Faiçal Brini^{2*}, Siwar Ben Amar², Kamel Kellou¹, Jalel
Azaza², Khaled Masmoudi², Hamenna Bouzerzour³ and Moez Hanin²

¹*Genetics, Biochemistry & Plant Biotechnology Laboratory, Constantine,
Algeria*

²*Plant Molecular Genetics Laboratory, Centre of Biotechnology of Sfax, Tunisia*

³*Biology Departments, Faculty of Sciences, Sétif University, Algeria*

***Author corresponding:** Faiçal BRINI, Ph.D, Plant Molecular Genetics
Laboratory, Centre of Biotechnology of Sfax, Tunisia, 7th Km, Sidi Mansour
street, PO Box “1177” 3018 Sfax-Tunisia. Fax: +21674875818. E-mail:
faical.brini@cbs.rnst.tn



Volume 2012, Article ID 367851, 8 pages ISRN Agronomy doi: 10. 5402/2012/367851

Callus Induction, Proliferation, and Plantlets Regeneration of Two Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes under Saline and Heat Stress Conditions

Laid Benderradji¹, Faïçal Brini², Kamel Kellou¹, Nadia Ykhlef¹, Abdelhamid Djekoun¹, Khaled Masmoudi² and Hamenna Bouzerzour³

¹*Genetic, Biochemistry & Plant Biotechnology Laboratory, Constantine University, Constantine 25000, Algeria*

²*Plant Protection & Improvement Laboratory, Centre of Biotechnology of Sfax, University of Sfax, 3018 Sfax, Tunisia*

³*Biology Department, Faculty of Sciences, Sétif University, Sétif 19000, Algeria.*

Nom & prénom: BENDERRADJI Laid **Date de soutenance :** 17/11/2013

Thème: Sélection *in vitro* pour la tolérance aux stress salin et thermique chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.)

Nature du diplôme: Doctorat en Sciences en Génétique et Amélioration des Plantes
option « Biotechnologies Végétales »

Résumé générale. Les résultats de l'étude qui porte sur la réponse des plantules de deux variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) Mahon-Demias (MD) et Hidhab (HD) au stress salin, mettent en relief l'effet négatif de la salinité sur le taux de la germination et indiquent la sensibilité de MD comparativement à HD. Le stress salin réduit significativement la longueur des racines et des épicotyles des deux variétés. MD accuse une plus grande réduction de la longueur des deux caractères que HD. A 200 mM NaCl, la surface foliaire de MD est réduite de 50.2% contre 24.8% pour HD. La variation des valeurs du potentiel hydrique et de la teneur relative en eau suggèrent que MD est plus sensible à la salinité que HD. Le suivi du contenu ionique indique que l'accumulation de l'ion Na^+ est plus importante dans la gaine de HD et le limbe de MD, avec peu de différence entre variétés pour le contenu des racines. HD met en jeu un mécanisme supplémentaire pour contrer la salinité en séquestrant préférentiellement plus de sodium dans la gaine que dans le limbe à l'inverse de la variété MD. HD présente une plus grande capacité à accumuler l'ion K^+ dans le limbe et au niveau des racines comparativement à MD. Le ratio K^+/Na^+ du limbe foliaire est plus élevé chez HD comparativement à MD. Ceci suggère que c'est surtout au niveau des feuilles que HD rétablit l'équilibre de son potentiel osmotique via l'accumulation de l'ion K^+ et minimise ainsi l'effet du stress osmotique engendré par NaCl. La capacité de HD à pomper de l'ion K^+ de la solution nutritive, puis de le véhiculer vers le limbe, représente donc une stratégie d'adaptation au stress salin à travers la régulation osmotique. Les résultats de l'étude qui porte sur les capacités embryogéniques et le pouvoir de régénération sous stress salin et thermique *in vitro* chez MD et HD en utilisant des embryons matures comme explants, montrent que MD répond mieux à la sélection *in vitro* que HD. MD présente un taux d'induction des cals plus élevé, avec une meilleure prolifération des cals induits avec cependant moins d'embryons produits par cal induit. Le taux de régénération de plantules à partir des cals proliférant était nul pour HD et très faible pour MD. Les résultats obtenus suggèrent la possibilité d'utiliser la technique *in vitro* pour la sélection vis-à-vis des stress abiotiques. Les résultats de l'étude de l'analyse de l'expression des cinq gènes candidats de la tolérance à la salinité indiquent que HKT1;5 et HKT2;2 s'expriment dans les racines, mais pas dans les gaines et les limbes, avec une meilleure expression du gène HKT1;5 dans les racines de HD. Ceci montre le rôle plus actif du gène HKT1;5 chez la variété tolérante HD. L'expression de l'antiporteur vacuolaire Na^+/H^+ TNHX-1, dans les racines, les gaines et les limbes est plus élevée chez HD que chez MD. Les racines et gaines des deux génotypes accumulent plus de transcrits de la pyrophosphatase vacuolaire TVP1 que les limbes foliaires. La similitude du type d'expression des gènes TNHX1 et TVP1, notée chez MD et HD, suggère que la compartimentation vacuolaire agit avec une même efficacité chez les deux génotypes. Plus de transcrits du gène TaSOS-1 s'accumulent dans les racines et gaines de MD comparativement à HD, suggérant qu'en plus d'une meilleure efficacité de rétention de l'ion Na^+ dans les gaines, la variété HD évite l'accumulation de l'ion Na^+ dans le limbe foliaire en activant son efflux via une expression élevée du gène SOS1 dans ce compartiment. Les résultats indiquent que la tolérance à la salinité chez le blé tendre semble liée à la capacité d'éviter l'accumulation à des niveaux toxiques de l'ion Na^+ , associée à une capacité élevée d'osmorégulation et/ou au maintien d'un niveau acceptable de l'ion K^+ , spécialement dans le limbe foliaire. Cette information est utile pour la sélection du matériel végétal dans les programmes d'amélioration des céréales. (*Triticum aestivum* L.), stress salin, stress thermique, germination, surface foliaire, embryons matures, régénération, sélection *in vitro*, transporteurs d'ions, expression.

Laboratoire de recherche: Lab/Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales_ Université Constantine 1

Membres de jury

Président:	Pr. A. DJEKOUN	Université de Constantine 1
Rapporteur:	Pr. H. BOUZERZOUR	Université de Sétif 1
Examineurs:	Pr. N. YKHLEF	Université de Constantine 1
	Pr. A. BENMAHAMMED	Université de Sétif 1
	Dr. F. BRINI	Centre de Biotechnologie de Sfax-Tunisie
Invité	Pr. K. MASMOUDI	Université de Dubaï (ICBA)-United Arabes Emérates