

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
Scientifique
Université Frères MENTOURI Constantine



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Ecologie,

N° d'ordre :
Série :

Thèse Présentée en Vue de l'Obtention de Diplôme de Doctorat
3ème cycle
Option : « Biotechnologie et Génomique Végétales »
Thème

**Embryogénèse Somatique, Variations Somaclonales et
Tolérance à la Salinité chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.).
(Analyse Génotypique et Moléculaire)**

Présenté par : Mme BENABDELHAFID Zoheira

Devant le jury

Président :

Pr. Nadia.YKHLEF Professeur Université des Frères Mentouri

Constantine

Rapporteur :

Pr. Abdelhamid.DJEKOUN Professeur Université des Frères Mentouri

Constantine

Examineurs :

Pr. Hemenna. BOUZERZOUR Professeur Université Ferhat Abbas

Sétif

Pr. M^{ed}. Abdelhafid HAMIDECHI Professeur Université des Frères Mentouri

Constantine

Dr. Abdelkader. BENBELKACEM Directeur de recherche INRAA

Constantine

Dr. Laid. BENDERRADJI MCA université M^{ed} Boudiaf

M'Sila

Année Universitaire: 2015/2016



Remerciements

Ces remerciements s'adressent à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à l'aboutissement de mon projet de thèse.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance au Professeur DJEKOUN Abdelhamid d'avoir encadré ce travail et de m'avoir guidée dans mes travaux de recherche, conseillé, soutenue et aidée pour la réalisation de cette thèse.

Je remercie très vivement le Pr YKHLLEF Nadia d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. De même je remercie le Pr Hemenna BOUZERZOUR, ainsi que Docteur Laid BENDARRADJI qui ont bien voulu se déplacer et faire partie des membres du jury, je remercie également Dr Abdelkader BENBELKACEM d'être parmi les examinateurs non seulement pour sa gentillesse, mais aussi pour sa grande disponibilité et son aide précieuse. Mes remerciements s'adressent également au Pr Abdelhafid HAMIDECHI de faire partie des membres du jury.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Mr BELBEKRI Nadir l'ingénieur de laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologie végétale (GBBV), qui n'a dénié aucun effort pour l'aboutissement de mon travail. Sans oublier la sympathique et énergique Ryma.

J'exprime ma reconnaissance à tous les enseignants que j'ai pu avoir durant mon cursus universitaire entre-autre Mmes et Mrs: MOUAGAL Rym Tinhinane, BETINA Soumia, KACHIDE Maya, KACEM Sandra, KELLOU Kamel et BAZIZ Karim.

Je dis : Mercie d'exister a mon amie de cœur Chourouk, sans oublier mes collègues doctorantes : Karima, Mouna, Adra, Amina, Wassila, Fathia, Myou, et Soumia. Un petit clin d'œil A Mahmoud et seif.

Je voudrais aussi exprimer toute mon affection pour mes sœurs : Nariméne, Sorrow, Chahinez. Mes frères : M^{ed} Larbi et Faiz eddine, à mes nièces : Amira, Djihene, Houyem, Dounia et Anaiss. Mes neveux : Aymen, Abdelmouiz, et M^{ed} Nazim.

J'exprime ma profonde sympathie pour ma belle-famille ; à leur tête Da Said et la Safia ainsi que : Yacine, Choubaila, Samy et Sara. Riad, Sofia, Abdeldjalil, Lina, Sirine et Yasmine. Et enfin ; Ramy, Doudou, Nazim, Med Anis et Rym.

Et en fin, je remercie tout particulièrement Ramzi ; Mon mari, pour sa grande patience et pour son soutien incontestable.

Finalement je remercie le bon dieu pour m'avoir donné la santé et un beau poupon, Mon fils Bey.



Dédicaces

A la mémoire de mon père ; M^{ed} Salahi.

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi papa.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit des sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma Mère ; Dounia Zed.

Tu m'as porté avant le monde et me porte encore chaque seconde.

Quand je me blesse tu es douceur, comme une caresse dans l'existence.

Quand j'abandonne tu deviens lionne et tu me relève avec patience.

Tu es dans ce monde infernale une étoile parmi les étoiles.

Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

Liste des Abréviations et Acronymes

Liste des Abréviations et Acronymes :

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

BET: Bromure d'Ethilium

bp : Paire de Bases

Dw : Dry Weight

Fw : Fresh Weight.

ICARDA International Center for Agricultural Research in Dry Areas

ITGC Institut Technique des Grandes Cultures

Kin: Kinetine

MS/2: Murashigue et Skoog dilué de moitié

MS: Murashigue et Skoog 1962

Mt : Million de Tonne.

SE : Standard Erreur

TC : Taux de croissance

Tris: Tris (Hydroxyméthyl) Aminométhane

W0: Poids frais des cals après les 12 semaines de culture

Wc : Water Content

Wf : Poids frais des cals après les 16 semaines de stabilisation

NPRC : Nombre de Plantules Régénérées par Cal.

Liste des Figures

Figure 1 : Production et consommation du blé dur dans le monde.....	5
Figure 2 : Evolution de la production du blé dur en Algerie.....	6
Figure 3 : Principe de la technique RAPD.....	28
Figure.4 : Réponses des six variétés de blé dur à la callogénèse.....	40
Figure. 5 : Surfaces des cals des six variétés de blé dur.....	42
Figure.6 : Poids des cals des six variétés de blé dur.....	44
Figure 7 : Taux de cals embryogènes induits sur milieu MS+ 3.5mg/l 2.4-D après 12 semaines de culture.....	47
Figure.8 : Cals embryogènes issus des six variétés de blé dur.....	48
Figure.9 : Cals non embryogènes issus des six variétés de blé dur.....	49
Figure. 10 : Régénération <i>in vitro</i> obtenue des six variétés de blé dur sur milieu MS additionnée de trois combinaisons hormonales différentes.....	52
Figure. 11 : Taux de régénération des six variétés de blé dur cultivés sur milieu MS + Combinaison hormonale 3.....	53
Figure.12 : Relation entre Le Taux d'induction de cal et le Taux de cals embryogène.....	55
Figure.13 : Relation entre le taux d'induction de cal et le taux de régénération.....	56
Figure.14 : Relation entre le taux de cals embryogène et le taux de régénération.....	56
Figure. 15 : Taux de croissance (TC) des cals issues des six variétés de blé dur en présence et absence d'un stress progressif de NaCl.....	67
Figure. 16 : Cals obtenus après passage par un stress progressif de NaCl et une étape de stabilisation.....	68
Figure. 17 : Teneur en eau (WC) de cals issues des six variétés de blé dur en présence et absence d'un stress progressif de NaCl.....	71
Figure. 18 : Teneur en K ⁺ des cals issus des six variétés de blé dur en présence et absence d'un stress progressif de NaCl.....	72
Figure. 19 : Teneur en Na ⁺ des cals issus des six variétés de blé dur en présence et absence d'un stress progressif de NaCl.....	75
Figure. 20 : Réponses négativement corrélées des ions Na ⁺ et K ⁺ chez des cals issus d'embryons matures des six variétés de blé dur.....	75
Figure. 21 : comparaison du taux d'induction de la callogénèse issus d'embryons matures cultivés en absence et en présence (4, 16g/l) de NaCl.....	78
Figure. 22 : Comparaison du taux d'induction de cals embryogènes (embryons somatiques) issus d'embryons matures cultivés en absence et en présence (4, 16g/l) de	

Liste des Figures

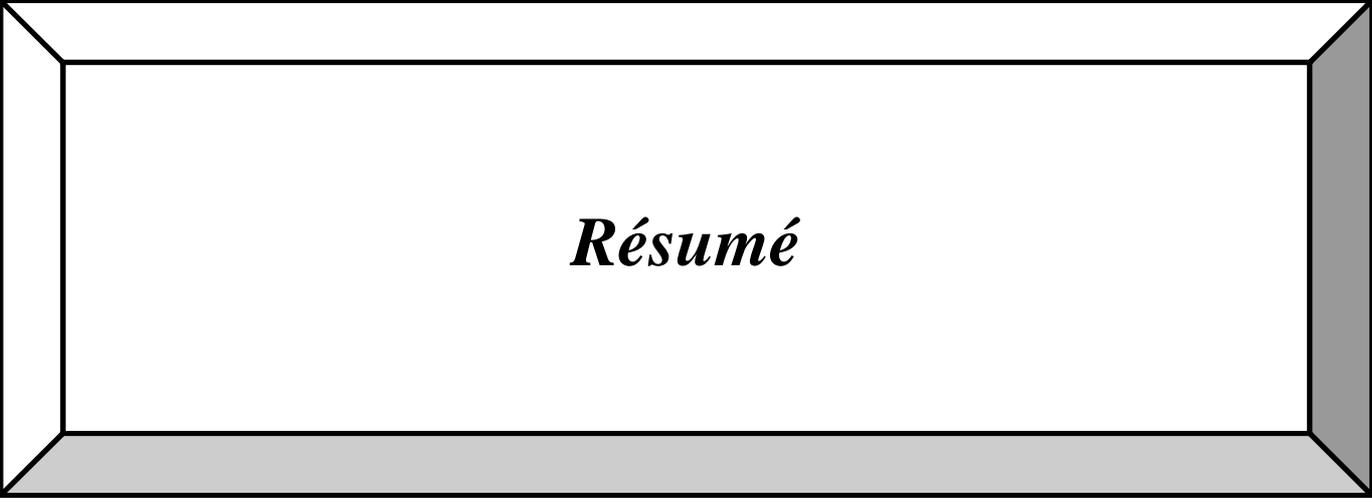
NaCl.....	81
<i>Figure. 23:</i> Comparaison du taux de régénération de plantes par embryogénèse somatique à partir d'embryons matures des six variétés de blé dur cultivées en absence et en présence de (4, 16g/l) NaCl.....	83
<i>Figure.24:</i> Régénération des six variétés de blé dur.....	85
<i>Figure 25 :</i> Produits RAPD obtenus par une amplification PCR et neufs différentes amorces (OPC-05, OPG-09, OPE-13, OPF-20, OPA-17, OPO-05, OPO-06, OPO-03, B-19) d'ADN isolées à partir des six génotypes de blé dur régénérés sous différentes conditions de culture.....	93

Liste des Tableaux

Tableau.1 : Origine des six variétés de blé dur.....	31
Tableau.2 : Temps nécessaire à l'induction de la callogénèse des six variétés de blé dur.....	36
Tableau.3 : Taux de la callogénèse obtenus durant trois essais <i>in vitro</i> des six variétés de blé dur.....	40
Tableau.4 : Moyennes et écartypes des résultats de la callogénèse obtenus <i>in vitro</i> des six variétés de blé dur.....	40
Tableau.5 : Surfaces des cals de six variétés de blé dur calculé selon la loi de Dale et Deambergio, 1979.....	41
Tableau.6 : Moyennes, écartypes et groupes homogènes des surfaces de cals des six variétés de blé dur.....	41
Tableau.7 : Poids des cals de six variétés de blé dur.....	43
Tableau.8 : Moyennes, écartypes et groupes homogènes des poids des cals des six variétés de blé dur.....	44
Tableau.9 : Taux de cals embryogènes induits chez les six variétés de blé dur.....	46
Tableau.10 : Moyennes, écartypes et groupes homogènes des poids des cals des six variétés de blé dur.....	46
Tableau.11 : Réponses des six variétés de blé dur à la régénération sur milieu MS additionné de 3 combinaisons hormonales différentes.....	50
Tableau.12 : Moyennes, écartypes et groupes homogènes des taux de régénération des six variétés de blé dur cultivé sur MS + combinaison hormonale 3.....	53
Tableau. 13 : Nombre de plantes régénérées par cal pour chaque variété de blé dur.....	54
Tableau.14 : Matrice de corrélations entre différents paramètres étudiés lors de l'étude de l'aptitude <i>in vitro</i> des six variétés de blé dur	56
Tableau. 15 : Composition des milieux de culture pour l'induction de l'embryogénèse somatique en présence de différents niveaux de stress salin.....	63
Tableau. 16 : Moyennes et groupes homogènes du taux de Croissance (TC) en présence et absence de stress progressif chez les six variétés de blé dur.....	67
Tableau. 17 : Moyennes et groupes homogènes de la teneur en eau (WC) en présence et absence de stress progressif chez les six variétés de blé dur.....	71
Tableau. 18 : Moyennes et groupes homogènes de la teneur K^+ en présence et absence de stress progressif chez les six variétés de blé dur.....	72
Tableau. 19 : Moyennes et groupes homogènes de la teneur Na^+ en présence et absence de stress progressif chez les six variétés de blé dur.....	74

Liste des Tableaux

Tableau 20: Moyennes et groupes homogènes de l'influence de différents niveaux de NaCl sur le taux d'induction de la callogénèse.....	78
Tableau. 21: Moyennes et groupes homogènes de l'influence de différents niveaux de NaCl sur le taux d'induction d'embryons somatiques.....	81
Tableau. 22: Moyennes et groupes homogènes de l'influence de différents niveaux de NaCl sur le taux de régénération de plantes à partir d'embryons matures issus des six variétés de blé dur.....	83
Tableau. 23: Nombre de plantes régénérées par embryogénèse somatique à partir d'embryons matures cultivés en absence et en présence de (4 et 16g/l) de NaCl issus des six variétés de blé dur.....	84
Tableau. 24 : Code des amorces RAPD utilisées.	90
Tableau.25: Taux de polymorphisme des six variétés de blé dur obtenus avec les neuf amorces RAPD : OPC-05, OPG-09, OPO-13, OPF-20, OPA-17, OPO-05, OPO-06, OPO-03 and B-19.....	94



Résumé

Résumé

Résumé :

L'objectif principal de ce travail est de surmonter l'effet du stress salin grâce à différentes techniques et approches de biotechnologie, lesquelles sont utilisées pour améliorer le comportement des différentes variétés de blé dur et d'en sélectionner les plus performantes. La voie de l'embryogenèse somatique est actuellement intégrée dans de nombreux schémas de sélection puisqu'elle permet de diminuer sensiblement la durée des cycles d'amélioration. Un développement d'embryons somatiques est obtenu après une mise en culture de six variétés de blé dur : (Waha, Guemgoum Rkhem, Beliouni, Adnan-2, Beni mestina et Adnan-1) sur un milieu nutritif additionné de 3.5mg/l de 2.4-D. La sélection des variétés tolérantes vis-à-vis du stress salin fut réalisée par l'addition d'un agent sélectif : le NaCl. La présente étude s'est basée sur l'addition de différentes concentrations de NaCl (0, 4, 8, 12, 16g/l) au milieu de culture afin d'étudier l'effet du stress salin sur le développement de l'embryogénèse somatique. L'introduction du NaCl au milieu de régénération fut réalisée par une addition successive de différentes concentrations progressives, afin de déterminer le taux de croissance des cals, la teneur en eau, la teneur en K^+ , la teneur en Na^+ et le rapport K^+/Na^+ en présence et en absence du stress. De plus, l'application du stress salin par addition directe de différentes concentrations de NaCl, lors de la phase d'induction de la callogénèse fut exploitée afin de déterminer l'influence du stress sur le taux de la callogénèse, le taux de germination, le taux de cals embryogènes, le taux de régénération et le nombre moyen de plantes régénérées par cal. La régénération *in vitro* s'est avérée susceptible au développement de variations somaclonales, car lors de la callogénèse, les cellules somatiques doivent s'adapter au milieu de culture et génèrent de nouveaux changements dans le génome. La mise en évidence de ces variations est généralement effectuée grâce à des techniques de révélation par des méthodes moléculaires. Lors de la présente étude, l'ADN extrait à partir des plantes régénérées fut soumis à une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ayant permis, à partir de cette ADN matrice et en présence de 9 amorces RAPD arbitraires, d'obtenir un taux de polymorphisme important ; ce qui indique la présence de variations somaclonales. L'analyse des profils RAPD a révélé que la présence de variations somaclonales peut être le résultat de nombreux cycles de culture, de l'application d'un stress sévère ainsi que des différentes réponses des génotypes de blé dur à la régénération *in vitro*.

Mots clés : Blé dur, stress salin, embryon mature, embryogénèse somatique, régénération *in vitro*, variations somaclonales, RAPD, polymorphisme.

Abstract

Abstract :

The main objective of this work is to overcome the effect of salt stress on wheat through different techniques and biotechnology approaches, which are used to improve the behavior of different varieties of durum wheat and to select the best performing. Somatic embryogenesis is currently integrated into many selection schemes since it can significantly reduce the length of improvement cycles. Development of somatic embryos was obtained after cultivation of six varieties of durum wheat (Waha, GuemGoum Rkhem, Beliouni Adnan-2, Beni and Adnan mestina-1) on a nutrient medium supplemented with 3.5mg / l 2.4-D. The selection of tolerant varieties to the salt stress was achieved by the addition of a selective agent: NaCl. This study is based on the addition of different concentrations of NaCl (0, 4, 8, 12, 16 g/l) to the medium to study the salt stress effect on the development of somatic embryogenesis. NaCl introduced to the regeneration medium was carried out by a sequential addition of different graded concentrations to determine the callus growth rate, the water content, the content of K⁺, Na⁺ contents and the K⁺ / Na⁺ ratio in the presence or absence of stress. Moreover, the application of salt stress through direct addition of different NaCl concentrations during the induction phase of callogenesis was exploited to determine the influence of stress on the rate of callogenesis, the germination rate, the rate of embryogenic calli, the regeneration rate and the average number of regenerated plants per callus. *in vitro* regeneration has proved susceptibility to the development of somaclonal variation, because when callogenesis, somatic cells must be adapted to the culture medium and generate new changes in the genome. The detection of these variations is generally performed through revelation techniques by molecular methods. In this study, DNA extracted from the regenerated plants was subjected to polymerase chain reaction (PCR) that allowed, from this template DNA in the presence of arbitrary 9 RAPD primers to obtain a degree of polymorphism indicating the presence of somaclonal variation. Analysis of RAPD profiles revealed that the presence of somaclonal variation may be the result of many crop cycles, application of a severe stress weans and different responses of durum wheat genotypes for cultivation *in vitro* regeneration.

Keywords: Durum wheat, salt stress, mature embryo, somatic embryogenesis, *in vitro* regeneration, somaclonal variation, RAPD, polymorphism.

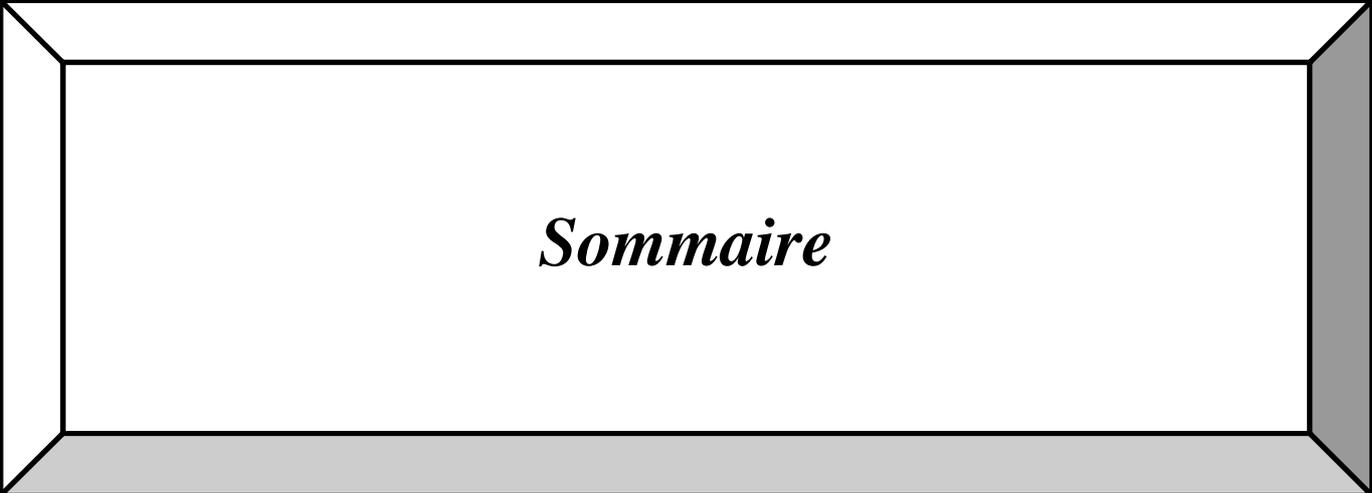
ملخص

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو التغلب على تأثير الإجهاد الملحي من خلال تقنيات مختلفة ومناهج التكنولوجيا الحيوية ، والتي تستخدم تحسين سلوك أصناف مختلفة من قمح قاسي وتحديد الأفضل .

تم دمج طريق تطور جنيني جسدية جأيا في العديد من مخططات تيار لأنها يمكن أن تقلل إلى حد كبير طول دورات تحسين .تم الحصول على تطوير الأجنة الجسمية بعد زراعة ستة أصناف من قمح قاسي (واحة . قم قم . ام . بليونى . عدنان-2 . بني مستينة . عدنان-1) في وسط غذائي مزود ب 3.5مغ/ل من هرمون نمو 2.4-د.

وقد حقق الإجهاد الملحي عن طريق إضافة وكيل الانتقائي : كلوريد صوديوم . وتستند هذه دراسة على إضافة تركيزات مختلفة من كلوريد صوديوم (0، 4 ، 8 ، 12 ، 16 مغ/تر) إلى مستنبت دراسة تأثير الإجهاد الملحي على تطوير مرحلة تطور جنيني جسد . وجرى إدخال كلوريد صوديوم إلى وسيلة تجديد بها إضافة متتابعة من تركيزات متدرجة مختلفة تحديد معدل نمو الكاوس و محتواه المائي ، في وجود و غياب توتر . وعلاوة Na^+/K^+ و محتوى نسبة Na^+ ، و صوديوم K^+ ومحتوى بوتاسيوم على ذلك تم استغلالها ، بتطبيق الإجهاد الملحي من خلال الإضافة مباشرة تركيزات مختلفة من كلوريد صوديوم . لال مرحلة الابتدائية نمو الكاوس تحديد تأثير الإجهاد على معدل نمو الكاوسات ، ومعدل الإنبات ، و معدل التخلي ، و معدل تشكل مرفوجي و متوسط عدد نباتات متشكلة مرفوجيا في كل كاوس . تشكل مرفوجي عند زراعة في زجاج أثبت حساسية بعد تعرضه تطوير تلافات جينية ، لأنه عند نمو الكاوس يجب على خلايا جسدية ان تتكيف مع وسط زراعي و توجد تغيرات جديدة في جينوم . يتم إجراء كشف عن هذه التلافات بشكل عام من خلال تقنيات استكشافية و الأساليب الجزيئية . في هذه الدراسة تم ضاع حمض نووي مستخرج من نباتات مشكلة مرفوجيا تفاعل تبلمر متسلسل التي سمحت انطلاقا من هذا حمض نووي و بوجود الحصول على معدل هام تعدد الاشكال و الذي يشير إلى وجود تلافات جينية . RAPD 9 تيارية كشف تحليل الأوضاع أن وجود تباين قد يكون نتيجة لعديد من دورات محاصيل ، و تطبيق ضغط و الاستجابات مختلفة من تراكيب وراثية لقمح قاسي لزراعة مشكلة مرفوجيا في زجاج .

كلمات بحث: قمح قاسي ، الإجهاد الملحي ، جنين ناضجة ، مرحلة تطور جنيني جسدية ، RAPD ، تشكل مرفوجي لزراعة في زجاج ، تعدد الاشكال



Sommaire

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Résumé

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations et acronymes

INTRODUCTION GENERALE 1

Chapitre I: Revue Bibliographique

I. La culture du blé dur	4
a) Dans le monde	4
b) En Algérie	5
II. Classification du blé dur (<i>Triticum durum</i> Desf)	6
III. Influence des contraintes abiotiques sur le blé dur	7
III.1. Effet du stress hydrique	7
III.2 Effet du stress thermique	9
III.3 Effet du stress salin	10
a) Rôle du K ⁺	11
b) Rôle du Na ⁺	12
c) Interactions des transporteurs de K ⁺ et Na ⁺ et adaptation au stress salin	13
IV. La sélection et la création in vitro de variétés de blé dur résistantes aux différents stress abiotiques	14
1) L'haplodiploïdisation	14
2) Les hybridations et le sauvetage d'embryons immatures	15
3) Les vitrovariations et la sélection in vitro	16
V. L'embryogénèse somatique chez les végétaux	16
1) Transition de cellules somatiques en cellules embryogènes	17
i. Le remodelage de la chromatine	18
ii. La position cellulaire	18
iii. L'action des hormones	18
2) Les principales étapes de l'embryogénèse somatique	18
3) Origine cellulaire de l'embryon somatique	19
4) Régénération de plantules après une embryogénèse somatique	21
VI. Variations Somaclonales	21
1) Définition	23
2) Caractéristiques	23
3) Facteurs accentuons la variation somaclonale	25
4) Mise en évidence des variations somaclonales par marqueurs moléculaire.	26
a) Définition du polymorphisme génétique	27
b) Principe de la technique RAPD	28

Chapitre II: Etude de l'aptitude des six variétés de Blé dur à la culture In Vitro

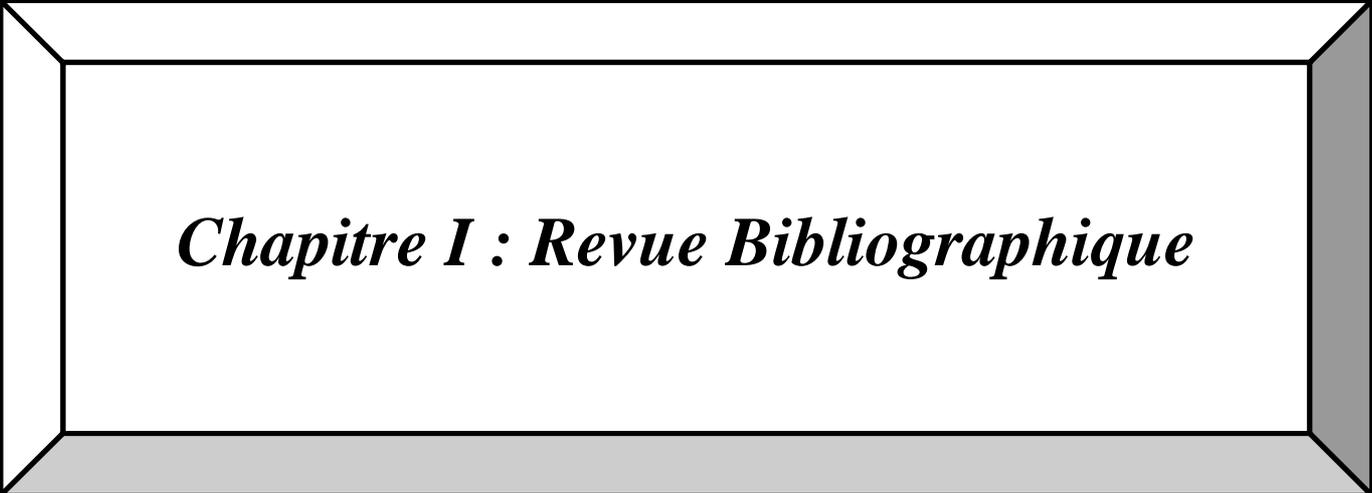
I. Introduction	29
II. Matériel et méthodes	30
1. Matériels végétal	30
2. Mise en place pour l'induction d'une embryogénèse somatique	31

Sommaire

a) Préparation et stérilisation du milieu de culture	31
b) Stérilisation des graines	33
c) Stérilisation du matériel utilisé	34
d) L'ensemencement	34
e) Conditions de culture	35
f) Durée et nombre de repiquage	35
3. Paramètres étudiés	35
4. Etudes Statistique	36
III. Résultats et Discussion	36
a) Temps d'induction de la callogénèse	36
b) Taux de la callogénèse	37
c) Surface des cals	41
d) Poids des cals	42
e) Taux d'embryons somatique	44
f) Taux de la régénération	50
g) Nombre moyen de plantules régénérés par cals	54
h) Etude de corrélation entre les paramètres étudiés	55
IV. Conclusion	57
Chapitre III: Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.	
I. Introduction	59
II. Matériels et Méthodes	60
1. Matériel Végétal	60
2. Mise en place pour l'induction d'une embryogénèse somatique et la régénération in vitro en présence de NaCl	60
A. Application du stress salin par addition successives de différentes concentrations progressives de NaCl	61
B. Application du stress salin par addition direct de différentes concentrations de NaCl lors de la phase d'induction de la callogénèse.	63
3. Etude Statistique	65
III. Résultats et discussions :	66
A. Application du stress salin par addition successives de différentes concentrations progressives de NaCl	66
1) Détermination de la croissance des cals (Tc)	66
2) Mesure de la teneur en eau (Wc)	70
3) Dosages des ions K ⁺ et Na ⁺	72
B. Application du stress salin par addition direct de différentes concentrations de NaCl lors de la phase d'induction de la callogénèse.	76
1) Influence de différents niveaux de stress sur l'induction de la callogénèse	76
2) Influence de différents niveaux de stress sur la production d'embryons somatiques	78
3) Influence de différents niveaux de stress sur le taux de régénération	81
4) Influence de différents niveaux de stress sur le nombre de plantes régénérées par cals.	83
IV. Conclusion	85

Sommaire

Chapitre IV: Mise En Evidence De La Variation Somaclonale Par Marqueurs Moléculaires	
I. Introduction	87
II. Matériels et Méthodes	89
1. Matériel végétal	89
2. Mise en place pour la réalisation d'une RAPD	89
III. Résultats et discussion	91
IV. Conclusion	96
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	98
VALORISATION SCIENTIFIQUES	100
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	119
ANNEXES	139



Chapitre I : Revue Bibliographique

I. La culture du blé dur :

a) Dans le monde

La domestication du blé a commencé il y a plus de 8000 à 10000 ans, et représente une alimentation stable pour toute l'humanité. Il représente toujours à nos jours une source principale en alimentation. Le blé dur est utilisé par plus de 200 Millions de consommateurs, 100% de l'utilisation du blé dur est humaine. L'usage en alimentation du blé dur est spécialement concentré en méditerranée (Algérie, Maroc, Tunisie, Turquie, Italie,...), pour la fabrication de couscous, Pains, Pâtisseries, et différents types de cuisines régionales (Lebeau, 2015). La production mondiale est estimée de 2008 à 2012 entre 35 et 41 Millions de tonne avec une production de 38Millions de tonnes en 2013 et de 32.8 Mt en 2014 (Satger, 2015).

La production mondiale ne cesse de diminuer (FAO, 2015). Le Canada qui représente le premier pays producteur mondial avec 60% de l'approvisionnement, et premier pays exportateur. Sa production a baissé. Entre la campagne 2013-2014 le taux de production a baissé de - 26% (selon CIC : Conseil International des Céréales) après avoir doublé sur trois ans, le taux de production au Mexique a diminué de 2%, ainsi qu'un taux de production de - 15 % enregistré en France. En Syrie le taux de production a baissé de 50%. Plusieurs causes rentrent en jeux, en ce qui concerne le Canada, la France et le Mexique, la baisse de production est causée par des troubles climatiques tels que le réchauffement climatique ainsi qu'une pluviométrie instable, pour la Syrie ; les conditions climatiques et les conditions politiques du pays ont eu un fort impact sur la diminution de production (AgriMer, 2015). Ces perturbations de production dans le monde peuvent causer un déséquilibre dans l'alimentation humaine. Les principales causes sont dues aussi à d'autres facteurs humains.

Le coût d'achat du blé dur a fortement augmenté en 2014/15. Le blé dur coûtait 247 €/t début novembre 2013, au 18 novembre 2014, il valait 451 €/t, soit + 75%. À la différence de ce qui s'était passé en 2007/08 ou en 2010/11, on a constaté, en 2014/15, que le blé dur, et le blé dur seul, était sous tension. Cette crise concerné le marché mondial du blé dur et a trouvé ses sources à la fois dans des éléments structurels et dans des aspects plus conjoncturels. (Anonyme,2015).

Chapitre I : Revue Bibliographique

✓ Les raisons structurelles tiennent

- à un marché qui peine à trouver son équilibre entre l'offre et la demande ;
- à la disparition du monopole à l'exportation du Canadian Wheat Board et au maintien parallèle d'une part de marché considérable du Canada sur marché mondial du blé dur ;
- à la forte réduction des surfaces dédiées au blé dur dans le monde ;
- à l'absence d'instrument de couverture à terme pour les opérateurs de marché.

✓ Les raisons conjoncturelles tiennent

- à un recul de la production récoltée ;
- à une consommation supérieure à la production ;
- à un commerce mondial dynamique ;
- à une chute drastique des stocks.

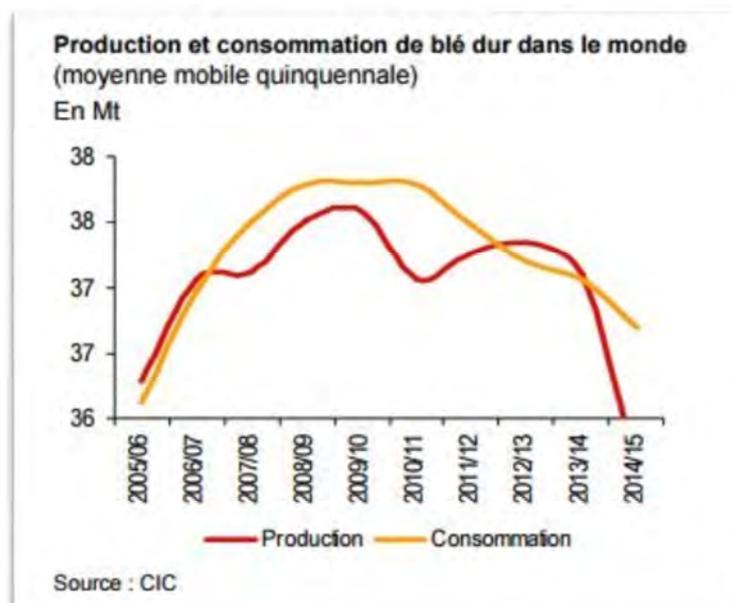


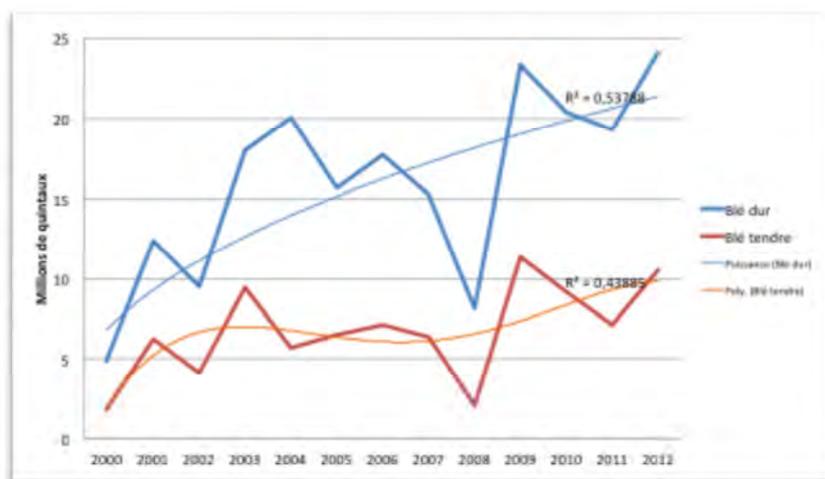
Figure 1 : Production et consommation du blé dur dans le monde.
Source : CIC : Conseil internationale de céréale. 2015

b) En Algérie :

La base principale de l'alimentation en Algérie repose sur la consommation des produits dérivés du blé dur à base de semoule tels que : couscous, galette, pâtes alimentaires (Djermoun, 2009 ; Lebeau, 2014). le blé dur (*Triticum durum Desf*), est la première céréale

Chapitre I : Revue Bibliographique

cultivée dans le pays. Elle occupe annuellement plus d'un million d'hectares. Cependant, la production nationale en blé dur est encore faibles, elle ne couvre que 20 à 25 % des besoins du pays, le reste étant importé (Anonyme, 2008), ce qui la classe parmi les trois plus grands pays importateurs dans le monde avec l'Italie et le Maroc. (L'Herbier, 2014). La production du blé dur de 2013/2014 a reculé de 30 % par rapport à l'année précédente qui s'établie à 34 millions de quintaux contre 49.1 millions de quintaux durant 2012/2013. Ce recule ne cesse de s'accroître depuis les rendements records lors de la campagne 2012/2013 et qui est liée à une faible pluviométrie ; ce qui oblige l'Algérie à importer du blé dur pour combler sa demande. En 2014, l'Algérie à lancé un appel d'offre pour importer plus de 4.5 million de quintaux de blé dur et tendre. La France est le principal fournisseur de blé pour l'Algérie. Plus de 30% de la production française de blé dur est destiné à l'Algérie (Allal, 2015).



- Production du blé dur en Algérie :

Figure 2 : Evolution de la production du blé dur en Algérie.

Source : MADR, Alger, 2013 (non publié)

II. Classification du blé dur (*Triticum durum* Desf)

Le blé appartient à la famille des graminées (Gramineae = Poaceae), qui comprend plus de 10000 espèces différentes (Mac Key, 2005). Plusieurs espèces de ploïdie différentes sont regroupées dans le genre *Triticum* qui est un exemple classique d'allo polyploïdie, dont les génomes homéologues dérivent de l'hybridation inter espèces appartenant à la même famille (Levy et Feldman, 2002). Le Blé dur (*T. turgidum* ssp. *Durum* Desf.) est une espèce

Chapitre I : Revue Bibliographique

allo tétraploïde ($2n = 28$, AABB) qui a pour origine l'hybridation suivie par un doublement chromosomique entre *Triticum Urartu* (génomme AA) et une espèce voisine de *Aegilops speltoides* (génomme BB) (Huang *et al.*, 2003).

La domestication du blé diploïde s'est produite dans le nord du croissant fertile au Proche Orient. Le blé tétraploïde a été domestiqué dans le bassin du Jourdain, plus au sud. Le blé tétraploïde s'est diversifié dans les centres secondaires représentés par les plateaux éthiopiens, le bassin méditerranéen et la Transcaucasie (Levy et Feldman, 2002).

III. Influences des contraintes abiotiques sur le blé dur :

Sous les conditions de production des principales zones céréalières algériennes, notamment celles des hauts plateaux, les performances de rendement de la culture de blé dur sont essentiellement limitées par l'action des stress aussi bien de nature biotiques qu'abiotiques. La variation des rendements, d'une année à l'autre, et d'un lieu à l'autre, a pour origine la sensibilité du matériel végétal aux effets combinés des basses températures hivernales, du gel printanier, du stress hydrique, salin et des hautes températures de fin de cycle de la culture.

III.1. Effet du stress hydrique

L'eau est indispensable aux plantes à tous les niveaux. A l'échelle moléculaire, l'eau agit comme matrice pour toutes les réactions enzymatiques au niveau de la phase photochimique de la photosynthèse, et apporte de l'hydrogène et de l'oxygène. A l'échelle de la cellule, l'eau a un impact direct sur l'architecture des organes et leur élongation. Enfin, à l'échelle de la plante, elle permet l'assimilation des solutés présents dans le sol et leur migration vers les parties aériennes de la plante, tout en assurant en parallèle une régulation thermique des tissus exposés aux rayons du soleil. Par conséquent, un déficit en eau prolongé modifie les composantes du rendement.

Le déficit hydrique est une contrainte permanente de la production agricole dans de nombreux pays au climat de type méditerranéen tels que l'Algérie. Il est à l'origine des pertes de production agricole dans de nombreuses régions. Les risques du manque d'eau sont et deviendront de plus en plus fréquents et persistants, à l'avenir, par suite des changements

Chapitre I : Revue Bibliographique

climatiques (Mozas, 2013). La sécheresse se traduit pour la plante par une dégradation du bilan entre la perte d'eau par transpiration et l'absorption d'eau du sol par les racines. (Durand, 2007).

D'après une étude réalisée par (Tardieu, 2005) le statut hydrique de la plante passe graduellement par trois principales phases, selon l'intensité du stress hydrique. Au premier lieu, la transpiration et l'assimilation se déroulent d'une façon normale jusqu'au moment où le niveau d'absorption racinaire ne peut plus satisfaire la demande climatique que subit la plante. La réserve nécessaire du sol est alors épuisée à 50 %. Après ce seuil, la plante entre dans le second stade, au cours duquel la transpiration et l'assimilation sont réduites relativement au potentiel.

La plante réagit de façon dynamique au cours de ce stade, pour rétablir l'équilibre entre la demande climatique et l'offre du sol, faisant intervenir des mécanismes pour le développement du système racinaire, qui se traduit par la régulation stomatique et/ou l'ajustement osmotique. Quand le déficit hydrique devient plus excessif, la plante entame le troisième et dernier stade au cours duquel 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 (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. Selon (Kameli et Losel, 1996) 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, donc un déficit hydrique contrôle la croissance végétative en réduisant la vigueur de la plante (Shao *et al.*, 2008 ; Son, 2011).

Le déficit hydrique induit le dépôt de cire sur le limbe et la gaine de certaines variétés de céréales. Ce dépôt est d'autant plus marqué que l'environnement est plus sec. L'inflorescence des céréales est relativement protégée de l'évaporation par des surfaces protectrices comme une cuticule épaisse qui fait que le statut hydrique des inflorescences est meilleur que celui des feuilles (Shepherd et Griffiths, 2006). Le déficit hydrique provoque la réduction du nombre de grain par épi, du nombre d'épis par plant, du poids moyen du grain, de l'indice de récolte et du rendement grain (Chenafi *et al.*, 2006).

III.2. Effets du Stress thermique :

Le stress thermique est l'un des stress abiotiques qui limitent le développement de la plante, lors des trente dernières années la température de la terre a augmenté de 0.2°C chaque décennie (Braun et al.,2002) ; un réchauffement de 1.4 jusqu'à 5.8°C est prévu au cours du 21ème siècle. Certains auteurs définissent le stress thermique comme une température assez extrême pour tuer un organisme sans qu'il existe pour lui un moyen de survivre. En condition générale un stress dû à une élévation de température est rarement un phénomène isolé, il est souvent associé à un fort rayonnement solaire, ou la température des feuilles dépasse souvent celle de l'air ambiant de 5 à 15°C (Braun et al. ,2002).

Une plante qui est exposée à une haute température mais qui a accès à suffisamment d'eau aura la possibilité de maintenir ses stomates ouverte afin que l'évaporation abaisse la température des feuilles (Salvucci et Crafts-Brandner, 2004), cet effet peut dépasser 10°C (Jones et al.,2002). Dans la nature ; les contraintes thermiques et hydriques sont souvent liées. la réponse de la plante à une forte température peut avoir pour conséquence l'installation d'une carence en eau. Dans ce cas, le stress thermique devient plus important, pour les plantes, la combinaison de deux stress est une situation habituelle. Certaines études ont mis en évidence l'effet bénéfique du stress hydrique sur la réponse aux contraintes thermiques et lumineuse (Havaux, 1992).

En terme de contraintes thermiques ; les céréales sont fortement confrontées à ce stress. Son effet varie en fonction du stade végétatif de la céréale et de l'interaction avec le stress hydrique. (Rawson *et al.*, 1989) montre 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 les utiliser, au rythme imposé par le stress thermique. On note une 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, alors, s'ancrer en profondeur et devient sensible aux effets du stress thermique.

(Hauchinal *et al.* 1994) observent une réduction du rendement des grain 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. Ils notent aussi que l'effet pénalisant du stress thermique se matérialise par une accélération du développement et une réduction des

Chapitre I : Revue Bibliographique

dimensions des organes constitutifs de la plante. La résultante est un effet négatif sur la productivité globale de la plante.

L'élévation de la température, tard au cours du cycle de développement de la plante et particulièrement après l'anthèse, est une contrainte à l'augmentation des rendements en zone semi-aride. La température optimale pour le développement et le remplissage du grain des céréales d'hiver varie de 12 à 15°C (Wardlaw et Willimbrink, 1994). Une diminution de 3 à 5% du poids du grain pour chaque degré centigrade d'augmentation de la température à partir de la base des 15°C, est notée.

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 migre 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. Les basses températures peuvent aussi agir sur la fertilité des épis des semis précoces (Abbassenne *et al.*, 1997).

III.3. Effets du stress salin :

La salinité des sols constitue l'un des principaux stress abiotiques limitant la croissance des plantes cultivées (Tanji *et al.*, 1990 ; Abdelly *et al.*, 2008 ; Khaled *et al.*, 2007 ; Munns et Tester, 2008). Cette salinité peut être naturelle ou induite par les activités agricoles comme l'irrigation ou l'utilisation de certains types d'engrais (Bartels et Nelson, 1994 ; Rubio *et al.*, 1995 ; Khaled *et al.*, 2007). Ainsi chaque année près de 10 millions d'ha de terre cultivable sont perdues dans le monde du fait de l'accumulation, au cours du temps, de petites quantités de sel contenues dans l'eau d'irrigation.

La conséquence générale de la présence de sels dans les sols est une limitation de la croissance qui provoque une baisse de rendement. Dans les régions semi-arides, la concentration en sel de la solution du sol peut atteindre 100 mM, conditions qui inhibent la croissance de la quasi-totalité des plantes cultivées (Ammann et Sanders, 1998).

Chapitre I : Revue Bibliographique

Physiologiquement, l'impact néfaste de la salinité se traduit par la conjonction d'un effet indirect sur le potentiel hydrique se traduisant par une réduction de la disponibilité de l'eau pour la plante et également par la toxicité et les perturbations de la nutrition minérale induites par l'excès des ions Na^+ et Cl^- (Niu et al., 1995 ; Al Karaki, 2000).

Par ailleurs, la salinité affecte la capacité de germination des graines (Alaoui et al., 2013 ; Masmoudi et al., 2014 ; Ndiaye et al., 2014 ; Benidire et al., 2015). De même le sel diminue la croissance de l'appareil végétatif par la réduction du nombre des feuilles (Bouaouina, 2000 ; Ly et al., 2014), réduit la surface foliaire (Mezni et al., 1999 ; Ben Nja, 2014 ; Michel et al., 2015), la teneur des feuilles en chlorophylles (M'hamed et al., 2008 ; Hassani., 2014), la conductance stomatique (Rejeb et al., 1991) et le taux de CO_2 assimilé (Downton *et al.*, 1985). Le métabolisme azoté et la synthèse protéique sont également sévèrement affectés par le stress salin. L'ultrastructure des chloroplastes peut aussi être modifiée par les fortes doses en sel aussi bien chez les halophytes que chez les glycophytes (Salama *et al.*, 1994). Il en résulte un développement anormal des plantes et une diminution du rendement.

La tolérance d'une plante au stress salin n'est pas un phénomène simple. C'est une conséquence de l'interaction de plusieurs caractères physiologiques et biochimiques qui diffèrent selon la catégorie de la plante. la présence de NaCl dans le milieu de culture limite l'alimentation de la plante en cations majeurs, tels que le potassium et le calcium (Zid et Grignon, 1991 ; Zhu *et al.*, 1998), en présence de stress les plantes ont une tendance à sélectionner certains ions, cette sélection est généralement liée aux mécanismes d'exclusion des ions Na^+ . Le maintien du rapport Na^+/K^+ élevé constitue un mécanisme aidant au bon déroulement des processus métaboliques sous stress salin (Ashraf et Khanum, 1997).

➤ *Rôles des cations alcalins K^+ et Na^+ chez les plantes :*

a) Rôle du K^+ :

Le potassium est l'un des minéraux les plus abondant dans la croûte terrestre, il fait partie des cations inorganiques qui assurent la neutralité électrique au sein de la plante ; c'est l'un des cations inorganiques majoritaires du cytoplasme des cellules animales ou bien végétales. En tant que cation inorganique le plus abondant dans le cytoplasme, le potassium est impliqué dans des fonctions cellulaires essentielles. Outre son rôle dans la neutralisation de la charge électrique nette des bio-molécules, il participe par exemple, au contrôle de la polarisation électrique de la membrane plasmique et au contrôle du potentiel osmotique

Chapitre I : Revue Bibliographique

intracellulaire. Chez les plantes, en liaison avec cette dernière fonction, K^+ est impliqué dans le contrôle de la pression de turgescence (Walker et al., 1996) et les fonctions connexes, élongation cellulaire ou mouvement cellulaire. En derniers lieu le K^+ joue un rôle, direct ou indirect, important dans la régulation d'activités enzymatiques, la synthèse des protéines, la photosynthèse et l'homéostasie du pH cytoplasmique.

Ces différents rôles au niveau cellulaire impliquent le potassium dans des fonctions essentielles au niveau de la plante entière, comme par exemple le contrôle des échanges gazeux à travers la régulation de l'ouverture et de la fermeture des stomates.

En cas de carence du K^+ dans la plante, la plante aura des perturbations dans le transport de la sève, ce qui se traduit par une diminution prononcée de la vitesse de la circulation de la sève phloémienne. Les photoassimilats s'accumulent alors dans les feuilles. Des symptômes de chlorose et de nécrose provenant de la photooxydation de l'appareil photosynthétique sont fréquemment observés et résultent d'une augmentation de la production de superoxydes (Marschner et al., 1996).

b) Rôle du Na^+ :

Comme le Na^+ ne constitue pas un élément nutritif essentiel chez la plus part des plantes supérieures. A forte concentration dans le sol, ce cation devient toxique pour la plante. A des concentrations plus faibles, la plante peut l'utiliser avec profit en tant qu'osmoticum vacuolaire.

La concentration du Na^+ dans le cytoplasme doit être maintenue à une concentration inférieure à celle du K^+ , dans les cellules animales comme chez les cellules végétales. Dans les cellules végétales, la concentration du Na^+ ne semble pas être soumise à une homéostasie étroite. Lorsque la plante se développe en présence de Na^+ , l'accumulation de Na^+ dans le cytoplasme au-delà d'un certain seuil devient toxique, mais ce seuil n'est pas clairement déterminé.

La toxicité de Na^+ dans le cytosol résulterait par la capacité à rentrer en compétition avec K^+ dans le processus de fixation sur des protéines importantes. Plus de 50 enzymes nécessitent K^+ pour être actives, alors que Na^+ n'assure pas la même fonction. Par conséquent, une concentration élevée de Na^+ dans le cytoplasme inhiberait l'activité de nombreuses enzymes et protéines, entraînant des dysfonctionnements de la cellule. De plus,

Chapitre I : Revue Bibliographique

comme la synthèse de protéines nécessite une concentration élevée en K^+ pour la fixation des ARNt au ribosomes (Blaha et al.,1999), la traduction serait également affectée.

Le Na^+ joue aussi un rôle important en tant qu'osmoticum, si la cellule végétale ne peut pas substituer Na^+ à K^+ dans son cytosol. Elle peut le faire, et utiliser Na^+ comme osmoticum, dans ces vacuoles. Différentes études ont effectivement montré que des quantités modérées de Na^+ peuvent améliorer la croissance de nombreuses espèces végétales.

Il est probable que l'effet bénéfique du Na^+ s'observe en particulier dans des conditions de carence de K^+ . Dans ces conditions, une accumulation contrôlée de Na^+ contribue probablement, à assurer la pression de turgescence des cellules. De même, une absorption modérée de Na^+ peut être bénéfique si elle permet à la plante d'ajuster rapidement son potentiel osmotique au début d'un stress salin.

En dépit des observations physiologiques, les déterminants génétiques de l'amélioration de la croissance des plantes par le sodium et les gènes susceptibles d'intervenir dans ces processus sont encore mal caractérisés. Un travail récent de thèse a fait l'objet de cette étude. Il a mis en évidence la fonction des gènes et a fourni une démonstration génétique sur le rôle important du Na^+ en condition de carence de K^+ et qui peut favoriser la croissance de la plante (Jaboune, 2008).

c) Interaction des transporteurs de K^+ et Na^+ et adaptation au stress salin :

L'adaptation de la plante à la présence de sel dans le sol et au stress salin implique des processus très variés, intervenant à différents niveaux de la cellule à l'organisme entier ; comme par exemple une modification de l'activité métabolique conduisant à l'accumulation d'osmolytes organiques (Ghars et al.,2008) ou à des modifications morphologique et développement des feuilles (Munns et Tester, 2008). Au sein de ce réseau de réponses très complexes, le contrôle des activités des transports membranaires, assurent à travers des mécanismes très divers une accumulation sélective de K^+ et une exclusion de Na^+ (Brini et al.,2007) apparaît comme un processus central. Ainsi dans de très nombreux modèles, depuis la culture isolée jusqu'à la plante entière l'adaptation au stress salin apparaît corrélée à la capacité de prélever sélectivement K^+ , de contrôler l'entrée de Na^+ et de maintenir le rapport K^+/Na^+ des teneurs internes de ces deux cations a un niveau très élevé.

IV. La sélection et la création *in vitro* de variétés de blé dur résistantes aux différents stress abiotiques

Les stress abiotiques sont la principale cause de la limitation de la production agricole dans le monde, réduisant le rendement de la plus part des grandes cultures et des pâturages de plus de 50%. La sécheresse et la salinité deviennent une contrainte principale à la culture dans de nombreuses régions dans le monde et en Algérie ; qui pourront conduire à une stérilisation des sols de plus de 50% des surfaces cultivées dans les 50 prochaines Années. La sélection classique devient impuissante devant ces différentes contraintes, d'où la nécessité de l'utilisation de nouvelles techniques de sélection telle que la Sélection *in Vitro*.

De nombreux sélectionneurs de céréales visent l'intégration des nombreuses biotechnologies *in vitro*, développées au cours des dernières années, dans les schémas traditionnels de production et d'amélioration génétique du blé. Ces biotechnologies ont élargi l'éventail des possibilités d'intégration qui s'offrent au phytogénéticien tout en modifiant les méthodologies de croisements, de sélection, d'évaluation et de mise en marché de semences améliorées. Essentiellement les biotechnologies particulières aux céréales cherchent à enrichir la diversité génétique et à produire des lignées fixées.

1) L'haplodiploïdisation

L'haplodiploïdisation est un outil efficace tant en sélection que dans les programmes de marquage moléculaire ; en sélection. Elle est utilisée pour fixer plus rapidement le matériel génétique .Elle repose sur l'obtention de plantes haploïdes (n) à partir des organes mâles ou femelles puis sur le doublement du stock chromosomique. Ainsi le sélectionneur va disposer de plantes diploïdes ($2n$) homozygotes où l'ensemble du génome est fixé. C'est donc une technique rapide de production de lignées pures en une seule étape au lieu de 7 à 8 générations. Avec cette méthode, la durée d'un cycle de sélection est raccourcie de 3 à 4 ans. Deux modèles cellulaires sont actuellement testés chez le blé, à savoir la culture de cellules isolées embryogènes (culture de suspensions cellulaires obtenues à partir de tissus somatiques d'embryons haploïdes ou diploïdes), et la culture de microspores isolés. Outre la fixation à l'état homozygote, ces techniques présentent l'avantage de bien se prêter à l'évaluation au niveau cellulaire de la résistance à divers stress abiotiques. En facilitant la régénération, elles devraient par ailleurs favoriser la réussite de la transformation génétique chez le blé dur. De par la rapidité d'obtention de

Chapitre I : Revue Bibliographique

lignées pures, l'haplodiploïdisation offre l'avantage de faciliter et de simplifier la sélection et certaines analyses en génétique quantitative. Elle constitue un outil efficace, en marquage moléculaire, car les performances agronomiques de ces lignées haplodiploïdes sont plus faciles à évaluer à cause de leur stabilité génétique.

2) Les hybridations et le sauvetage d'embryons immatures

L'une des approches de la biotechnologie pour l'amélioration à la résistance à différents stress abiotiques est la réalisation entre deux génotypes différents d'espèces apparentées et sauvages possédant des caractères de résistance pour générer un génotype élite ; l'exemple le plus concret est celui du triticales. Pour le blé dur, des croisements avec des espèces apparentées domestiquées (*Triticum polonicum*, *Triticum dicoccum*) ont donné des résultats consistants et encourageants. Toutefois, deux catégories d'handicaps peuvent se présenter lors de ces croisements. Les unes sont liées à la fertilité d'hybrides obtenus et à l'expression des caractères recherchés dans le « fond génétique » de l'espèce cultivée, les autres à la nécessité de plusieurs rétrocroisements.

Le sauvetage d'embryons immatures est une technique permettant l'élargissement des possibilités de croisements interspécifiques. Cette méthode permet de préserver des hybrides nouveaux qui ne peuvent survivre pour des raisons d'incompatibilité génétique. Les méthodologies de croisement et de sauvetage d'embryons permettent d'obtenir des plantes haploïdes dont le doublement de la garniture chromosomique assure la production de lignées fixées. Le premier succès a sans doute été celui de la culture des triticales, obtenu par croisement du blé avec du seigle. En effet, l'intégration des technologies et des manipulations *in vitro* permettent de donner des nouveautés très différentes de celles de la nature. La fréquence des haploïdes naturels est normalement trop faible pour être utilisable à des fins d'amélioration.

Le développement progressif des techniques de culture *in vitro* a faciliter l'hybridation interspécifique en permettant le sauvetage et la culture d'embryons. Plusieurs hybridations interspécifiques ont été réalisées à partir des très nombreuses espèces du genre *Triticum*. De nombreux gènes d'adaptation aux facteurs abiotiques sont rapportés dans la littérature. L'hybridation interspécifique ouvre des perspectives nouvelles et complémentaires aux techniques conventionnelles de croisements intraspécifiques et de sélections de populations. Elle permet d'enrichir la diversité génétique en créant des espèces entièrement nouvelles par

Chapitre I : Revue Bibliographique

l'apport de matériel nouveau ou de refaire la synthèse d'espèces connues. Les hybrides interspécifiques sont, entre autres, une source de résistance à la sécheresse chez les céréales. De très nombreuses combinaisons de gènes proviennent de grains hybrides.

3) Les vitrovariations et la sélection *in vitro*

Des vitrovariations (gamétoclonales ou somaclonales) sont couramment observées à la suite d'un ou de plusieurs cycles de culture de cellules. L'analyse de ces variations a été faite également au niveau des ADN nucléaires et cytoplasmiques.

Vu que ces modifications se produisent assez fréquemment, elles sont souvent étudiées en sélection *in vitro*. Celle-ci présente l'avantage d'un contrôle des conditions de culture, tout en permettant la manipulation d'un grand nombre de cellules, ce qui augmente la probabilité de génotypes pouvant être sélectionnés.

Chez le blé, plusieurs travaux ont rapporté l'utilisation des anthères, des microspores, des embryons ou des cellules somatiques soumis à des pressions de sélection simulant des conditions de stress hydrique : osmoticum, forte salinité, ABA... L'objectif de telles recherches repose à la fois sur la possibilité d'obtention de vitrovariations et sur la perspective de sélectionner au niveau gamétique ou somatique, dans des conditions de stress, de nouvelles lignées tolérantes aux différents stress biotiques et abiotiques. Très peu de résultats ont été obtenus jusqu'à aujourd'hui dans ce domaine (El Jaafari et al.,2001).

V. L'embryogénèse somatique chez les végétaux :

L'embryogénèse somatique est l'une des principales méthodes de la culture *in vitro*, elle a pour but la régénération d'une plante entière à partir de fragment de plantes sous conditions contrôlées en passant par la formation d'embryons somatique. Le développement de l'embryogénèse somatique se base principalement sur la capacité de totipotences des cellules végétales. En effet l'initiation de l'embryogénèse somatique se fait à partir de cellules dites somatique qui a leurs tour sous certaines conditions peuvent revenir à l'état de totipotence et initier un programme de régénération à partir du développement d'embryons somatiques (Clabaut,2009), c'est ce qu'on appelle une reprogrammation cellulaire et/ou Transdifférenciation.

Chapitre I : Revue Bibliographique

Selon l'étude de (Féher,2008), les cellules de l'explant utilisées qui sont déjà différenciées doivent passer par un processus conduisant à l'obtention de cellules compétentes, cette compétence est définie comme l'aptitude à recevoir et/ ou à répondre à un signal de développement, qui est considéré comme un état physiologique, cellulaire et moléculaire nécessaire à la préparation de l'étape suivante du développement.

La phase de l'induction de l'embryogénèse nécessite un stimulant externe tels que des régulateurs de croissance spécifiques ou bien l'application de différents stress. Sous ces conditions les cellules compétentes deviennent déterminées à former un embryon, d'où l'appellation de cellules embryogènes. Ces dernières ont réussi et fini le passage de l'état somatique à l'état embryogène, cependant sur le même amas cellulaire, on peut trouver des cellules compétentes qui n'ont pas encore acquis la capacité embryogène. Dans ce cas, l'addition de stimulant externe est encore nécessaire. La formation d'embryons somatiques est assurée par l'initiation d'un nouveau programme de différenciation.

Il est important de citer que l'initiation du programme d'embryogénèse somatique est contrôlée par le génotype et la nature de l'explant, et le choix du stimulant externe se fait suivant ces derniers.

L'embryogénèse somatique peut être directe ou bien indirecte ; quand les embryons somatiques sont obtenus à partir de cellules somatiques qui ont subi une dédifférenciation puis une redifférenciation au sein du tissu dont elle est issue sans le passage par la phase de la callogénèse, on parle alors d'une embryogénèse somatique directe.

L'embryogénèse somatique indirecte nécessite le passage par l'état cal qui est caractérisé par un ensemble d'amas cellulaire indifférencié dont certains vont se développer en embryons somatiques. C'est le cas de notre étude sur le développement de l'embryogénèse somatique à partir d'embryon mature du blé dur.

1) Transition de cellules somatiques en cellules embryogènes :

Lors du changement d'état, plusieurs événements caractéristiques peuvent être observés comme le remodelage de la chromatine. Ces événements semblent être influencés par la position cellulaire mais aussi par l'action d'inducteurs comme les hormones.

Chapitre I : Revue Bibliographique

i. Le remodelage de la Chromatine :

La dédifférenciation cellulaire chez les plantes comme chez les animaux est caractérisée par un changement d'expression de gènes, qui est gouverné par une partie du génome qui est transcrit (Euchromatine) et une autre partie qui est réprimée (Hétérochromatine). Lors de la reprogrammation cellulaire cette balance est modifiée, et contrôlée par différents importants facteurs et de complexes protéiques.

ii. La position cellulaire :

L'information apportée par la position d'une cellule semble un facteur important lors de la programmation mais aussi lors de reprogrammation cellulaire et l'organisation de la chromatine. Des modifications dans la position cellulaire sont accompagnées par un changement d'état cellulaire et un changement rapide de l'accessibilité d'une région du génome.

iii. L'action des hormones :

Plusieurs études ont réalisées pour identifier les gènes clés qui gouvernent l'embryogénèse somatique en réponse à l'induction du signal. Les agents utilisés pour induire l'embryogénèse *in vitro* sont multiples. L'utilisation du 2,4-D (Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique). Est la plus couramment utilisée. Les cellules cultivées *in vitro* acquièrent leur compétence à former des embryons.

2) Les principales étapes de l'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique est un processus de régénération qui, d'après Von arnold et al. (2008) se déroule en 5 étapes essentielles qui sont :

- Initiation des cultures embryogènes (PEMs) par culture de l'explant initial sur un milieu contenant des régulateurs de croissance surtout l'auxine avec souvent des cytokinines. Cette transition de la cellule somatique à l'état embryogène est un processus complexe comprenant la dédifférenciation, la réactivation des divisions cellulaires et une reprogrammation du développement (Féher et al., 2003). L'initiation de la voie de l'embryogenèse est limitée à certaines cellules de l'explant qui subissent

Chapitre I : Revue Bibliographique

un ensemble de modifications et se transforment en cellules dédifférenciées compétentes pour l'embryogenèse.

- Prolifération des cultures embryogènes sur milieu solide ou liquide contenant une composition en régulateurs de croissance similaire à celle de l'étape précédente. Pour la propagation à grande échelle, il est souvent préférable d'établir des suspensions cellulaires (Von Arnold et al., 2002).
- Prématuration des embryons somatiques sur milieu généralement dépourvu de régulateurs de croissance ce qui inhibe la prolifération cellulaire mais stimule la formation des embryons et le début du développement (Von Arnold et al., 2002). L'élimination ou la réduction de l'auxine dans le milieu de culture est en général préconisée durant cette phase.
Avec cette réduction, le blocage de l'expression des gènes nécessaires au passage au stade cordiforme est levé (Zimmerman, 1993).
- Maturation des embryons somatiques par culture sur un milieu contenant l'ABA et/ou un faible potentiel osmotique.
- Développement de plants sur milieu dépourvu de régulateurs de croissance.

3) Origine cellulaire de l'embryon somatique

L'embryon somatique peut avoir une origine unicellulaire (Sharp et al. 1980; Wann, 1988 ; Féher, 2006 ; Samaj et al., 2006). Il est largement admis que les cellules embryogènes compétentes peuvent être reconnues morphologiquement comme des cellules de petite taille arrondies, avec un cytoplasme riche, un gros noyau central et de petites vacuoles. Elles sont ainsi similaires aux cellules méristématiques ou au zygote et cette ressemblance est renforcée par la division inégale (Féher, 2006). En plus, elles sont couvertes par un réseau de matériel fibrillaire formant la couche la plus externe de la paroi appelée ECMSN (the extracellular matrix surface network) qui a été trouvée chez plusieurs espèces végétales Dicotylédones, Monocotylédones et Gymnospermes (Samaj et al., 2006). ECMSN est observée dans les premiers stades embryonnaires dont le stade globulaire et disparaissent quand le protoderme est formé (Dubois et al. 1992; Samaj et al. 1995). Ces cellules sont aussi entourées de callose

Chapitre I : Revue Bibliographique

et isolées des autres cellules par obturation des plasmodesmes (Suprasanna et Bapat, 2006). La cutine forme aussi une couche continue et homogène dans les régions embryogènes et sur les embryons (Tchorbadjieva, 2006). Elle isole physiologiquement les cellules compétentes de leurs voisines et protège l'embryon contre la perte d'eau et l'action des enzymes hydrolytiques de la paroi (Tchorbadjieva, 2006).

Ces cellules compétentes peuvent être aussi caractérisées par la position centrale du noyau et présentent des particularités relatives à l'organisation de leur cytosquelette (Samaj et al. 2006).

Plusieurs auteurs ont aussi suggéré que l'embryon somatique peut avoir une origine multicellulaire (Hamama, 2002). Ainsi, chez le cocotier, (Verdeil et al., 1994) ont conclu que l'initiation des embryons est d'origine pluricellulaire et que cette voie est le plus souvent à l'origine de structures embryonnaires incomplètes et sans méristème caulinaire. De même, chez le bananier, (Lee et al., 1997) ont montré que l'embryon somatique issu de sections de rhizome peut être d'origine unicellulaire à partir du tissu vasculaire ou d'origine multicellulaire à partir de tissus périvasculaires.

Des coupes réalisées à différents niveaux des amas cellulaires de *Daucus carotta* ont permis de mettre en évidence, au microscope électronique, la présence de régions méristématiques, où les cellules se recloisonnent pour former des groupes bien individualisés de cellules à cytoplasme dense. Leur paroi épaisse rappelle l'épaississement de la paroi des embryons zygotiques, et le non fonctionnement d'un grand nombre de plasmodesmes montre qu'il y a suppression de certaines communications et corrélations avec les cellules avoisinantes.

En résumé il est important de noter que le principe général de l'embryogénèse somatique est la formation d'embryons à partir de cellules non issues de la fusion des gamètes à des fins expérimentales car elle présente plusieurs avantages. D'une part elle permet une multiplication clonale rapide et nombreuse, et elle se produit en milieu contrôlé. De plus, la possibilité de générer des embryons somatiques, à partir de différents explants, procure l'avantage d'étudier les mécanismes moléculaires et physiologiques de l'embryogénèse. Les différentes étapes du développement de l'embryon somatique nécessite une longue période de culture, spécialement dans notre cas d'étude qui porte sur différentes variétés de blé dur, qui nécessite une embryogénèse somatique indirecte, d'où le passage par la callogénèse. Une longue période de culture provoque des variations somaclonales qui pourra être renforcée et

Chapitre I : Revue Bibliographique

contrôlée par l'utilisation d'un agent sélectif à un stress tel que le NaCl pour l'application d'un stress salin. L'exploitation de ces variations pourront nous dévoiler l'apparition de nouvelles variétés résistantes au stress salin.

4) Régénération de plantules après une embryogénèse Somatique :

La régénération *in vitro* après une embryogénèse somatique consiste à transférer des fragments de cals embryogènes issues de la culture d'explants de plante, sur un milieu complexe et appropriés. La spécificité du milieu s'identifie dans la balance hormonale (concentration en auxine/concentration en cytokinine) addition au milieu. Le choix de cette balance se fait sur la base des besoins de la plante pour régénérées une plante entière. La régénération de plante entière à partir de la redifférenciations de pousse de riz, a été les premiers travaux réussis dans la culture *in vitro* des céréales. Nishi *et al.*, 1968 ont pu réussir l'obtention de cals à partir de racines de riz sur le milieu de culture additionné de 2,4-D. Qui après plusieurs repiquages se régénère en plante entières. Les plantes régénérées sont diploïdes bien que certaines donnent des phénotypes particuliers. De cela on conclue que le 2,4-D est un élément déterminant pour la régulation de différenciation et la redifférenciations des monocotylédones. Dans le présent travail, différentes combinaisons hormonales ont été testés afin de sélectionner la balance idéale à nos variétés de blé dur.

VI. Variation Somaclonale :

1) Définition :

Le terme de variation somaclonale a été évoqué pour la première fois par Larkin et Scowcroft 1981. Ces deux auteurs, lors de la mise au point d'un test de résistance de la canne à sucre à un pathogène, faute de plants sensibles disponibles, utilisèrent des clones régénérés *in vitro* à partir de parents sensibles. Ils constatèrent alors que certains des plants s'avéraient résistants, alors qu'ils n'avaient précédemment pas été en contact avec le pathogène. Après avoir remis en cause la fiabilité de leur test, puis à la suite de nombreux contrôles, ils durent admettre que la résistance des vitroplants avait été acquise au cours du processus de régénération à partir de cultures cellulaires. Ils démontrèrent ainsi que la culture de tissus végétaux induisait des modifications phénotypiques à une fréquence beaucoup plus élevée que celles observées naturellement et baptisèrent ce phénomène variation somaclonale. Depuis, ce

Chapitre I : Revue Bibliographique

concept a été élargi à l'ensemble des altérations génotypiques et phénotypiques intervenant lors des processus de propagation tissulaire (Kaepler *et al.*, 2000).

De tels phénomènes ont été décrits chez la plupart des espèces régénérées par culture *in vitro*, comme le café (Etienne et Bertrand, 2003), la banane (Peraza-Echeverria *et al.*, 2001) ou le concombre (Filipecki *et al.*, 2006). En effet, la régénération d'un individu complet à partir d'un simple échantillon tissulaire (l'explant) est une caractéristique des plantes. Cette "totipotence" des cellules végétales (concept proposé par Hundelband au début du 20^{ème} siècle) a largement été employée par l'homme depuis l'apparition de l'agriculture (bouturage, greffage...), mais la maîtrise des procédés biotechnologiques a permis de l'exploiter sur un très grand nombre d'espèces jusque-là réfractaires. Cependant, ces techniques, en réorientant la destinée cellulaire entraînent des dérèglements d'ordre génétique, cytogénétique ou bien moléculaire, se traduisant généralement par des altérations phénotypiques chez les individus régénérés ou plus tardivement dans la descendance. Dans un contexte d'amélioration variétale, ces mutants peuvent, s'ils s'avèrent stables dans le temps, présenter de nouvelles caractéristiques pouvant intéresser les sélectionneurs, comme une meilleure adaptation à des conditions environnementales extrêmes (sécheresse, basses températures, salinité) ou bien encore des résistances à certains pathogènes (insectes, champignons, bactéries), (Jain, 2001 ; Duncan, 1997). Cependant l'utilisation des variations somaclonales comme source de diversité reste limitée, du fait de la rareté des variants à performance agronomique accrue.

En contraire, ces dérives phénotypiques deviennent dommageables à la diffusion de matériel produit *in vitro* si leurs effets sont négatifs par rapport à l'individu initial. La culture *in vitro* est donc par nature un système déstabilisant qui peut s'apparenter à un stress (Duncan, 1997 ; Kaepler *et al.*, 1998 ; Madlung et Comai, 2004). Dès la première étape d'initiation d'une culture, l'isolement de l'explant déconnecte totalement les cellules végétales de leur contexte tissulaire normal et des régulations qui y sont associées. Les blessures engendrées lors du prélèvement ainsi que les traitements stérilisants (hypochlorique, sels de mercure) sont considérés comme des éliciteurs de stress oxydatif de même que les cycles de cultures successives, l'alternance de différents milieux de culture ou les expositions prolongées aux régulateurs de croissance (Cassells et Curry, 2001). Face à des conditions biotiques ou abiotiques variables, tous les organismes vivants ont mis en place des stratégies adaptatives. Chez les plantes, de par leur incapacité à se déplacer, des mécanismes très sophistiqués ont été développés, notamment une très grande plasticité cellulaire. De plus, contrairement aux

Chapitre I : Revue Bibliographique

animaux, le programme de développement des végétaux est indéfini. Les plantes régénèrent en continu de nouveaux organes à partir des cellules souches des méristèmes sous l'action de signaux du développement eux-mêmes sous contrôle environnemental.

En culture *in vitro*, on assiste donc, sous l'action des régulateurs de croissance, à une reprogrammation de la destinée cellulaire qui s'établit après une phase dite de dédifférenciation. Des cellules à activité cellulaire réduite largement différenciées sont alors réactivées et conduisent à la génération de nouveaux tissus ou organes, aux caractéristiques souvent très éloignées du tissu d'origine. Cela implique une reprogrammation de l'expression du génome qui, dans ces nouvelles circonstances environnementales, peut donc ne pas suivre la même séquence que celle qui prévalait dans les conditions naturelles (Mc Clintock, 1984 ; Jain, 2001). Ainsi, durant les phases *in vitro*, différents mécanismes intervenant dans la modulation de l'expression du génome sont susceptibles d'être affectés.

2) Caractéristiques :

Les changements rapportés dans la littérature pour les plantes régénérées par culture *in vitro* sont en grande majorité des variations de type qualitatif produisant des effets phénotypiques majeurs. Ces mutations sont en général stables et transmises de manière récessive dans les générations suivantes. La fréquence de ces mutations et leur aspect aléatoire rappellent celles obtenues lors d'expérimentations menées en présence d'agents mutagènes comme l'"ethyl methane sulfonate" (EMS) (Phillips *et al.*, 1994). Les modifications des niveaux de ploïdie, des réarrangements chromosomiques ainsi que des mutations ponctuelles sont les altérations les plus souvent observées. Les espèces dicotylédones diploïdes sont très sujettes au doublement de leurs stocks chromosomiques au contraire des espèces tétraploïdes chez lesquelles on constate plus généralement des changements de structure des chromosomes de type aneuploïdie et doublement de chromosomes. Les cas de polyploïdie résultent en général d'endopolyploïdisation ou de fusion nucléaire (Duncan, 1997 ; Jain, 2001).

Chez de nombreuses espèces, les remaniements chromosomiques sont plus fréquents que les modifications de niveau de ploïdie. Des événements de translocation, de duplication, d'inversion et de délétion ont pour origine des cassures chromosomiques qui ne se produisent pas aléatoirement sur les chromosomes, mais dans les régions hétérochromatiques (Kaepler *et al.*, 1998 ; 2000), dont la réplication au cours du cycle cellulaire serait plus tardive en culture *in vitro*. En effet, chez le maïs, le coton ou l'orge, la plupart des remaniements

Chapitre I : Revue Bibliographique

chromosomiques ont été observés entre le centromère et les îlots hétérochromatiniens (Kaepler *et al.*, 2000). La réplication incomplète de l'hétérochromatine au moment de la division cellulaire entraînerait la formation de ponts anaphasiques suivie de cassures chromosomiques. Ces cassures chromosomiques peuvent être une source de changements phénotypiques, si les réarrangements de séquences qui en découlent modifient l'expression de gènes plus ou moins proches des régions concernées. Ces mutations proviennent également d'échanges de séquences homologues entre chromatides (Duncan, 1997 ; Peschke et Phillips, 1992). Parallèlement, des mutations ponctuelles impliquant le changement de la nature d'une base de la séquence d'ADN résulteraient - soit d'un mécanisme de désamination des cytosines méthylées qui entraînerait une transformation de Cytosine en Thymine, comme cela a été décrit chez des mutants de maïs dans la séquence de gènes codant pour l'alcool deshydrogénase - soit d'une perte de précision de la machinerie de réparation en cours de réplication (Phillips *et al.*, 1994 ; Kaepler *et al.*, 1998). En outre, les plantes supérieures contiennent une proportion de séquences répétées bien plus fortes que les animaux (70 à 80 % en moyenne contre 40 %). Des modifications dans le nombre et le type des séquences répétées ont été rapportées chez plusieurs espèces régénérées *in vitro* (Cavallini *et al.*, 1996) notamment dans des cals de chou (Leroy *et al.*, 2001). Ces séquences peuvent être à l'origine de nombreux remaniements chromosomiques et induire ainsi de nouvelles mutations. L'allongement des séquences télomériques qui contribuent à la stabilité des chromosomes, a aussi été observé dans des cultures cellulaires d'orge entretenues sur de longues périodes (McKnight *et al.*, 2002).

Des modifications au niveau des organites cellulaires ont également été décrites, principalement des remaniements structuraux du génome mitochondrial, notamment chez des plants de café issus d'embryons somatiques (Rani *et al.*, 2000). Le génome des chloroplastes apparaît au contraire beaucoup plus stable (Fourré, 2000).

De même, la mobilisation de nombreux éléments transposables serait induite par la culture *in vitro* (Peschke *et al.*, 1987 ; Grandbastien, 1998). Ainsi, l'insertion de rétrotransposon dans un gène spécifique pourrait entraîner un phénotype mutant stable au contraire des transposons classiques qui seraient responsables de mutations instables.

Certaines dérives phénotypiques se distinguent donc par leur caractère instable et ne sont pas transmises à la descendance ou alors de façon non mendélienne. On parle alors de

Chapitre I : Revue Bibliographique

modifications épigénétiques. Ainsi, des variations du taux de méthylation global de l'ADN ont été observées parmi les plantes régénérées *in vitro* ainsi que dans leurs descendances. L'hypométhylation serait beaucoup plus fréquemment rapportée dans la littérature que l'hyperméthylation. Ces modulations de la méthylation des cytosines de l'ADN seraient à l'origine d'épimutations notamment dans le cas de mutations qui affectent des caractères quantitatifs, c'est à dire qui touche plusieurs gènes simultanément.

3) Facteurs accentuant la variation somaclonale :

La fréquence et l'intensité des variations somaclonales sont fortement influencées par le génotype et l'âge de la plante mère, l'origine de l'explant (génotype), la composition du milieu, type et concentration du régulateur de croissance, et la durée de la culture (Duncan, 1997 ; Jain, 2001 ; Cassells *et al.*, 2001 ; Sahijram *et al.* 2003; Bairu *et al.* 2011).

Les plantes régénérées à partir de cals non organisés pourraient présenter davantage de variations que celles issues de cals organisés. La régénération sans passage par une phase de callogenèse (culture de meristème, microbouturage...) diminuerait le taux de variants vers des niveaux très faibles voire indétectables (Phillips *et al.*, 1994). Cependant, l'embryogenèse somatique induirait moins de variations en comparaison de l'organogenèse à partir de cal, probablement par une pression de sélection négative qui éliminerait les cellules porteuses de trop graves aberrations chromosomiques et qui seraient de ce fait inaptes à achever un programme génétique strict d'embryogenèse (Gaj, 2004 ; Duncan, 1997). Dans le même ordre d'idée, les tissus en condition *in vitro* porteraient davantage de mutations ou d'épimutations (mutations épigéniques) que les plantes entières qu'ils régénèrent (Peschke et Phillips, 1992). La fréquence d'apparition des mutants apparaît fortement corrélée avec le nombre de cycles de culture. On n'assisterait pas à une augmentation du taux de mutation mais plutôt à une accumulation au cours du temps de ces mutations (Peschke et Phillips, 1992 ; Kaeppler *et al.*, 1998 ; Etienne et Bertrand, 2003).

4) Mise en évidence des variations somaclonales par marqueurs moléculaires :

Une variation somaclonale peut induire des variations d'ordre qualitatives ou bien quantitatives (Keaeppler et al., 2000). Les variations des traits qualitatifs sont très répandues, et ne se limitant pas par le système de culture. En général ces changements n'affectent pas les performances agronomiques de la plante (Etienne et Bernard, 2000) ; cependant certains changements phénotypiques peuvent être déterminants, pour la survie de la plante, ils peuvent stopper la régénération et l'acclimation en serre de la plante après une culture *in vitro*.

En général la culture cellulaire est à l'origine des différentes variations produites. À travers les différents travaux réalisés par Mc Clintock ; cet auteur a déduit que le simple fait d'exciser un explant de sa plante d'origine et le mettre en culture, provoque le réarrangement du génome de sorte qu'il s'adapte à son nouveau milieu de culture. En addition des nouvelles conditions de culture ; l'application de différents types de stress est aussi un facteur qui provoque des changements génotypiques, afin de permettre l'adaptation de la plante aux nouvelles conditions de culture. Ces changements sont exprimés par des amplifications ou bien des mouvements dans les régions transposables du génome, ce qui induit une méthylation de l'ADN, un réarrangement chromosomique ou bien des mutations. Cet aspect est très largement exploité par les sélectionneurs afin d'obtenir des variations qui pourront être exploitées pour la création de nouvelles variétés à travers leurs acquisitions d'une résistance à un stress lors de la culture *in vitro*.

Le meilleur moyen de la mise en évidence des variations produites lors de la culture *in vitro* est l'identification par marqueurs moléculaires. En effet, différents travaux se sont basés sur l'utilisation de marqueurs moléculaires spécifiques afin d'identifier la présence de variations.

Dans les travaux réalisées par Remi et al.,2000, la mise en évidence des variations dans le génome mitochondriale et nucléaire produites après une culture *in vitro* étaient réalisées grâce à l'utilisation de marquage par RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). Ainsi que Linacero et al.,2000 se sont référés au taux de polymorphisme obtenu par la technique de l'RAPD afin de permettre de prouver l'instabilité de l'ADN génomique du seigle après une régénération *in vitro*.

Chapitre I : Revue Bibliographique

La confirmation d'une éventuelle variation est confirmée par la présence ou absence de polymorphisme, la présence de polymorphisme est mise en évidence par la présence ou l'absence de bandes après une amplification par PCR. L'amplification de bandes se fait grâce à une hybridation avec des amorces RAPD spécifiques qui ont pour critères un petit nombre de bases ainsi le choix de ces amorces se fait d'une façon arbitraire.

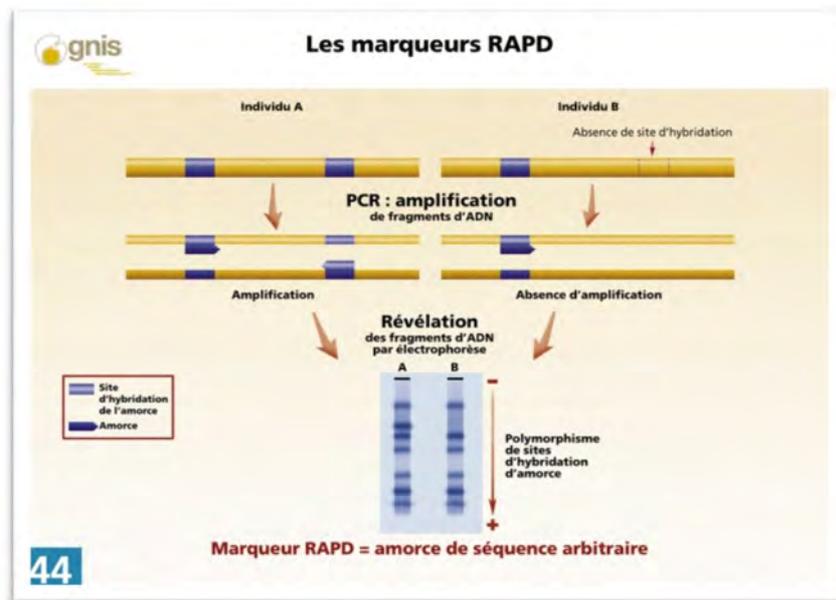
L'utilisation de RAPD comme marqueur est spécialement utilisé pour étudier les variations génomiques tel est le cas pour les travaux réalisés par Archaket al.,2003 Yulianti et al.,2011 afin d'étudier la variation génétiques entre espèces. Dans de récents travaux de mise en évidence de variations somaclonales grâce à la technique de RAPD qui s'est avérée efficace pour mettre en évidence les variations produites. (Rival et al.,1998 ; Jaligot et al.,2000 ; Debnath et al.,2012 ; Leva et al.,2012 ; Singh et al.,2013 ; Sorina et al.,2013 ;Salgotra et al.,2015).

a) Définition du polymorphisme génétique :

On définit généralement le polymorphisme par la présence de plusieurs allèles pour un seule gène ou locus donné, il est généralement lié à des variations induites par des mutations génétiques, qui se traduisent par des variations de la séquence nucléotidique de l'ADN d'un gène de différents individus.

Dans le présent cas d'étude le polymorphisme est identifié à partir de plantules régénérées *in vitro*, il se traduit par des différences dans le génotype, qui sera mis en évidence par les profils des bandes produit après amplification par PCR en présence de différentes Amorces.

b) Principe de la technique RAPD :



(Anonyme : <http://www.gnis-pedagogie.org/biotechnologie-amelioration-marqueur-rapd.html>)

Figure 3 : Principe de la technique RAPD.

Le principe de cette technique se base sur une révélation de polymorphisme par PCR (réaction en chaîne par polymérase), des bandes polymorphes sont révélées après une révélation sur gel d'agarose de bandes amplifiées grâce à de petites amorces arbitraires (environ 10 nucléotides), ces dernières vont s'hybrider sur l'ADN génomique des géotypes à tester, et révéler la présence ou l'absence de polymorphisme. La présence de polymorphisme indiquera par la suite la présence de variations génétiques entre les différents génomes.

Dans le cas présent d'études, la révélation de variations somaclonales est réalisée à travers six géotypes de blé dur cultivées *in vitro* et *ex vitro* et en présence ou absence de stress salin, afin de révéler l'effet de la culture *in vitro*, l'embryogénèse somatique et l'application de stress sur la création de variations somaclonales.

***Chapitre II : Etude de l'aptitude des six
variétés de blé dur à la culture in vitro***

I. Introduction

Les biotechnologies sont un ensemble de méthodes qui utilisent des organismes vivants ou une partie de ces organismes pour d'une part, mieux comprendre les mécanismes biologiques et d'autre part, améliorer ou créer des produits dans différents secteurs : l'industrie alimentaire, l'industrie pharmaceutique ou bien l'agriculture.

L'agriculture fait partie du domaine où les techniques des biotechnologies végétales se sont développées, elles sont présent ici au sens de la culture *in vitro* (Sidrov *et al.*,2013). Cette technique utilise des fragments de plantes pour reproduire un individu identique. Elle a pour principal objectif de régénérer une plante entière à partir d'explants végétale (Embryons mature, Embryon immature, Inflorescences, Fragment de feuilles, Fragment de racine,...) (Fehér,2008) qui doivent être cultivés dans leur milieu habituel de culture pour pouvoir poursuivre leur développement, mis à part les sels minéraux, l'eau, les vitamines et les acides aminés ; les phytohormones sont dans cette technique d'une grande importance, les deux types d'hormones les plus utilisées sont les auxines et les cytokinines. La culture *in vitro* fait aussi intervenir des conditions d'asepsie totale (stérilisation du matériel, désinfection des explants) et des conditions de culture parfaitement contrôlées (milieux de culture, température, humidité et lumière).

L'immobilité des plantes et leurs comportements aux conditions climatiques indésirables nous a poussé à exploiter les potentialités naturelles préexistantes de la multiplication végétative qui se traduit par la totipotence cellulaire, elle se caractérise par la capacité d'une cellule végétale à régénérer un autre individu identique à celui dont elle est issue. Ces cellules dites totipotentes pouvant subir une reprogrammation et aussi se redifférencier et s'engager vers des programmes d'organogénèse ou d'embryogénèse non sexuée dite embryogénèse somatique selon les signaux extérieurs reçus. Différents travaux de culture *in vitro* ont été réalisés dans ce contexte sur les différentes espèces de céréales et spécialement le blé et ont amené à mettre en évidence que chaque génotype répond différemment à la culture (Bahalla *et al.*,2006 ; Fehér, 2006 ; Nawaz *et al.*, 2013 ; Hakam *et al.*,2014 ; Razmjoo,*et al.*,2015).

Dans cette optique, l'exploitation de l'embryogénèse somatique comme un moyen de multiplication végétale principale et l'adopter comme une technique de biotechnologie dans la filière du blé va nous permettre d'assurer une production plus efficace, durable et rentable

de blé ainsi que d'amélioration de sa résistance aux différentes contraintes abiotiques. Pour cela l'étude du comportement de nos six variétés de blé dur vis-à-vis de la culture *in vitro* va nous permettre de mettre en évidence l'importance de cette dernière pour le développement et les créations de nouvelles variétés.

Dans ce cadre d'étude, le but de ce présent chapitre est de mettre en évidence :

- Les conditions optimales de culture des variétés,
- Sélectionner la concentration de l'hormone la plus favorable pour le développement de la callogénèse ainsi pour la production d'embryons somatiques,
- Sélectionner les variétés les plus performantes à la culture *in vitro*,
- Mettre en évidence la combinaison hormonale la plus adéquate pour la réussite de la régénération.

II. Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

L'étude a porté sur six variétés de blé dur (*Triticum durum*) adaptées au climat du pourtour méditerranéen : Waha, Guemgoum Rkhem, Beliouni, Adnan-2, Beni mestina, Adnan-1, présentant des origines variables, afin de tester leurs aptitudes à la résistance via le Chlorure de sodium.

Les variétés consistent en une sélection de la station expérimentale ITGC (Institut Technique des Grandes Cultures) Constantine, Algérie,

Tableau.1 : Origine des six variétés de blé dur

<i>Variétés</i>	<i>Origine</i>	<i>Pédigrée</i>
Waha	Croisement CYMMYT/ ICARDA. Algérie	<i>Plc/Ruff/Gta/Rhe</i>
Guemgoum Rkhem	Algérie	<i>Variété population.</i>
Belioni	ICARDA Algérie	<i>Variété population</i>
Adnan-2	Croisement CMMYT/ ICARDA Syrie	
Beni mestina	ICARDA Algérie	<i>Lahn/ch1 2003</i>
Adnan-1	Croisement CMMYT ICARDA Syrie.	

2. Mise en place pour l'induction d'une embryogénèse somatique :

L'essai a été conduit au sein du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale (GBBV) de l'université des frères Mentouri Constantine durant la période 2011/2013.

L'obtention de bon amas cellulaire indifférenciés (cal), nécessite des conditions de culture très hautement contrôlées.

a) Préparation et stérilisation du milieu de culture :

Le choix du milieu de culture est l'un des facteurs importants et limitant pour la réussite de la culture in vitro (Mathias et al.,1986 ; Elena et al., 1988 ; Fennel et al., 1996), dans le présent travail le milieu de base adéquat utilisé est le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962). La sélection du milieu MS comme milieu de base pour la culture *in vitro* du blé a été établis à travers les différents travaux réalisés. Plusieurs chercheurs ont utilisé ce milieu lors de leurs travaux sur le blé (Munazir et al.,2010 ; Farshadfar et al.,2012 ; Nawaz et al.,2013 et Dugustu,2014).

La composition riche et complète des solutions nutritives du milieu MS ont permis la réussite de la culture *in vitro* de différentes plantes et spécialement de l'embryogénèse somatique.

Notre solution nutritive nécessite plusieurs composants cités dans ce qui ce suit :

- Sels minéraux

Composés de macro et de micro éléments : les solutions mères préparées doivent être stockées au froid (2°C) et à l'obscurité, pour une durée limitée (1an).

- Sucres

Le saccharose constitue en général la meilleure source de carbone et on l'apporte à la concentration de 30 g/l.

Le passage à l'autoclave provoque une altération des sucres par hydrolyse mais ceci ne présente pas d'inconvénients sur le plan de la croissance.

- Vitamines et acides aminés

Les vitamines utilisées sont : la Thiamine-HCL, la Pyridoxine-HCL, la Glycine et l'acide Nicotinique. Il a été démontré par plusieurs chercheurs, que l'emploi de diverses vitamines dans un milieu de culture favorise le développement des cultures *in vitro* (**Boccon-gibod., 1980**).

- Régulateurs de croissances

Ces substances sont utilisées à des doses faibles qui varient entre 10-2 mg/l et 10 mg/l, mais sont d'une importance considérable (Norstog., 1961). Plusieurs régulateurs de croissances sont dégradables par la lumière en solution aqueuse comme la Kinétine, d'autres sont dégradés par la chaleur comme l'AIA, mais certains sont stables à 120° C tel que l'ANA, le 2.4-D, le BAP et la Kinétine.

Dans cette essai plusieurs concentrations ont été testées à fin de sélectionner celles qui donnent le plus haut taux d'induction de cals. On a utilisé comme régulateur de croissance pour le développement de la callogénèse et les embryons somatique le 2.4-D avec une concentration de 3.5mg/l, ainsi que l'AIA et la Kinétine pour l'étape de la régénération. Ces régulateurs ne sont pas solubles dans l'eau, ils sont préalablement solubilisés dans un solvant approprié : le NaOH.

- Substances gélifiantes

On utilise de l'agar à 10 g/l, c'est une substance extraite des algues marines appelée agar-agar ou gélose. Elle se dissout à 100° C, et donne un gel transparent au-dessous de 40° C.

Après avoir mélangé les différentes quantités requises d'agents actifs pour chacune des formulations du milieu de culture, le pH est ajusté à 5,8 avec du NaOH ou du HCL sous agitation permanente, on ajoute graduellement sur une plaque chauffante les sucres et l'agar d'une manière uniforme à la solution, la stérilisation est assurée par un autoclavage de 120°C

pendant 20 min. une fois le milieu refroidi, il est versé dans des boites de pétries stériles sous des conditions d'une totale asepsie qui est assurée par une hôte a flamme laminaire.

Les milieux stérilisés sont généralement conservés à une température qui varie entre 4°C et 5°C mais ceci n'est pas absolument nécessaire. En revanche, les milieux contenant les substances de croissance seront conservés de préférence au froid.

Ces milieux seront conservés un mois ou plus, car au-delà, il y a un risque de dessèchement.

b) Stérilisation des graines :

L'embryogénèse somatique est initiée à partir d'embryon mature qui représente l'explant principal de notre essai, l'excision des embryons matures des graines implique une asepsie totale, d'où la nécessité de la stérilisation des graines.

Lors de notre expérimentation, plusieurs modes de stérilisation ont été utilisés ; stérilisation à l'hypochlorite de calcium, stérilisation a l'eau de javel. Ces modes n'ont pas réussi à éliminer tous les pathogènes présents sur les graines. Des contaminations sont apparues après plusieurs jours de cultures qui a provoqué l'élimination de tout l'essai, le mode de stérilisation à l'HgCl₂ est le plus adéquat. Il a été établi après plusieurs essais. Ce mode a permis l'élimination de tous les pathogènes présents sans abimer les tissus de l'embryon mature et a permis le développement normal de la callogénèse.

• **Mode de stérilisation des graines par l'HgCl₂ :**

Les graines sont trempées à l'éthanol à 75% pendant 5mn afin d'assurer le rinçage des pathogènes. L'élimination de l'éthanol est assuré par un rinçage a l'eau distillé stérile, puis les graines sont exposée à l'HgCl₂ à 0,1% additionné de 1 a 2 gouttes de tween 20 pendant 30 minutes, ces deux forts détergents ont pour but l'élimination total des pathogènes présents. Plusieurs rinçage à l'eau distillé doivent assurer l'élimination totale des 2 détergents pour ne pas perturber la réussite de l'induction des cal. Les graines sont disposées dans des boites de pétris stériles comportant du papier stérile imbibé d'eau distillée stérile pour permettre le gonflement des graines. Les boites de pétris sont mis à l'obscurité totale pendant un période de 12h à 24h.

c) *Stérilisation du matériel utilisé :*

L'asepsie constitue un élément très important qui conditionne la réussite de la culture d'embryon, car certaines irrégularités des résultats concernant notamment leur surviesemblaient dues à des défaillances dans les conditions de stérilisation. Cette importance a suscité la prise en considération d'un certain nombre de mesures :

✓ Stérilisation de la hotte :

Avant chaque manipulation, la hotte doit être nettoyée d'abord avec de l'eau de javel (12%) puis on vaporise à l'alcool (70%) à l'intérieur des parois et la surface de travail ainsi que tout le matériel de travail et les instruments nécessaires.

La stérilisation est complétée en lavant les autres paillasses, sol...etc., on allume par la suite le bec bunsen et la hotte pendant 30 minutes avant manipulation.

✓ Stérilisation à sec :

Tous les instruments métalliques (pinces, pointe, bistouri) ou verreries (Becher, boîte de Pétri) sont enrobés avec du papier d'aluminium, et sont mis à l'étuve pour une stérilisation à sec à une température de 180°C pendant deux heures de temps avant chaque manipulation.

✓ Stérilisation à l'alcool :

Au cours des manipulations, les instruments sont plongés dans de l'alcool à 70°C, puis passés à la flamme du bec bunsen afin de brûler l'alcool. La stérilisation se fait par le passage dans l'alcool. le passage à la flamme ne sert qu'à éliminer l'alcool (on garde l'instrument stérilisé toujours dans la sphère stérile).

d) *L'ensemencement :*

Six embryons par boîte de pétrie ont été disséqués sous conditions d'asepsie totale et mis en culture, pour les six variétés, sept boîtes de pétries ont été utilisées. Au totale 252 embryons issus des six variétés ont été utilisés dans chaque essai, le même essai, est répété trois fois pour des résultats exploitables, donc plus de 750 embryons ont été mis en culture pour l'étude du comportement et le développement des embryons matures.

e) Conditions de culture :

Les boîtes de culture sont transférées vers la chambre de culture sous des conditions de cultures contrôlées : une photopériode de 16h de lumière et 8h d'obscurité est assurée ainsi que le maintien d'une température entre 22-25 °C avec un taux d'humidité relative de 50-60%.

f) Durée et nombre de repiquages :

Au bout de chaque 4 semaines d'incubation un repiquage alternatif est réalisé qui a pour but d'éliminer les embryons n'ayant pas induits de cals, et ne garder ainsi que ceux qui sont capables de fournir de véritables cultures de tissus, la conduite des manipulations doit toujours être guidées par le souci de ne pas transporter dans les milieux neufs des germes qui peuvent contaminer certaines parties ou la totalité du cal. Chaque cal est examiné individuellement et soigneusement afin de noter les différents aspects. Le renouvellement du milieu permet de maintenir le développement de la callogénèse ainsi que la formation des embryons somatiques. Le développement de ces derniers nécessite la suppression du régulateur de croissance du milieu. La culture est maintenue durant 16 semaines.

3. Paramètres étudiés :

Afin de mettre en évidence les conditions nécessaires à la réussite d'un bon déroulement de la callogénèse ainsi que l'obtention d'embryons somatiques pour une régénération complète de plantules, l'analyse des paramètres a permis de mettre en évidence les conditions de culture et le comportement lors de la culture *in vitro* de chaque variété.

a) Temps d'induction de cals ;

b) Taux de la callogénèse :

$$\text{Taux d'induction de la callogénèse (\%)} = \frac{\text{Nombre de cals induits}}{\text{Nombre total d'explants cultivés}} \times 100;$$

c) Poids des cals ; le développement du poids des cals est enregistré à chaque repiquage, soit chaque 4 semaines.

d) Taille des cals : calculée selon la loi de Dale et Deambergio, 1979.

$$\text{Surface des cals en mm}^2 = \frac{D1 \times D2}{2} \times 3.14$$

e) Taux d'embryons somatiques (pro-embryon) ;

$$\text{Taux d'embryons Somatiques (\%)} = \frac{\text{Nombre de cals embryogène}}{\text{Nombre total de cals induits}} \times 100$$

f) Taux de régénération ;

$$\text{Taux de plantules régénérées (\%)} = \frac{\text{Nombre de plantes régénérées}}{\text{Nombre total de cals induits}} \times 100 .$$

g) Nombre de plantules régénérés par cals.

4. Etude statistique :

Une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée pour chaque variable en utilisant le logiciel XLSTAT version 2010. Les moyennes des variables mesurées ont été groupées par le Test de NEWMAN-KEULS au seuil de probabilité de 5%.

III. Résultats et discussion

a) **Temps d'induction de la callogénèse :**

Parmi les facteurs qui contrôlent le développement de la callogénèse on cite ici le temps d'induction. L'observation du développement des amas cellulaires mais en évidence enregistre une rapidité de développement.

Tableau.2 : Temps nécessaire à l'induction de la callogénèse des six variétés de blé dur.

Variétés (blé dur)	Temps d'induction (jours)
Waha	3 jours
Guemgoum Rhem	3 jours
Belioni	4 jours
Adnan-2	5 jours
Beni mestina	5 jours
Adnan-1	4 jours

L'observation du développement et la prolifération d'amas cellulaires est observé après 3 jours de mise en culture chez les variétés Waha et Guemgoum Rkhem ; 4 jours chez Belioni et Adnan-1, et 5 jours chez Beni mestina et Adnan-2. Ces résultats sont en accord

avec les travaux réalisés par Malik et al., 2003, lors de la mise en culture des embryons matures sur milieu MS le développement débute après 5 jours et varie d'une variété à une autre, ainsi que par les travaux réalisés par Tam et al., 2003 ;Dagutu.,2008, Bouiamrine et al.,2012, Mehmood et al., 2013 confirme que l'initiation de la callogénèse commence à partir du troisième jusqu'au septième jour de la mise en culture. La prolifération dure jusqu'à 4 semaines d'incubation.

b) Taux de la callogénèse :

Le pourcentage d'induction est réalisé depuis la mise en culture jusqu'à la fin de la phase d'induction. Cette période correspond selon (Dale et Deambrogio.,1979) à 30 jours après l'inoculation . De même, il a été suggéré par (Halperin.,1967) que c'est pendant la première phase de l'initiation des cultures que certaines cellules pouvaient acquérir la capacité d'exprimer leur totipotence, la phase d'induction de la callogénèse est l'une des l'étapes clés pour la réussite de la culture cellulaire (Mehmood et al., 2013).

L'efficacité de la callogénèse a été mise en évidence par le calcul du nombre de calcs induit par rapport au nombre total d'embryons mis en culture (Tableau.3). La réussite de l'induction de la callogénèse à partir d'explants est contrôlée par plusieurs facteurs ; différents travaux ont été établis sur ce sujet. Le milieu de culture le plus adéquat pour la réussite de l'induction de la callogénèse est celui de Murashigue et skoog, 1962, les travaux réalisés récemment par Shafi et al.,2010 , Mehmood et al.,2013, Shukla et al.,2014 ont mis en évidence que le milieu MS est le meilleur milieu pour l'induction de la callogénèse. La sélection du milieu MS comme un milieu optimal a été établi après une comparaison entre plusieurs milieux, notamment le milieu LS (Linsmair et Skoog., 1965),le milieu N6 le milieu B5 (Gamborg et al.,1968) et le milieu N&N (Nitsch et Nitsch., 1969). Lors de l'induction de la callogénèse à partir d'embryon mature sur ces différents milieux, des réponses positives ont été enregistrés. Cependant le plus haut taux de réponses a été enregistré sur le milieu MS, les essais sont répétées plusieurs fois afin de sélectionner le milieu MS comme un milieu adéquat à l'induction de la callogénèse à partir d'embryons matures. Le choix de l'explant joue aussi un rôle très important. En général l'explant le plus utilisé lors de la culture cellulaire est l'embryon immature, cependant l'obtention de l'embryon immature nécessite beaucoup de temps et il n'est pas disponible tout le temps. Pour cela, l'utilisation de l'embryon mature représente une bonne alternative pour la culture cellulaire. L'embryon mature est considéré comme un explant élite, au cours de différents travaux sur les différentes espèces de céréales. L'embryon mature est sélectionné comme l'explant principal (Galovic et al.,2010 ;

Farshadfar et al.,2012 ; Benderradji et al.,2012 ; Parmar et al.,2012) car il est disponible tout au long de l'année. Il nous permet de gagner du temps ainsi que les dernières recherches ont mis en évidence son efficacité lors des études de transformation pour les études qui nécessitent l'utilisation de l'ADN (Chawla, 2002 ; Patnaik et al.,2006). D'autres travaux réalisés sur le stade de développement de l'embryon ont montré que celui-ci est dans un stade de développement avancé plus que la germination donc la régénération est importante. Ces conclusions ont été prouvées par les travaux de (Bouiamrine et al.,2012) ou il a comparé le développement de l'embryogénèse et la régénération à partir d'embryon mature et immature. Les résultats obtenus ont démontré la supériorité de la capacité embryogène et régénérative de l'embryon mature par rapport à l'embryon immature, cela concorde avec les travaux de Aballah et al.,2012.

L'un des facteurs le plus importants lors de l'induction de la callogénèse est l'addition d'un régulateur de croissance spécifique, les travaux de (Mendoza et al., 2002) ont démontré que le développement de la callogénèse est fortement influencé par l'addition et la concentration de l'auxine ; différents travaux ont été réalisées afin de sélectionner la concentration et le régulateur de croissance le plus favorable à la formation de cals à partir d'embryons matures. Plusieurs régulateurs de croissance et combinaisons hormonales ont été testés, le régulateur le plus adéquat à l'induction de la callogénèse est représenté par une auxine et qui est L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique noté 2.4-D qui a été sélectionné comme l'hormone exogène le plus efficace pour l'induction de la callogénèse chez plusieurs espèces : *Eleutherococcus sessiliflorus*, *Gymnema silvester*, *Holestemma ada-kodien*, *Paspalum scrobiculatum*, *Andrographis paniculata*, (Choi et al.,2002, Kumar et al.,2002, Martin,2004)(Filippov et al.,2006) ont mis en évidence la supériorité du 2.4-D pour l'induction de la callogénèse chez les différentes espèces de blé. Pour cela, lors de notre expérience de culture sur le blé dur (*Triticum durum*) nous avons utilisé le 2.4-D comme régulateur principal pour l'induction de la callogénèse. En général le 2.4-D est utilisé en faible concentration de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-9} M, à forte concentration le rôle du régulateur se transforme en inhibiteur de développement cellulaire (Malik et al.,2003). Sur cette base la concentration utilisée lors de notre essai est de 3.5mg/l soit, cette concentration est la plus favorable au développement de la callogénèse chez le blé dur. le taux d'induction de la callogénèse a été très fortement enregistré lors de différents travaux réalisés sur le blé dur, notamment ceux effectués récemment par Malik et al.,2003 ou il a additionné au milieu de cultures différentes concentrations de 2.4-D (1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0 mg/l), les résultats obtenus mettent en évidence qu' une concentration de 3.5mg/l de 2.4-D donne le taux le plus

élevé d'induction de cals à partir d'embryons matures, des résultats similaires ont été notés par Ayolié et al.,2007, lors de leurs étude , il se sont basé sur une comparaison entre les conditions nécessaires à l'induction de cals à partir d'embryons matures et immature. Les données indiquent que le développement de cals à partir d'embryons matures commence à partir d'une concentration de 1.5mg/l de 2.4-D, cependant les embryons matures ont besoin d'une concentration minimale de 3.5 mg/l de 2.4-D, ces résultats sont confirmés par Rashid et al.,2009 ou il a démontré que l'augmentation de la concentration du 2.4-D de 2mg/l a 3.5mg/l améliore clairement le taux d'induction de cals chez toutes les variétés utilisées, ainsi que les travaux effectués par Munazir et al.,2010 attestent qu'une concentration optimale entre 3.5mg/l et 5mg/l est indispensable pour le développement d'un taux important de cals à partir d'embryons matures des différentes espèces de blé. Notant aussi que la concentration nécessaire du 2.4-D à l'induction de la callogénèse peut varier d'une espèce à une autre et d'une variété à une autre (Shafi et al.,2010).

Les six variétés de notre recherche ont subi les mêmes conditions de culture, cependant des résultats différents ont été enregistrés lors de l'induction. La variété Guemgoum Rkhem possède le plus haut taux de callogénèse représenté par $85,1 \pm 3.25\%$, suivit par Beliouni et Adnan-2 et Beni mestina $76,91 \pm 8.09\%$, $76,66 \pm 7.82\%$ et $69,16 \pm 3.92\%$ respectivement, la variété Adnan-1 est celle qui a induit le taux le moins élevé égal à $34,70 \pm 2.81\%$, ce qui a mené au classement des variétés en deux groupes homogènes différents : (groupes A et B) (Tableau. 4, Figure.4) Ces résultats indiquent des différences génotypiques significatives. L'effet du génotype et son influence sur le développement du taux de la callogénèse a été largement démontré par plusieurs chercheurs ; on cite les travaux réalisés par Mendoza at al., 2002 qui se sont basés sur une comparaison entre la réponse de deux génotypes de blé tendre a 3 différents traitements d'auxines, les résultats obtenues montrent que chaque génotype répond différemment à chaque traitement les mêmes résultats sont obtenus par Yasmin et al. ,2009 qui a utilisé différentes combinaisons hormonales et ont démontré que le développement de cals est dépendant du génotype. L'influence du génotype sur le développement et le taux de la callogénèse a été largement étudié et confirmé par différents travaux Mitic et al.,2006, Shah et al., 2009, Shafi et al., 2010, Aydin et al.,2011, Bouiamrine et al.,2012.

Tableau.3 : Taux de la callogénèse obtenus durant trois essais *in vitro* des six variétés de blé dur.

Paramètres Variétés	Essai 1			Essai 2			Essai3		
	Nombre d'embryon mis en culture	Nombre de cals induits	Taux de cals induit (%)	Nombre d'embryon mis en culture	Nombre de cals induits	Taux de cals induit (%)	Nombre d'embryon mis en culture	Nombre de cals induits	Taux de cals induit (%)
Waha	42	34	81.67	42	29	69.48	42	26	63.82
Guemgoum Rkhem	42	35	83.67	42	33	80.33	42	38	91.3
Beliouni	42	28	66.66	42	39	92.86	42	30	71.21
Adnan-2	42	38	89.49	42	33	78	42	26	62.5
Beni Mestina	42	32	76.08	42	26	62.5	42	29	68.9
Adnan-1	42	16	37.03	42	13	31.57	42	15	35.52
Moyenne	252	183	72.61	252	173	68.65	252	164	65.02

Tableau.4 : Moyennes et écartypes des résultats de la callogénèse obtenus *in vitro* des six variétés de blé dur.

Variété	Moyenne ± SE*	Ecart type
Waha	71,63± 5.11 ^a	8,85
Guemgoum Rkhem	85,1±3.25 ^a	5,62
Beliouni	76,91±8.09 ^a	13,94
Adnan-2	76,66±7.82 ^a	13,54
Beni Mestina	69,16±3.92 ^a	6,793
Adnan-1	34,70±1.62 ^b	2,81

*(a,b...) indices de séparation des groupes homogènes par le test de NEWMAN-KEULS au seuil $\alpha=5\%$.

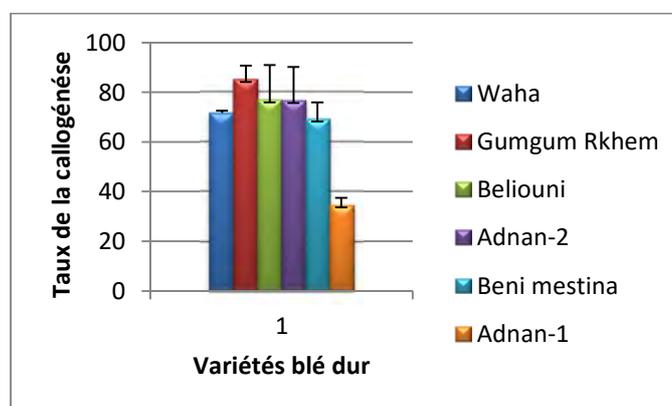


Figure.4: Réponses des six variétés de blé dur à la callogénèse.

c) Surface des cals :

La callogénèse est la néoformation d'un cal, tissu cellulaire indifférencié en division mitotique *in vitro* à partir d'explant. Cette formation résulte de la levée des corrélations lors du prélèvement de l'explant et d'un effet stimulant des substances trophique tels que le sucre, l'azote..., ainsi que des régulateurs de croissance, telle que l'auxine qui est indispensable à l'induction de la callogénèse *in vitro*, Le développement de cals est représenté par une propagation d'amas cellulaires indifférenciés, la taille des amas est contrôlée par la capacité callogène de chaque génotype, les six variétés de blé dur répondent favorablement à la callogénèse qui représente une des étape clé de la réussite de la culture et la régénération *in vitro*. Les tailles des cals des six variétés sont représentées comme suite (Tableau.5) :

Tableau.5 : Surfaces des cals de six variétés de blé dur calculé selon la loi de Dale et Deambergio, 1979.

Tailles et moyennes des cals en (mm ²)				
Variété	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Moyenne
Waha	2,24	2,24	2,79	2,42
Beliouni	2,41	3,14	2,79	2,78
Guemgoum Rkhem	2,24	1,96	3,14	2,44
Adna-2	3,86	5,1	2,26	3,74
Beni mestina	3,14	4,88	2,61	3,54
Adnan-1	5,23	3,53	5,02	4,59

Tableau.6 : Moyennes, ecartypes et groupes homogènes des surfaces de cals des six variétés de blé dur.

Variété	Moyenne ± SE*	Ecart type
Waha	2.42±0.1 ^a	0.31
Guemgoum Rkhem	2.78±0.1 ^a	0.36
Beliouni	2.44±0.2 ^a	0.61
Adnan-2	3.74±0.4 ^a	0.43
Beni Mestina	3.54±0.3 ^a	0.18
Adnan-1	4.59±0.3 ^a	0.92

*(a,b,...) indice de séparation des groupes homogènes par le test de NEWMAN-KEULS au seuil $\alpha=5\%$.

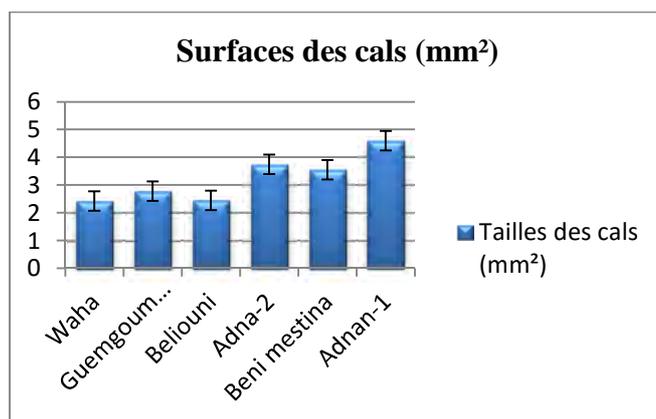


Figure. 5 : Surfaces des cals des six variétés de blé dur.

Pour le facteur taille des cals la modélisation des données par l'analyse ANOVA et le test **NEWMAN-KEULS** au seuil 5% ne donne aucune différence significative entre les six variétés, il classe les six variétés de blé dur en un seul groupe, cela veut dire que la réponse des variétés par rapport à leurs tailles ; ils répondent de la même façon. (Annexe 3). Les six variétés utilisées possèdent la même capacité callogène. La surface des amas se situe entre $2.42 \pm 0.1 \text{ mm}^2$ chez la variété Waha et $4.59 \pm 0.3 \text{ mm}^2$ enregistré chez la variété Adnan-1 (Tableau.6 et figure.5).

d) Poids des cals :

Dans notre cas, la pesée des cals peut nous donner des informations sur la capacité mitotique et callogène de nos variétés *in vitro* en un milieu témoin, les résultats sont représentés comme suit (Tableau.7 et 8, Figure.06). Le poids des amas cellulaires varie entre $0.33 \pm 0.03 \text{ g}$ chez la variété Adnan-1 et $0.86 \pm 0.14 \text{ g}$ chez la variété Beliouni.

Le poids des cals peut être représentatif de beaucoup de facteurs ; telles que la sensibilité ou une résistance d'une variété à un stress induit *in vitro*, tels que les travaux réalisés par Abousalim et al., 2002 ; Forooghian et al., 2013 où ils ont mis en évidence l'influence du NaCl sur le développement des cals ; l'effet des irradiations gamma qui sont un facteur important pour l'induction de variations somaclonales, peut être mis en évidence par l'étude d'évolution du poids des cals ; ce dernier est largement influencé par l'augmentation de l'intensité d'irradiation qui est expliquée par la capacité mitotique des cals qui est largement influencé par l'irradiation et la température. Cet aspect a été développé par les travaux de Beattie et al., 2008.

Le poids des amas cellulaire varie aussi d'un explant à un autre, en effet l'utilisation de différentes sources d'explants d'une plante médicinale (*Digitalis lanata*) a révélé que lors de mêmes conditions de cultures l'utilisation de différentes sources d'explants produits des amas cellulaires avec différents poids, l'étude *in vitro* de cette plante à intérêt médicale a pour objectif d'étudier le taux de production de molécules spécifiques. Le taux de production de ces molécules ont été évalués par le poids des cals, (Bosila et al.,2003) ; donc l'origine du poids des cals peut être dû à l'activité et la production des métabolites secondaires (Kuo et al.,2011 ; Hanus-Fajerska.,2012).

Le poids des amas cellulaires est aussi conditionner par les combinaisons hormonales utilisées lors de la cultures ainsi que les différentes compositions du milieu de culture tels que la source de carbone et d'azote (Debnath, 2013 ;Abu Bakar et al., 2014 ; Al masoody et al., 2015), ainsi que par la durée de la photopériode les travaux de Bosila et al.,2003 mettent en évidence la photoperiode adéquate à la meilleure capacité de production de cals qui est égale a (16h lumière/ 8 h sombre). La durée de la culture et le nombre de subculture agit aussi sur le poids des cals.

Tableau.7 : Poids des cals de six variétés de blé dur.

Poids et moyennes des cals en (g)				
Variété	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Moyenne
Waha	0.32	0.37	0.35	0.34±0.006
Beliouni	0.17	0.3	0.2	0.22±0.01
Guemgoum Rkhem	1.02	1.19	0.39	0.86±0.14
Adna-2	0.81	0.61	0.53	0.65±0.039
Beni mestina	0.78	0.65	0.78	0.73±0.020
Adnan-1	0.25	0.31	0.44	0.33±0.33

Tableau.8 : Moyennes, ecartypes et groupes homogènes des poids des cals des six variétés de blé dur.

Variété	Moyenne ± SE*	Ecart type
Waha	0.34±0.006 ^{bc}	0.020
Guemgoum Rkhem	0.22±0.01 ^a	0.055
Beliouni	0.86±0.14 ^c	0.34
Adnan-2	0.65±0.39 ^{b^c}	0.11
Beni Mestina	0.73±0.020 ^{ab}	0.06
Adnan-1	0.33±0.03 ^{abc}	0.079

*(a,b...) indice de séparation des groupes homogènes par le test de **NEWMAN-KEULS** au seuil $\alpha=5\%$.

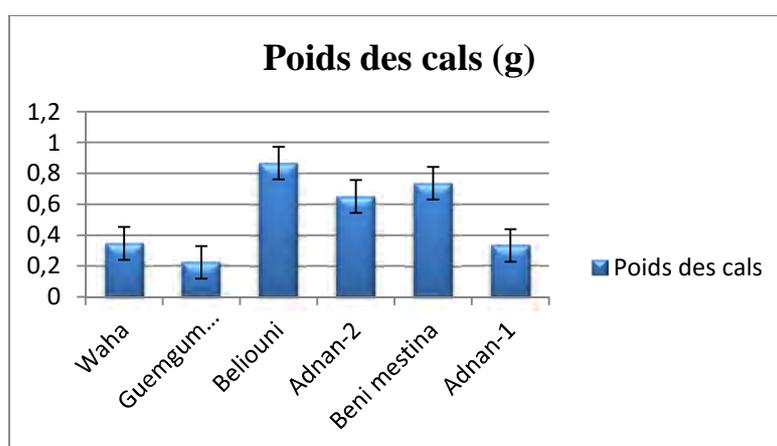


Figure.6 : Poids des cals des six variétés de blé dur.

Pour le facteur poids des cals la modélisation des données par l'analyse ANOVA et le test **NEWMAN-KEULS** au seuil 5% donne des différences hautement significatives entre les six variétés (Annexe 4) en les classant en groupes homogènes différents. La variété GuemgoumRkhem possède le poids le plus élevé d'où son classement seul dans le groupe A, suivit par la variété Beni mestina ; groupe B, les variétés Waha et Adnan-1 font partie du même groupe BC et la Variété Beliouni possède le poids le moins élevé en se classant dans le groupe C.

e) Taux d'embryons somatiques :

Après plusieurs semaines de culture sur milieu MS en présence de régulateur de croissance des cals embryogènes se démarquent par leurs textures qui se caractérisent en générale par une couleur transparente a une couleur crème avec un aspect friable liées à des structures embryogènes en forme de nodules qui se distinguent de structure principale du cal,

cependant les cals non embryogènes sont très vite remarqués par leur couleur blanchâtre avec un aspect compact, cette description est en accord avec les observations de Ozias-Aknis et Vasil,1982 qui ont été parmi les premiers travaux réalisées pour distinguer entre les cals embryogène et non embryogènes, ainsi que plusieurs travaux récents ont été établies sur ce principe de classification notamment on cite les travaux de Fazelienasab et al.,2004 ; Ayolié et al., 2007 ;Rashid et al.,2009 ; Shah et al.,2009 ; Narciso et al., 2010 ;Raziuddin et al.,2010 ; Aydin et al.,2011 ;Bouiamrine et al.,2012 ; Htwe et al.,2013 ; Mahmood et al., 2013 ; Shukla et al., 2014 ; Satish et al.,2015 . Qui ont suivi le même principe de classification. D'autres travaux d'études histologiques ont permis de faire les différences entre les cals embryogènes et non embryogènes. Les cals non embryogènes se caractérisent par un aspect mucilagineux avec une apparence lisse, ce type de cal se nécrose et ne se transforme pas en cal embryogène ; tandis que les cals embryogènes possèdent une apparence nodulaire composé spécifiquement de cellules avec un cytoplasme dense et un noyau qui comporte des nucléoles bien développées et le rapport entre taux de nucléoles/ taux de cytoplasme est bien haut qui indique la présence d'une zone meristématique qui peut se développer en embryons somatiques. Les cals non embryogène se caractérisent par de grandes cellules avec des noyaux obscures. Alcantara et al.,2014. Choi et al.,1999 ; Gatica-Arias et al., 2008 ont démontré que l'induction de cals embryogènes nécessite plusieurs sub-cultures, ainsi qu'une combinaison hormonale bien adéquate est indispensable au développement d'embryons somatic. (Lima et al.,2001).

Suivant les descriptions précédentes les cals obtenus après une callogénèse de plus de 12 semaines de culture ainsi que de plusieurs repiquages, ont été classés. Le nombre de cals embryogènes de chaque variété a été enregistré et noté comme suit :

Tableau.9 : Taux de cals embryogènes induits chez les six variétés de blé dur.

Paramètre Variétés	Essai 1			Essai 2			Essai3		
	Nombre de cals induits	Nombre de cals embryogène	Taux de cals embryogène induit (%)	Nombre de cals induits	Nombre de cals embryogène	Taux de cals induit (%)	Nombre de cals induits	Nombre de cals embryogène	Taux de cals induit (%)
Waha	34	29	84.61	29	19	67.21	26	19	71.32
Guemguom Rkhem	35	33	93.33	33	30	89.54	38	34	90.21
Beliouni	28	24	88.09	39	33	86.32	30	23	75.32
Adnan-2	38	26	68.08	33	19	59.36	26	12	45.21
Beni Mestina	32	15	47.61	26	10	39.54	29	12	43.21
Adnan-1	16	10	65.21	13	9	67.21	15	11	71.36
Moyenne	183	137	74.86	173	120	69.36	164	111	67.68

Tableau.10 : Moyennes, écartypes et groupes homogènes des poids des cals des six variétés de blé dur.

Variété	Moyenne ± SE*	Ecart type
Waha	74,38±3.03 ^{bc}	9,09
Guemgoum Rkhem	91,03±0.67^a	2,02
Beliouni	83,24±2.30 ^{ab}	6,92
Adnan-2	57,55±3.84 ^{cd}	11,54
Beni Mestina	43,45±1.34^e	4,04
Adnan-1	67,93±1.04 ^d	3,14

*(a,b,...) indice de séparation des groupes homogènes par le test de **NEWMAN-KEULS** au seuil $\alpha=5\%$.

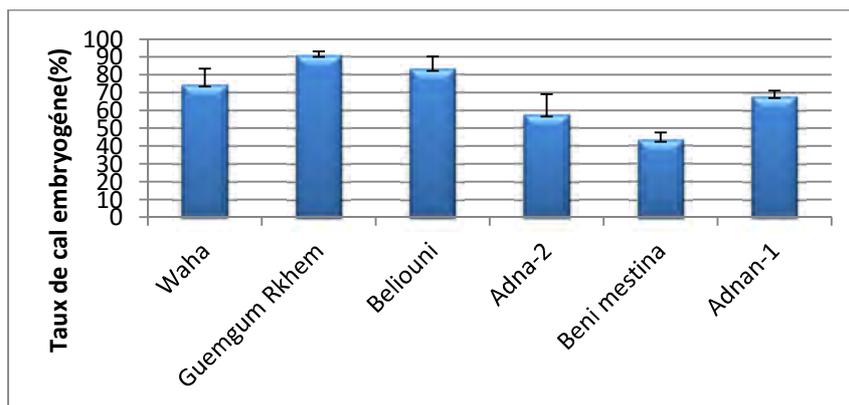


Figure 7 : Taux de calcs embryogènes induits sur milieu MS+ 3.5mg/l 2.4-D après 12 semaines de culture.

L'examen des résultats obtenus par l'analyse ANOVA et le test **NEWMAN-KEULS** au seuil 5% donne des différences hautement significatives (Annexe 5) entre les six variétés en les classant en six groupes différents : le premier groupe (a) comporte la variété Guemgum Rkhem avec un taux de production de calcs embryogènes qui s'élève à 91.03 ± 0.67 , cette variété est considéré comme une variété très performante à la production de calcs embryogène, suivit de la variété Beliouni avec une taux de production de calcs embryogènes de $83,24 \pm 2,30$ groupe (ab), la variété Waha fait partie du troisième groupe (bc) avec un taux de calcs embryogènes de $74,38 \pm 3,03$, le quatrième groupe (d) est représenté par la variété Adnan-1 avec un taux de $67,93 \pm 1,04$, le groupe (cd) est le cinquième groupe qui comporte la variété Adnan-2 avec un taux de $57,55 \pm 3,84$, est la variété la moins embryogène qui produit le plus faible taux de calcs embryogène est représenté par la variété Beni mestina avec un taux de $43,45 \pm 1,34$ et qui fait partie du groupe (e). Donc dans notre étude la variété Beliouni est la variété la plus performante à l'embryogénèse somatique, tandis que la variété Beni mestina est la moins performante (Tableau.10, Figure.07).

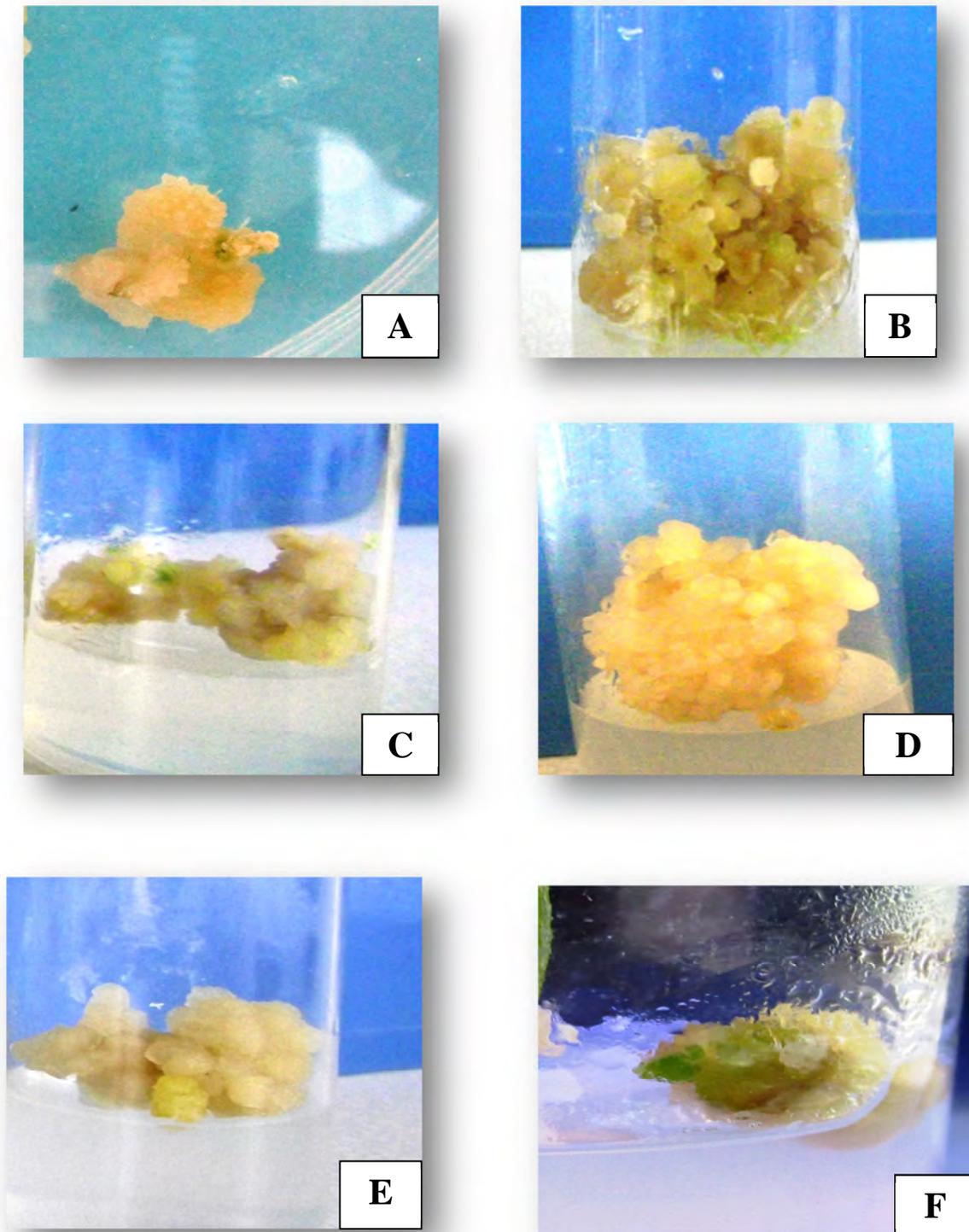


Figure.8 : Cals embryogènes issus des six variétés de blé dur. **A** : Cal embryogène issue de la variété Waha. **B** : Cal embryogène issue de la variété Guemgoum Rkhem. **C** : Cal embryogène issue de la variété Beliouni. **D** : Cal embryogène issue de la variété Adnan-2. **E** : Cal embryogène issue de la variété Beni mestina. **F** : Cal embryogène issue de la variété Adnan-1.

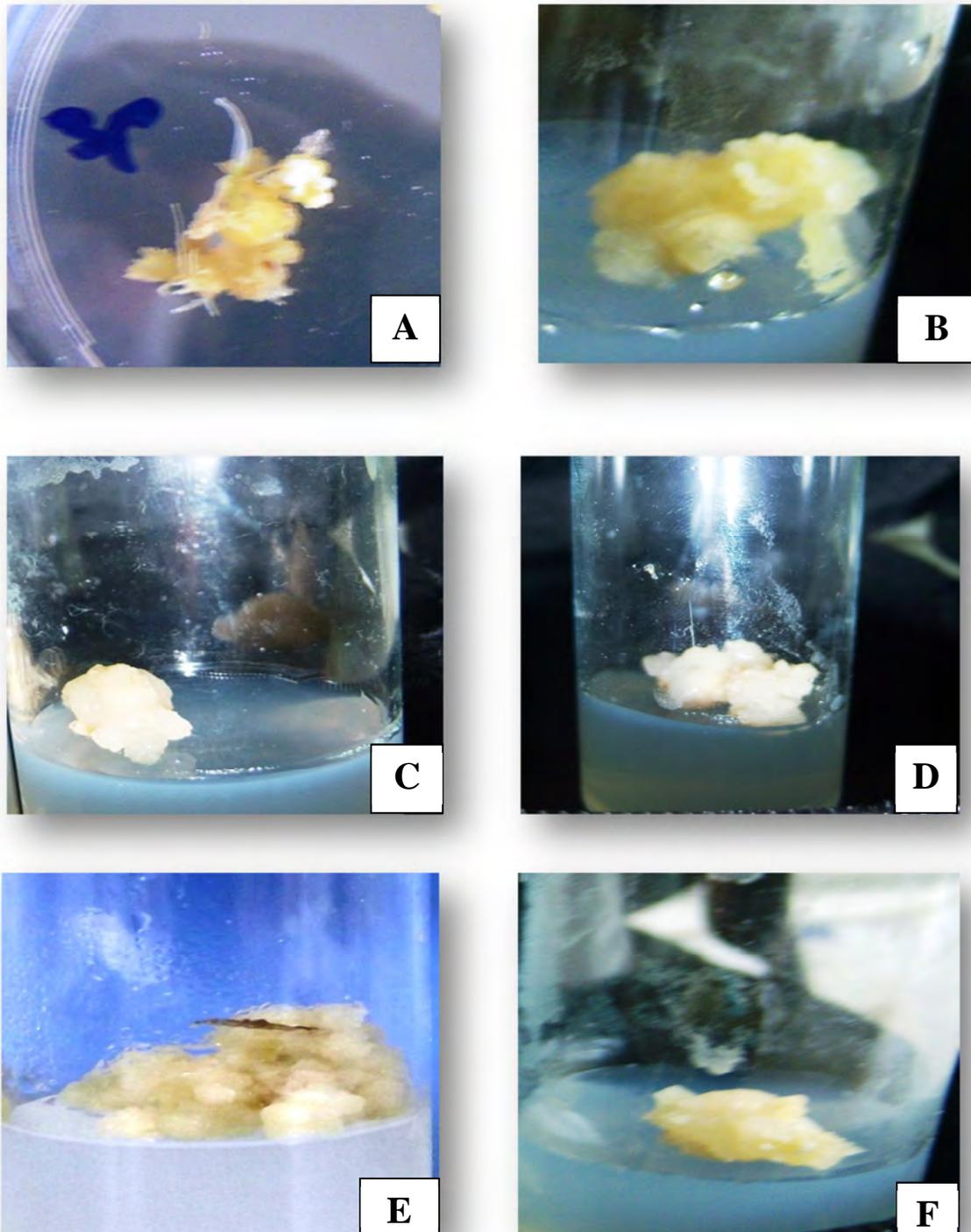


Figure.9: Cals non embryogènes issus des six variétés de blé dur. **A** : cal non embryogène issue de la variété Waha. **B** : Cal non embryogène issue de la variété Adnan-2. **C** : Cal non embryogène issue de la variété Beliouni. **D** : Cal non embryogène issue de la variété Guemgoum Rkhem. **E** : Cal non embryogène issue de la variété Beni mestina. **F** : Cal non embryogène issue de la variété Adnan-1.

f) Taux de la régénération :

L'étape de la régénération *in vitro* est la suite logique du développement des embryons somatiques. La capacité de régénération est différente d'une variété à une autre, elle est contrôlée par plusieurs facteurs le plus important est la combinaison et balance hormonale du milieu. La présence de tissus méréstématiques dans les embryons somatiques et la caractéristique de la totipotence cellulaire sont les raisons du pouvoir de développement de la régénération, l'indifférenciation des cellules méréstématiques donne la capacité à la culture *in vitro* de contrôler le développement des plantes entières grâce à l'ajout de régulateurs de croissance spécifiques au milieu de culture, les cellules méréstématiques seront différenciées et reprogrammées vers le développement de jeunes plantules.

Lors de notre expérimentation 3 combinaisons hormonales ont été testées sur la régénération des six variétés de blé dur, ces dernières n'ont pas donné les mêmes réponses, (Tableau. 11).

Tableau11 : Réponses des six variétés de blé dur à la régénération sur milieu MS additionné de 3 combinaisons hormonales différentes.

	Waha	Guemgouu Rkhem	Beliouni	Adnan-2	Beni mestina	Adnan-1
1/ MS/2+ 0.8mg/l NAA+ 0.36 mg/l Kinétine.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2/ MS+ 6mg/Zeatine MS+ 2mg/l BAP+0.5Mg/l Kinétine. (Houshmand et al.,2005)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3/ MS+2mg/l AIA+1mg/l Kinétine. (8 semaines de culture) -Subculture : MS/2+ 1mg/l Kinétine (4 semaines de cultures) (Ayolié et al.,2011)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Lors de l'utilisation de la combinaison 1 : MS/2+ 0.8mg/l NAA+ 0.36 mg/l Kinétine, après plus de 4/6 semaines de culture, les cals embryogènes des six variétés ne donnent aucune réponse, les cals restent à l'état embryogène et ne se différencient pas ce qui nous a mené à conclure que la réponse à la régénération est négative et la nécessité de l'utilisation d'une autre combinaison hormonale. Les mêmes résultats sont obtenus lors de l'essai de la Combinaison 2 : MS+ 6mg/Zeatine ou bien MS+ 2mg/l BAP+ 0.5Mg/l Kinétine. (Houshmand et al.,2005) l'auteur de cette essai a utilisé deux combinaisons différentes ; le comportement de ces variétés a été positif dans les deux combinaison, sauf que la réponse à la régénération a été à des taux différents, pour cela, les cals embryogènes de notre essai étaient divisés en deux pour essayer les deux combinaisons ; la réponse de nos cals embryogènes à la régénération a été négative. aucun cal n'a réagi à la culture, une troisième combinaison été nécessaire pour la réussite de la régénération. la combinaison 3 : MS+2mg/l AIA+1mg/l Kinétine. Pendant 8 semaines de culture pour la régénération et le développement des feuilles et tiges et une Subculture sur le milieu MS/2+ 1mg/l Kinétine pendant 4 semaines de cultures pour le développement des racines et la réussite de l'acclimatation. (Ayolié et al., 2011). Nos six variétés de blé dur ont répondu favorablement à la régénération à des taux différents ; donc la combinaison 3 est la bonne combinaison pour nos six variétés.

Vu que lors des essais avec les 3 combinaisons différentes, les auteurs de ces essais ont utilisé comme matériel végétal différentes variétés de blé dur, (*Triticum durum*), les réponses de nos variétés à la régénération sur les mêmes combinaisons hormonales ont été déficientes ; ils ont répondu négativement aux deux premières combinaisons tandis que leurs réponses à la troisième ont été positives, cela veut dire que pour la réussite de la régénération *in vitro* du blé dur il faut utiliser des régulateurs de croissance spécifiques avec une balance hormonale spécifique aux variétés cultivées ; cela veut dire que la réussite de la régénération dépend du génotype, cela a été prouvé par les travaux de (Ozgen et al.,1998 et Maddock et al.,1983) et qui sont en accord avec les travaux réalisées par (Afzal et al.,2010) ; le quel a obtenu des réponses différentes avec ses variétés de blé tendre (*Triticum aestivum*) régénérées grâce à différentes combinaisons hormonales, la meilleure combinaison hormonale dans son essai été de : 0.1mg/l IAA+ 0.5 mg/l Kinétine et de 1 mg/l de 2.mg/l AIA, tandis que (Noor et al.,2009 ; Gill et al., 2014) lors de leurs travaux sur l'obtention de la bonne combinaison hormonales et l'effet de l'explant pendant la régénération ont démontré que l'utilisation du TDZ lors de la régénération a donné des taux plus élevés de régénération que l'utilisation du BAP et IAA dans les travaux de Gill et al.,2014 tandis que précédemment les

travaux de Sabahat et al.,2009 ont conclu que la meilleure combinaison pour la régénération est 0.1 mg/L IAA, 0.5 mg/L BAP et 0.5 mg/L kinetin chez différentes variétés de blé tendre. Tandis que les travaux de (Bahman et al., 2012) prouvent que l'ABA est le régulateur le plus adéquat.

De la comparaison entre les résultats obtenus et les travaux précédents des différents chercheurs, la réussite de la régénération est dépendante des régulateurs de croissance ajoutés au milieu, et la balance hormonale adéquate reste dépendante du génotype utilisé.



Combinaison 1 :	Combinaison 2 :	Combinaison 3 :
MS/2+ 0.8mg/l NAA+ 0.36 mg/l Kinétine.	MS+ 6mg/Zeatine MS+ 2mg/l BAP+0.5Mg/l Kinétine. (Houshmand et al.,2005)	MS+2mg/l AIA+1mg/l Kinétine. (8 semaines de culture) -Subculture : MS/2+ 1mg/l Kinétine (4 semaines de cultures) (Ayolié et al.,2011)

Figure. 10 : Régénération *in vitro* obtenue des six variétés de blé dur sur milieu MS additionnée de trois combinaisons hormonales différentes.

Les résultats obtenus lors du troisième essai avec la combinaison 3 : MS+2mg/l AIA+1mg/l Kinétine. (8 semaines de culture)-Subculture : MS/2+ 1mg/l Kinétine (4 semaines de cultures) (Ayolié et al.,2011); ont été soumis à une analyse d'ANOVA, test de NEWMAN-KEULS au seuil 5%, les résultats obtenus sont notés comme suit :

Tableau.12 : Moyennes, écartypes et groupes homogènes des taux de régénération des six variétés de blé dur cultivé sur MS + combinaison hormonale 3

Variété	Moyenne \pm SE*	Ecart type
Waha	13.34 \pm 0.76 ^c	2.72
Guemgoum Rkhem	1.31 \pm 0.40 ^d	1.21
Beliouni	33.69 \pm 1.45 ^a	4.35
Adnan-2	24.74 \pm 2.49 ^b	7.48
Beni Mestina	5.44 \pm 0.70 ^{cd}	2.10
Adnan-1	5.72 \pm 0.62 ^{cd}	1.87

*(a,b...) indice de séparation des groupes homogènes par le test de **NEWMAN-KEULS** au seuil $\alpha=5\%$.

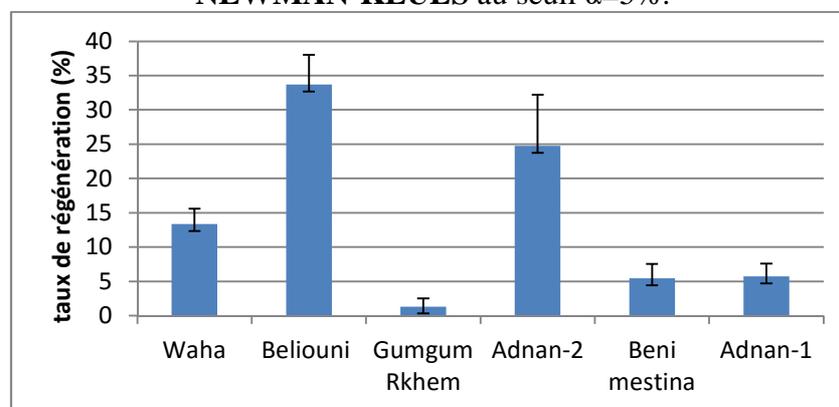


Figure. 11 : Taux de régénération des six variétés de blé dur cultivés sur milieu MS + Combinaison hormonale 3.

Pour le facteur taille des cals la modélisation des données par l'analyse ANOVA et le test **NEWMAN-KEULS** au seuil 5% donne des différences hautement significatives (Annexe 6) et classe les six variétés par rapport à leurs capacités de régénération en 5 groupes différents. La variété Beliouni est considérée comme la variété la plus performante à la régénération *in vitro* en présence de la combinaison adéquate (combinaison 3), cette variété occupe la classe a 33.36 \pm 1.45 % (Tableau 12 et Figure.11), par ordre de performance de régénération la variété Adnan-2 occupe le second groupe avec un taux de régénération égale à 24.74 \pm 2.49%, suivi par la variété Waha avec un taux de régénération de 13.34 \pm 0.76% en occupant le groupe C, puis le groupe cd comporte des variétés Beni mestina et Adnan-1 avec des taux de 5.44 \pm 0.70% et 5.72 \pm 0.62%, la variété Guemgoum Rkem est la variété qui répond le moins à la régénération en se classant dans le dernier groupe d avec un faible taux de régénération 1.31 \pm 0.40%.

g) Nombre moyen de plantules régénérés par cal :

Nous avons procédé à l'évaluation du nombre Moyen de plantules régénérés par cal régénérant pour les six variétés testées, vu que le pourcentage de régénération été faible. Le comptage à portée entre 3 à 7 cal suivant le pourcentage de régénération de chaque variété, on remarque que le rendement de plantules par cal est génotypiquement (Mzouri et al.,2001 ; Ibrahim et al.,2012) dépendant, le Nombre moyen de plantules régénérés par cal varie de (0 à 1 plantule/cal) chez les variétés Waha et Guemgoum Rkhem et Adnan-2 et entre (2 à 3 plantules chez les variétés Beni mestina, Beliouni et Adnan-1. (Tableau 13)

Tableau. 13 : Nombre de plantes régénérées par cal pour chaque variété de blé dur.

Nombres de plantes régénérées par cal			
Variété	Cal 1	Cal 2	Cal 3
Waha	1	0	1
Guemgoum Rkhem	0	0	1
Beliouni	3	2	1
Adna-2	3	3	2
Beni mestina	2	3	1
Adnan-1	1	1	1

Dans le cas présent, les cals embryogènes issus des six variétés de blé dur développent entre 0 et 3 plantules. L'identification des plantules sur cals se fait par l'observation de la formation de tiges principales qui se développent par la suite en plusieurs feuilles formant les plantules, chaque tige formée est identifiée comme plantule indépendante. La modélisation des résultats par une ANOVA met en évidence la présence d'une faible différence significative entre les cals issus des six différentes variétés testées.

L'écart de réponses des variétés à la régénération peut être expliqué par la présence d'hormones endogènes, qui en combinaison avec l'ajout d'hormones exogènes donne des comportements différents entre variétés. Cela démontre que l'utilisation de la même combinaison hormonale exogène n'induit par automatiquement les même repenses chez tous les génotypes. (Vendruscolo et al.,2008); les conditions génétiques et environnementales, peuvent influencer aussi la réponse des génotypes par rapport à la balance endogène et

exogène des régulateurs de croissance, qui ont la principale influence sur le développement de la plantule. Des recherches ont été établis spécifiquement sur différentes variétés de blé et qui ont démontré l'effet de la balance hormonale exogène sur la régénération *in vitro* de plantules. Il a été aussi démontré qu'il ya une interaction entre : génotypes, type d'explant, composition du milieu de culture et les conditions de culture des génotypes qui déterminent la capacité de régénération de chaque génotype.(Tamàs et al.,2004). Il a été démontré par li et al., 2003 que l'effet du génotype sur la capacité de régénération ne peut être démontré que par de simples changements dans la composition du milieu. D'autres pratiques sont nécessaires comme la transformation génétique.

h) Etude des corrélations entre les paramètres étudiés :

Pour quantifier l'aptitude des six variétés de blé dur testés à la culture *in vitro*, différentes corrélations ont été établies ;

- Corrélation entre le taux d'induction de cals et le taux de cals embryogène.
- Corrélation entre le taux d'induction de cals et le taux de la régénération.
- Corrélation entre le taux de cals embryogènes et le taux de régénération.

L'observation des figures (Figures 12,13et 14) nous a permis de mettre en évidence l'existence de corrélation entre les paramètres ainsi qu'une matrice de corrélation été établie afin de déterminer la corrélation positive ou négative des différents paramètres (Tableau.14).

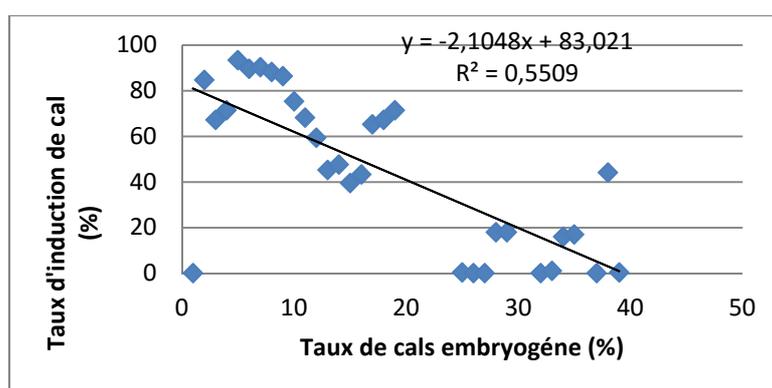


Figure.12 : Relation entre Le Taux d'induction de cal et le Taux de cals embryogène.

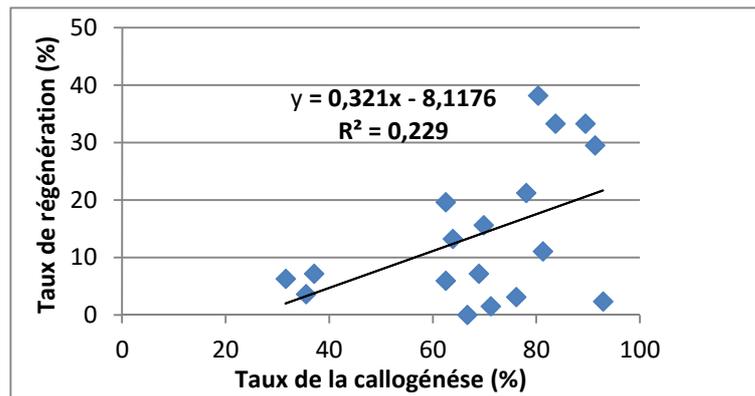


Figure.13 : Relation entre le taux d'induction de cal et le taux de régénération.

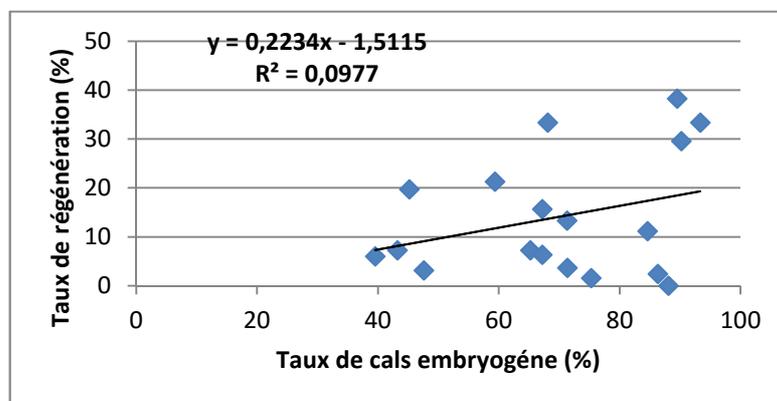


Figure.14: Relation entre le taux de cals embryogène et le taux de régénération.

Tableau.14 : Matrice de corrélations entre différents paramètres étudiés lors de l'étude de l'aptitude *in vitro* des six variétés de blé dur

	Taux d'induction	Taux de cals embryogène	Taux de régénération	NPRC
Taux d'induction	1			
Taux de cals embryogène	0,336366042	1		
Taux de régénération	0,478528009	0,31260861	1	
NPRC	0,118311631	-0,383822945	-0,243129005	1

L'analyse des Figure.12 et Figure14 met en évidence la présence d'une corrélation significative ($R^2=0.55^{**}$) entre le taux d'induction de cals embryogènes et le taux d'induction de cal. L'induction de cals est en relation avec la haute capacité mitotique des cellules méréstématiques présentent lors de la formation du cal. La relation entre le taux de production de cals et le taux de cals embryogènes est logiquement significative, plus les cellules possèdent un pouvoir mitotique élevé plus la chance de production de cals embryogènes est possible, ces résultats sont en accord avec les recherches réalisées par Brhadda et al.,2007, les auteurs de cette recherche ont réalisé une étude histologique qui confirme les résultats obtenus. Ceci donne une corrélation significative entre le taux de l'induction de cals et le taux de régénération, cela peut être le résultat du développement des cals embryogène en plantules. La corrélation entre le taux de cal embryogènes est faible mais significative avec le taux de régénération a $R^2=0.097^*$.

IV. Conclusion :

A travers l'analyse des résultats de ce chapitre, on confirme l'effet du milieu de culture, du génotype ainsi que la combinaison hormonale sur l'aptitude de nos génotypes à la régénération *in vitro*, la réponse des six variétés (Waha, Beliouni, Guemgoum Rkhem, Adnan-1, Beni mestina et Adnan-2) à la régénération est différente pour chaque paramètre, pour ce qui est du temps de réponse à la culture, la variété Waha et Guemgoum Rkhem développent au bout de 3 jours minimum des amas cellulaires, cependant la variété Adna-1 et Beliouni prennent plus de temps à développer des cals (4 jours), et le temps de réponse maximum est enregistré chez les variétés Adnan-2 et Beni mestina et qui est de 5 jours. Toutes les variétés répondent positivement à l'induction de la callogénèse cependant la différence se présente par rapport au taux d'induction, la variété Beliouni est celle qui induit le plus haut taux de cals, cependant, Adnan-1 présente le plus faible taux, tandis que, pour la surface des cals Adnan-1 présente la plus grande surface et GuemgoumRkhem la plus petite, par contre cette dernière présente le plus haut poids, et la variété Beliouni le plus faible poids. Le plus fort taux d'induction d'embryon somatique est enregistré chez la variété Guemgoum Rkhem et le plus faible chez la variété Beni mestina, ce qui était imprévisible pour la réponse à la régénération qui a été la plus élevé chez la variété Beliouni et très faible chez la variété Guemgoum Rkhem. Le nombre de plantules régénérées par cal représente aussi un paramètre important vis-à-vis de l'aptitude des plantes à la régénération *in vitro*, le plus haut nombre de

plantules régénérées est représenté par 3 plantules chez un cal issu des variétés Beliouni, Adnan-1 et Beni mestina.

L'étude de l'aptitude des différentes variétés à la culture *in vitro* représente une étape importante au développement de la culture cellulaire, l'exploitation des résultats obtenus permet de faciliter l'application d'autres techniques de biotechnologie telles que la transformation Bactérienne qui est à ce jour une des principales techniques de transformation chez les différentes espèces de céréales et qui permet le développement de nouvelles variétés avec des caractéristiques recherchées telles que l'introduction de gènes de résistances aux différentes contraintes biotiques ou abiotiques. Cet aspect a été récemment exploité par les travaux de (Habib et al.,2014) qui s'est basé sur une étude de l'aptitude de 26 variétés de blé tendre afin de sélectionner les 10 les plus performantes pour la suite de ses travaux sur la transformation via *Agrobacterium*.

Dans le présent travail de thèse, les résultats du chapitre de ' l'étude des réponses des variétés de blé dur à la culture *in vitro*', représente un chapitre clé pour la suite des travaux qui ont pour but d'étudier le comportement *in vitro* des six variétés en présence de différentes concentrations de NaCl et l'étude de développement d'éventuelles variations somaclonales.

*Chapitre III : Etude de l'effet du NaCl sur la Callogénèse,
le développement d'embryons somatiques et la
régénération in vitro des six variétés de blé dur*

I. Introduction

Le stress salin est l'un des majeurs stress abiotiques qui limite la production céréalière, spécialement en zones arides et semi-arides (Shannon, 1998 ; Wang et al., 2003 ; Zheng et al., 2010 ; Pérez-Clemente et al., 2012 ; Mantri et al., 2014). La défaillance en eau, l'irrigation avec une eau de mauvaise qualité ainsi que des sols salins sont les majeurs facteurs qui induisent le stress salin (Rengasamy, 2010). Face à ce problème, la sélection de variétés résistantes par des méthodes conventionnelles est défailante, car cela nécessiterait plus de dix ans pour la création d'une nouvelle variété.

Le recours à de nouvelles techniques de la biotechnologie, telle que la sélection par culture *in vitro* peut être la solution adéquate face à cette contrainte (Wang et al., 2003). La sélection et la création de nouvelles variétés par culture *in vitro* est plus rapide et permet l'exploitation de la variabilité génétique grâce aux multiples cycles de culture et l'application d'un agent sélectif spécifique à la contrainte qui doit être surmontée, ces derniers sont les principaux facteurs pour l'induction de variations somaclonales.

En effet, faces à ces différentes contraintes, les plantes développent divers modes d'adaptations, qui ne sont pas un phénomène simple (Shannon et al., 1999). La présence de NaCl dans le milieu nécessite l'interaction de plusieurs caractères physiologiques et biochimiques, qui se traduit par l'alimentation de la plante en cations majeurs, tels que le potassium K^+ et calcium Ca^+ (Zid et Grignon, 1991 ; Zhu *et al.*, 1998) et l'exclusion des ions toxiques tels que le Na^+ et Cl^- , donc le maintien du rapport entre ces ions permettra l'adaptation de la plante à un milieu salin.

Sur ce principe, une embryogénèse somatique à partir d'embryons matures de six variétés de blé dur a été réalisée, afin d'étudier l'effet de différents niveaux de stress salin sur la régénération *in vitro* des six variétés étudiées. L'impact des différentes concentrations du NaCl a été mis en évidence à travers une étude *in vitro* et le dosage des ions Na^+ et K^+ en présence et absence de NaCl. L'application du stress est réalisé grâce à deux différentes approches. La première approche consiste à l'application du stress en un gradient de concentration. La deuxième approche consiste à l'application directe de plusieurs concentrations du NaCl.

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

Dans ce cadre d'étude, le but de ce présent chapitre est :

- Mettre en évidence l'effet de différentes concentrations de NaCl lors des différentes étapes de la régénération *in vitro* par embryogénèse somatique du blé dur.
- Etude de l'effet du stress salin par un dosage des ions Na⁺ et K⁺.
- Sélectionner les variétés les mieux tolérantes aux stress salins.

II. Matériel et méthodes

1. Matériel végétal :

La présente étude représente une suite de manipulation du chapitre précédent, donc le matériel végétal est le même. il est représenté par les six variétés du blé dur utilisées précédemment pour l'étude du comportement de ces dernières *in vitro*.

2. Mise en place pour l'induction d'une embryogénèse somatique et la régénération *in vitro* en présence de NaCl :

L'essai a été conduit au sein du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale (GBBV) de l'université des frères Mentouri Constantine durant la période 2013/2014.

L'induction et la réussite d'une régénération *in vitro* par embryogénèse somatique, nécessite des conditions de culture très hautement contrôlées, les mêmes conditions concernant la préparation du milieu, la stérilisation des graines, la stérilisation du matériel utilisé, les conditions de culture, ainsi que la durée et le nombre de repiquages, ont été clairement cités lors du Chapitre II.

Cependant l'addition de l'agent sélectif NaCl au milieu de culture (MS) est la particularité d'étude du présent chapitre ; l'addition de cet agent est effectuée suivant deux méthodes :

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

A. Application du stress salin par addition successives de différentes concentrations progressives de NaCl :

i. Principe général :

Le principe général de cette méthode est d'appliquer le stress à travers une addition progressive de différentes concentrations de NaCl. Afin de tester l'effet du NaCl ainsi que la capacité de résistance des six variétés ; les principales concentrations utilisées sont : 0, 4, 8 et 16g/l, équivalant respectivement à une concentration de (0 mM, 68 mM, 137 mM et 273 mM) un repiquage successif est réalisé chaque quatre semaines de culture. Les amas cellulaires (cals) proliférés après quatre semaines de culture sur un milieu MS en absence de NaCl, sont progressivement transférés sur des milieux additionnés graduellement par différentes concentrations progressives de NaCl : M1 (MS+ 4g/l NaCl) ; M2 (MS+8g/l NaCl) ; M3 (MS+16 g/l NaCl). D'autres portions de cals sont parallèlement repiquées sur milieu témoin en absence du NaCl (MS + 3.5 mg/l de 2.4-D).

A la fin du processus de sélection progressive, les cals obtenues doivent passer par une étape de stabilisation des caractères de tolérance ou bien de sensibilité, pour cela les cals obtenus après le processus de sélection sont cultivés pendant 8 semaines sur milieu MS en absence de NaCl, puis 8 autres semaines sur Milieux additionné de 16g/l de NaCl ; les portions de cals témoins sont parallèlement repiqués sur un milieu témoin.

La sélection *in vitro* de la tolérance à la salinité au niveau des cals a consisté à rechercher et isoler des amas cellulaires capables de croître sur un milieu de culture en présence de concentrations croissantes en sel (NaCl). Ainsi, 756 portions de cals d'embryons matures, dont 126 cals par variétés, ont été utilisées. Ce nombre de répétitions a été réalisé en trois essais.

ii. Variables mesurés :

Lors de cette méthode plusieurs paramètres ont été étudiés afin de mettre en évidence l'effet du stress salin sur les six génotypes de blé dur et l'évaluation du mécanisme de tolérance.

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

1) Détermination de la croissance des cals (TC) :

Afin d'estimer l'étendue de l'adaptation des cals sélectionnés, les cals ont été récoltés et pesés, puis le taux de croissance du poids frais des cals a été calculé.

$$Tc = \frac{(Wf - W0)}{W0}$$

TC : Taux de croissance.

W0: Poids frais des cals après les 12 semaines de culture (après le passage progressif sur les différents niveaux de stress).

Wf : Poids frais des cals après les 16 semaines de stabilisation (après 8 semaines sur d'indépendance du NaCl suivit de 8 semaines de stabilité à 16g/l de NaCl).

2) Mesure de la teneur en eau(WC) :

Afin d'estimer la teneur en eau, après le passage par le test de stabilité, la masse de matière des cals est pesée avant (FW) et après (DW) leur passage à l'étuve à 80°C pendant 48 heures. La teneur en eau des cals a été calculée par la formule suivante :

$$WC(\%) = 100 \times \frac{FW - DW}{FW}$$

Wc : Teneur en eau.

Fw : poids des cals avant le passage par l'étuve.

Dw : Poids des cals après le passage par l'étuve.

3) Dosages des ions Na⁺ et K⁺ :

Afin d'évaluer la concentration des solutés inorganiques, les cals ont été rincées pendant 5 min dans de l'eau distillée froide pour éliminer le maximum de soluté présents sur les cals, Les cals ont été ensuite séchés à l'étuve à 80 °C pendant 48 h. L'analyse minérale a concerné des échantillons composites de cals. Des quantités de 200 mg de matière sèche ont été finement broyées en poudre et incinérées au four à moufle à 450 °C pendant quatre heures. Pour le dosage des ions sodium (Na⁺) et potassium (K⁺), les cendres

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

obtenues sont traitées par une solution de mélange d'acides (HCl 10 %, HNO₃ 10 %) puis chauffées pour activer la réaction. Les solutions obtenues sont jaugées à l'eau distillée à 100 ml sur lesquelles on dose Na⁺ et K⁺ par photométrie à flamme.

Lors du dosage par le photomètre à flux des dilutions étaient indispensables pour la réussite du dosage, pour cela, différentes dilutions ont été réalisés grâce à l'eau distillée.

B. Application du stress salin par addition direct de différentes concentrations de NaCl lors de la phase d'induction de la callogénèse :

i. Principe général:

Lors de cet essai, l'application de différentes concentrations de stress salin induit par le NaCl a été appliqué directement lors de l'induction de la callogénèse. L'addition du NaCl était établie lors de la préparation du milieu d'induction de la callogénèse ; pour se faire trois différents milieux ont été réalisés (Tableau.15) :

Tableau. 15: Composition des milieux de culture pour l'induction de l'embryogénèse somatique en présence de différents niveaux de stress salin.

Composition des milieux de culture

MS1	(MS+ 3.5 mg/l 2.4-D)
MS 2	(MS+ 3.5 mg/l 2.4-D+ 4g/l NaCl)
MS 3	(MS+ 3.5 mg/l 2.4-D+ 16g/l NaCl).

Le renouvellement du milieu de culture est réalisé chaque 4 semaines. Quatre repiquages sont réalisés. La culture est maintenue durant 16 semaines afin de mettre en évidence l'effet des différentes concentrations du NaCl sur l'induction de la callogénèse, l'obtention d'embryon somatique ainsi que la régénération de nouvelles plantules après l'application des différentes concentrations de NaCl. Ainsi, le même nombre d'embryons matures a été utilisé, soit 756 portions de cals d'embryons matures, dont 126 cals par variétés. Ce nombre de répétitions a été réalisé en trois essais.

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

Après la sélection des cals par apport aux différentes concentrations de NaCl utilisées, les cals embryogènes obtenus sont transférés sur le milieu de régénération sélectionné lors du chapitre précédent ; (MS+2mg/l AIA+1mg/l Kinétine. (8 semaines de culture)- Subculture : MS/2+ 1mg/l Kinétine (4 semaines de cultures)) (Ayolié et al.,2011). Après cette étape une étape d'acclimatation est nécessaire pour la régénération complète des plantes et de futures études.

- ***Acclimations des plantes régénérées in vitro :***

Cette étape est indispensable pour l'étude de l'effet de la régénération *in vitro* par embryogénèse somatique et l'application de stress lors de cette dernière. Pour se faire, après 4 semaines de culture sur milieu de régénération, les racines des plantules obtenues, sont soigneusement rincées à l'aide d'eaux distillée stérile, afin d'éliminer totalement le milieu de culture, sous des conditions d'asepsie totale, les plantules sont transférées sur des petits pots de culture contenant une mixture de (3v : / 1:v) de terreau et de vermiculite qui sont préalablement stérilisés à l'autoclave pendant 20 min à 120C°, dans des sachets spécifiques. L'acclimatation des plantules doit se faire par un recouvrement par des sachets de polyéthylène transparent, pour le maintien de l'humidité. La culture est maintenue dans une chambre de culture avec une photopériode de 12h de lumière et 8h d'obscurité, à une température égale à 28±2 °C.

- ii. **Variables mesurées :**

Afin de mettre en évidence l'effet du stress salin sur l'induction et le déroulement de la callogénèse ainsi que la régénération *in vitro* la mesure de certains paramètres est indispensable :

- 1) ***Influence de différents niveaux de stress sur l'induction de la callogénèse :***

Le taux d'induction de cals sur les différents niveaux de stress induit par le NaCl est calculé suivant la formule :

- ***Taux d'induction de la callogénèse (%)*** =
$$\frac{\text{Nombre de cals induits}}{\text{Nombre totale d'explants cultivés}} \times 100;$$

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

2) Influence de différents niveaux de stress sur la production d'embryons somatiques :

Le taux d'embryons somatique est calculé à partir de cals produits sur les différents niveaux de stress (0, 4, 16g/l de NaCl) grâce à la formule suivante :

- **Taux d'embryons Somatique (%)** = $\frac{\text{Nombre de cals embryogène}}{\text{Nombre totale de cals induits}} \times 100$

3) Influence de différents niveaux de stress sur le taux de régénération :

L'effet du stress salin sur la régénération *in vitro* est évalué sur les différents niveaux de stress induit par le NaCl grâce à la formule suivante :

- **Taux de plantules régénérées (%)** = $\frac{\text{Nombre de plantes régénérées}}{\text{Nombre totale de cals induits}} \times 100$

4) Influence de différents niveaux de stress sur le nombre de plantes régénérées par cal :

Le nombre de plante par cal est réalisé par le recensement de plantes produites par cals induits sur les différents niveaux de stress.

3. Etude Statistique :

Une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée pour chaque variable en utilisant le logiciel XLSTAT version 2010. Les moyennes des variables mesurées ont été groupées par le Test de NEWMAN-KEULS, au seuil de probabilité de 5%.

III. Résultats et discussion

A. Application du stress salin par addition successives de différentes concentrations progressives de NaCl :

1) Détermination de la croissance des cals (TC) :

Après plusieurs semaines de culture et surtout lors du début de l'application du stress progressif, différents changements sont observés sur le développement de la callogénèse ; le premier aspect remarqué est la variation de la couleur des cals ; en effet cette variation est due à l'induction de stress. Différents travaux se sont concentrés sur cet aspect de réponse, une couleur de cal brunâtre (brun) est une réponse négative du stress, (Rochdi et al.,2003 ; Yacoubi et al.,2009). Cela implique que les variétés dont sont issues ces derniers, ont du mal à s'adapter au stress (cals sensibles). Par contre les cals d'une couleur jaunâtre (jaune pâle) sont les résultats des cals tolérants aux différents niveaux de stress, donc les variétés dont elles sont issues sont des variétés tolérantes au stress (Figure.16).

Un deuxième aspect est inséparable de l'aspect couleur, c'est la taille des cals. en effet, la taille des cals brunâtres sont de petites tailles, par contre les cals jaunâtre possèdent une taille supérieure. Donc la taille des cals est représentative de l'effet du NaCl sur le développement de la callogénèse.

Dans cette étude trois essais en parallèle (chaque essai est considéré comme répétition), ont été réalisés afin de déterminer la croissance des cals chez des cals témoins et stressés. Les résultats sont estimés et notés comme suit :

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

Tableau. 16: Moyennes et groupes homogènes du taux de Croissance (TC) en présence et absence de stress progressif chez les six variétés de blé dur.

Variétés	Taux de croissance TC (moyenne ± SE*)	
	Témoins	Stressés
Waha	0.32±0.039 c	0.07±0.039 c
Guemgoum Rkhem	0.15±0.027 c	0.06±0.015 c
Beliouni	1.54±0.28 a	0.70±0.01 bc
Adnan-2	0.57±0.28 ab	0.06±0.01 c
Beni mestina	1.27±0.31 a	0.08±0.03 c
Adnan-1	1.06±0.20 bc	0.19±0.06 c

*(a,b,...) indice de séparation des groupes homogènes par le test de NEWMAN-KEULS au seuil $\alpha=5\%$. n=3.

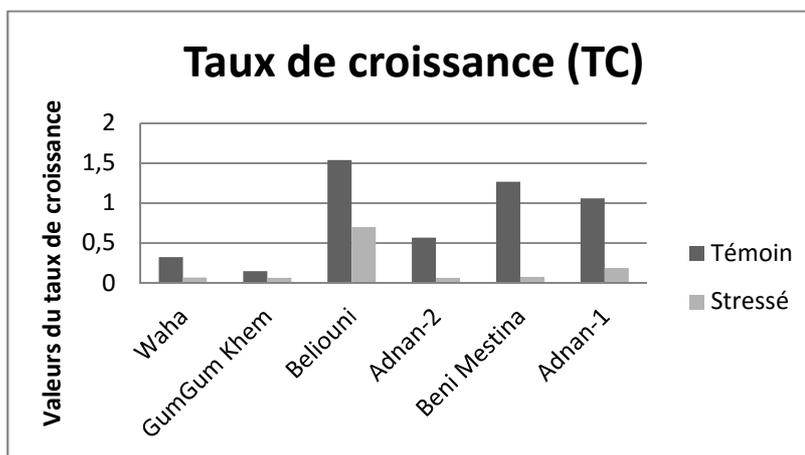


Figure. 15: Taux de croissance (TC) des cals issues des six variétés de blé dur en présence et absence d'un stress progressif de NaCl.

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

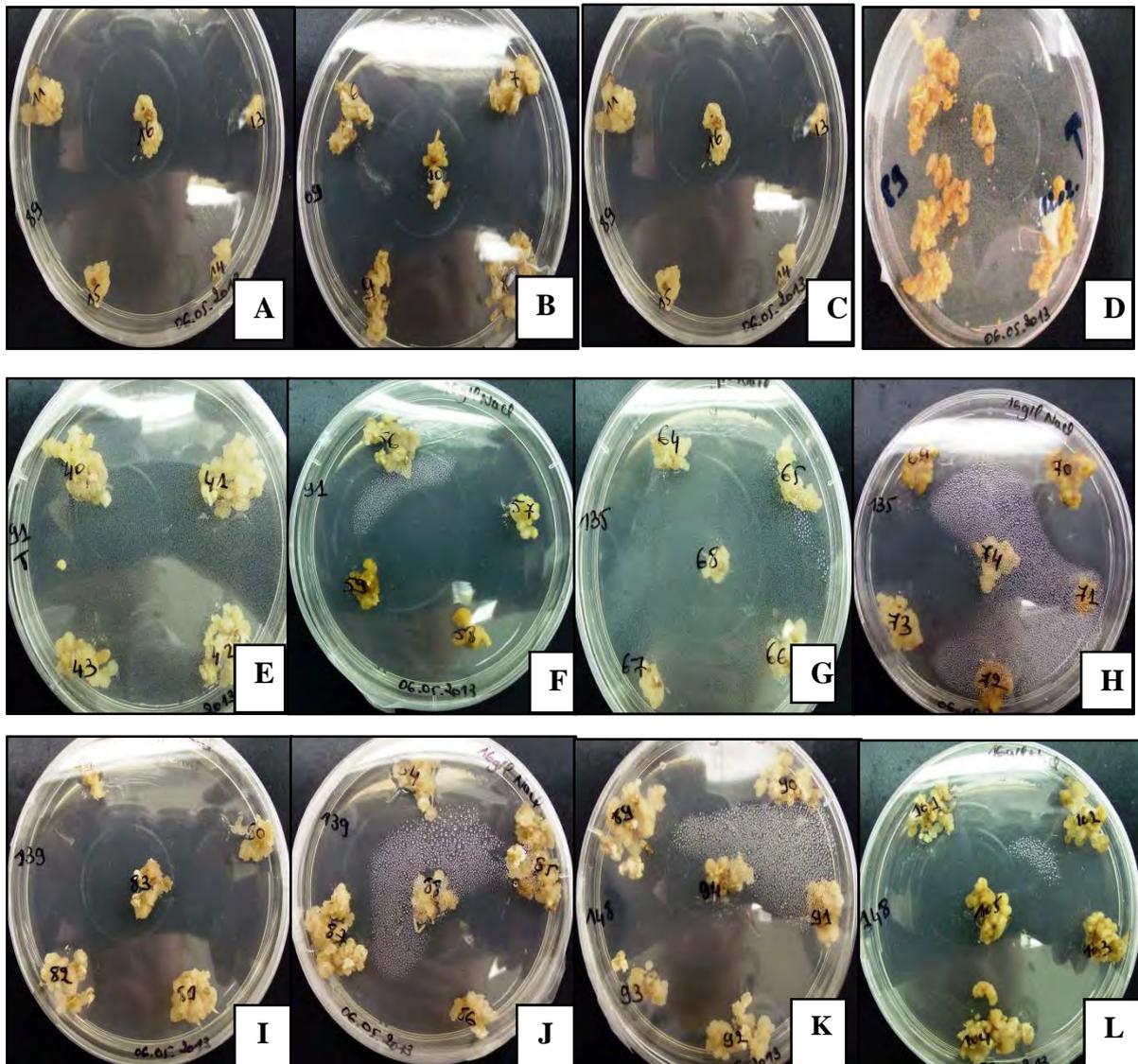


Figure. 16: Cals obtenus après passage par un stress progressif de NaCl et une étape de stabilisation. (A : Waha Témoïn, B : Waha en présence de stress progressif ; C : Guemgoum Rkhem Témoïn, D : Guemgoum Rkhem en présence de stress progressif ; E : Beliouni Témoïn, F : Beliouni en présence de stress progressif ; G : Adna-2 Témoïn, H : Adnan-2 en présence de stress progressif ; I : Beni mestina Témoïn, J : Beni mestina en présence de stress progressif ; K : Adnan-1 Témoïn, L : Adnan-1 en présence de stress progressif.

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

La comparaison du taux de croissance des cals cultivées sous stress progressif et en absence de stress, révèle l'effet du stress sur le développement de la callogénèse, cependant, le résultat obtenu démontre l'effet négatif du NaCl sur le Taux de croissance (TC). Les données des cals témoins sont notées comme suit : le TC le plus élevé est enregistré respectivement chez les Variétés Beliouni et Beni mestina (1.54 ± 0.28 , 1.27 ± 0.3) qui sont toutes deux regroupés dans le (groupe a), suivi par la variété Adnan-2 (0.57 ± 0.28) (groupe ab) et la variété Adnan-2 (1.06 ± 0.20) (groupe bc), les variétés Waha et Gemgoum Rkem présente le TC le moins élevé, noté respectivement (0.32 ± 0.039 , 0.15 ± 0.027) et font partie du même groupe homogène (groupe c). Cependant le taux de croissance obtenue en présence de stress progressif est inférieur à celui des témoins, les résultats sont notées comme suit : seul le taux de croissance des cals de la variété Beliouni est classé dans le groupe homogène bc (0.70 ± 0.01), cependant le taux de croissance des cals obtenus des variétés Waha, Guemgoum Rkhem, Adnan-2, Beni mestina et Adnan-1 sont tous regroupés dans le (groupe c) et qui sont clairement inférieur à celui de la variété Beliouni, les résultats sont respectivement notés (0.07 ± 0.039 , 0.06 ± 0.015 , 0.06 ± 0.01 , 0.08 ± 0.03 et 0.19 ± 0.06) (Tableau.16 et Figure.15). La différence négative entre le taux de croissance des cals témoins et cals cultivés en présence de stress progressif implique que les concentrations utilisées du NaCl affecte significativement de la callogénèse ($P < 0.0001$). En effet nos résultats sont confirmés par les données noté lors des travaux de (Oudija et al.,2002) qui a mis en évidence l'effet négatif du concentration élevée de NaCl. (Koutoua et al.,2012) a également utilisé un stress progressif et aussi observé l'effet négatif de ce dernier.

L'analyse des résultats obtenus par l'ANOVA et le test NEWMAN-KEULS au seuil 5% (Annexe. 8) révèle une différence très hautement significative entre les deux traitements et les réponses des six variétés (témoin et stressé) ($p < 0.0001$), ce qui a été confirmé par l'analyse du taux de croissance en ce qui concerne l'effet de l'interaction traitements x Génotypes, les différences sont significatives ($P < 0.005$), cela veut dire que les réponses des variétés au stress sont différentes, les mêmes conclusion ont été notées lors des travaux réalisés par Chetto et al.,2015 afin de sélectionner les variétés tolérantes d'agrumes. En effet lors de nos travaux, la variété Beliouni s'est avérée la plus tolérantes au stress, car sa réponse par rapport à la diminution du taux de croissance est inférieure à celle des autres variétés.

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

2) Mesure de la teneur en eau (WC) :

Les résultats obtenus par le calcul de la teneur en eau des cals témoins mettent en évidence la variabilité de la teneur en eau d'une variété à une autre. elle varie entre (89.57%) chez la variété Waha à (96.3%)chez la variété Guemgoum Rkhem, cette teneur est représentative du taux d'humidité des cals, cependant l'application du stress salin fait baisser le taux d'humidité chez toutes les variétés mais cette baisse reste relativement faible, elle est enregistrée entre 2.9% cher la variété Waha à 17.73% chez la variété Guemgoum Rkem(Tableau.17 et Figure.17). On remarque que cette baisse est négativement corrélée, la variété Guemgoum Rkhem qui possède la teneur la plus élevée s'affecte le plus par le stress, cependant la variété Waha qui a enregistré la teneur la moins élevée est faiblement affectée par le stress salin. Cela nous indique que plus la teneur en eau est élevé plus les tissus callogènes de cette dernière sont affectés par la présence de stress salin et qui reste largement faible. En effet certain travaux mettent en évidence l'indépendance du facteur teneur de l'eau par rapport à l'application du stress salin ; Almansouri et al.,1999 ont prouvé que la teneur en eau de certains variétés de blé n'est pas affectés par le stress salin.

L'analyse statistique de nos résultats par une modélisation de données par ANOVA et un test de NEWMAN-KEULS mettent en évidence la signification de nos résultats, en effet, lors de l'analyse l'interaction Variété x traitement par rapport à la réponse de la teneur en eau est faiblement significative ($P < 0.04$) (Annexe.8). En effet la présence de stress salin induit un mécanisme de tolérance spécifique pour l'ajustement d'une pression osmotique adéquate pour le bon développement de la plante (Zhu,2001 ;Munns,2002), ce qui explique le maintien d'un taux d'humidité qui reste élevé même en présence de stress salin. Ces résultats nous donnent un aperçu sur la capacité de la tolérance de nos variétés au stress progressif. Ces dernières, en présence de stress développent un mécanisme spécifique qui leur permet de tolérer l'addition progressive de NaCl. Le développement de ce mécanisme peut être favorisé par l'addition progressive de différents niveaux de stress, qui laisse le temps à la plante de s'adapter aux nouvelles conditions. Cette aspect est notamment cité dans les analyses de Munns, 2002 qui a mis en évidence la rapidité de la réponse au stress par la réduction de la croissance de différents organes végétaux, et cela s'applique aussi sur la croissance des cals. Comme on a noté précédemment le

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

développement de cals, qui est exprimé en taux de croissance (TC) diminue en présence de stress, et qui permet le maintien de la teneur en eau.

Tableau. 17 : Moyennes et groupes homogènes de la teneur en eau (WC) en présence et absence de stress progressif chez les six variétés de blé dur.

Variétés	Teneur en eau WC (%)(moyenne±SE)	
	Témoins	Stressés
Waha	94.42±0.33 ab	91.69±3.84 ab
Guemgoum Rkhem	96.3±0.34 a	79.23±3.73 b
Beliouni	89.57±0.77 ab	86.43±1.63 ab
Adnan-2	93.79±1.31 ab	89.69±2.52 ab
Beni mestina	90.91±3.45 ab	86.62±1.11 ab
Adnan-1	93.49±1.39 a	82.61±2.87 ab

*(a,b...) indice de séparation des groupes homogènes par le test de NEWMAN-KEULS au seuil $\alpha=5\%$.n=3.

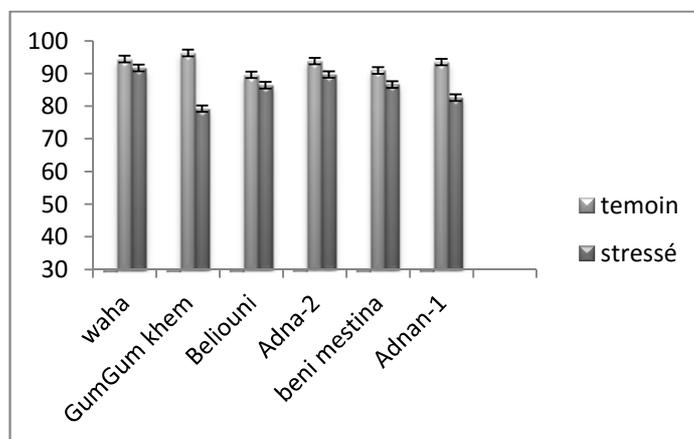


Figure. 17 : Teneur en eau (WC) de cals issues des six variétés de blé dur en présence et absence d'un stress progressif de NaCl.

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

3) Dosages des ions K^+ et Na^+ :

Les ions K^+ et Na^+ jouent un rôle primordial lors du développement d'un mécanisme de tolérance en présence d'une concentration élevée de NaCl. Face à ce stress, la réponse de nos variétés s'exprime à travers les résultats de dosages de ces ions, et qui sont notés comme suit (Tableau.18 et Figure.18) :

• **Teneur en K^+ :**

Tableau. 18: Moyennes et groupes homogènes de la teneur K^+ en présence et absence de stress progressif chez les six variétés de blé dur

Variétés	Teneur en K^+ (mg/g) (moyennes \pm SE)	
	Témoins	Stressés
Waha	24.17 \pm 0.75c	22.2 \pm 0.57ef
Guemgoum Rkhem	19.17 \pm 0.30f	17.11 \pm 0.41g
Beliouni	21.67 \pm 0.22de	20.62 \pm 0.22ef
Adnan-2	28.42 \pm 0.29a	24.17 \pm 0.56c
Beni mestina	26.7 \pm 0.58b	24.02 \pm 0.69c
Adnan-1	22.77 \pm 0.55cd	20.7 \pm 0.15ef

*(a,b...) indice de séparation des groupes homogènes par le test de NEWMAN-KEULS au seuil $\alpha=5\%$.n=3.

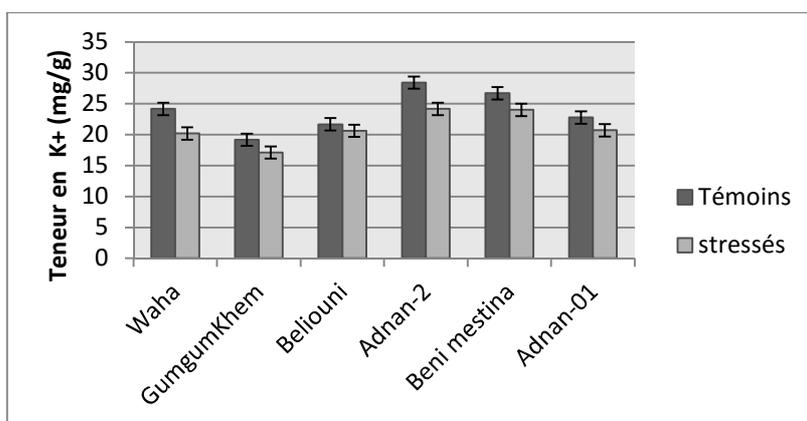


Figure. 18: Teneur en K^+ des cals issus des six variétés de blé dur en présence et absence d'un stress progressif de NaCl.

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

Les résultats obtenus lors du dosage du K^+ révèlent que la présence de stress salin affecte significativement la teneur en K^+ ($P < 0.0001$) (Annexe.8). En effet les cals s'appauvrissent en K^+ lors d'application de stress salin. Nos résultats sont en accord avec différents travaux réalisés sur différentes espèces, Solis-Marroquin et al., 2011 ont obtenu les mêmes résultats lors de l'induction d'embryogénèse somatique chez (*Capsicum Chinense* Jacq.). Cependant la carence en K^+ induira directement à la mort cellulaire, et l'arrêt du développement de la plante. Différentes recherches ont dévoilé le rôle primordiale du K^+ dans les différentes fonctions de la plante, cet ion est impliqué dans le contrôle de la pression de turgescence (Walker et al., 1996) et les fonctions connexes, élongation cellulaire ou mouvement cellulaire et il joue aussi un rôle, direct ou indirect, important dans la régulation d'activités enzymatiques. La synthèse des protéines, la photosynthèse et l'homéostasie du pH cytoplasmique. Ces différents rôles au niveau cellulaire impliquent le potassium dans des fonctions essentielles au niveau de la plante entière, comme par exemple le contrôle des échanges gazeux à travers la régulation de l'ouverture et de la fermeture des stomates. Donc la carence en K^+ affecte négativement le développement de la plante. Dans le cas présent d'étude, nous nous sommes intéressés à son rôle dans la régulation du potentiel osmotique.

Vu qu'en présence d'une concentration élevée de NaCl dans le milieu de culture, la teneur en K^+ a automatiquement diminué, mais les résultats obtenus précédemment révèlent la continuité du développement de la callogénèse. On remarque juste sur quelques cals des symptômes de nécrose (couleur brunâtre) qui sont le résultat d'augmentation de la production de superoxydes (Marschner et al., 1996) en carence de K^+ .

Cependant chez certains cals, la défaillance en K^+ n'est même pas remarquée car la plante a rapidement recouru à l'accumulation de Na^+ dans le cytoplasme. Ce mécanisme d'adaptation a permis la suite du développement de la callogénèse ainsi que la régénération *in vitro*. (Rai et al., 2011 ; Gupta et al., 2014).

- **Teneur en Na^+** :

L'analyse des résultats du Tableau.18 et Figure.19, nous informe sur le changement du comportement de l'accumulation du Na^+ en présence d'un stress salin. En effet en absence

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

de stress la teneur en Na⁺ est égale à (16.82±0.42, 18.43±0.54, 15.35±0.45, 15.83±0.48, 17.72±0.64 et 19.85±0.36%) respectivement pour les variétés (Waha, Guemgoum Rkhem, Beliouni, Adnan-2, Beni mestina et Adnan-1) tandis que en présence de stress ses valeurs augmente significativement (34.12±0.70., 26.85±3.75, 31.22±0.51, 39.22±0.33, 34.75±0.77 et 42.13±1.17%) respectivement pour les six variétés (Tableau.19 et Figure.19) en effet, la teneur en Na⁺ augmente significativement dans les cals en présence du NaCl (p< 0.0001) (Annexe.8), qui est vitale pour la plante, car la présence d'un stress salin induit directement une carence en K⁺, vu que le K⁺ rentre dans plusieurs fonctions nécessaires pour le développement de la plante, et notamment dans le maintien de la régulation du potentiel osmotique. Dans ce cas, le Na⁺ joue le rôle d'un bon osmoticum pour ajuster rapidement le potentiel osmotique en présence d'un stress salin. Il est probable que l'effet bénéfique du Na⁺ s'observe en particulier dans des conditions de carences de K⁺ (Jaboune, 2008). en effet nos résultats s'accordent avec cette hypothèse, et qui sont confirmés par différents travaux notamment ceux réalisés par Koutoua et al., 2012 ; Benderradji 2013.

Tableau. 19: Moyennes et groupes homogènes de la teneur Na⁺ en présence et absence de stress progressif chez les six variétés de blé dur.

Variétés	Teneur en Na ⁺ (mg/g) (moyennes ±SE)	
	Témoins	Stressés
Waha	16.82±0.42c	34.12±0.70b
Guemgoum Rkhem	18.43±0.54c	26.85±3.75b
Beliouni	15.35±0.45c	31.22±0.51b
Adnan-2	15.83±0.48c	39.22±0.33a
Beni mestina	17.72±0.64c	34.75±0.77b
Adnan-1	19.85±0.36c	42.13±1.17a

*(a,b...) indice de séparation des groupes homogènes par le test de NEWMAN-KEULS au seuil α=5%. n=3.

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

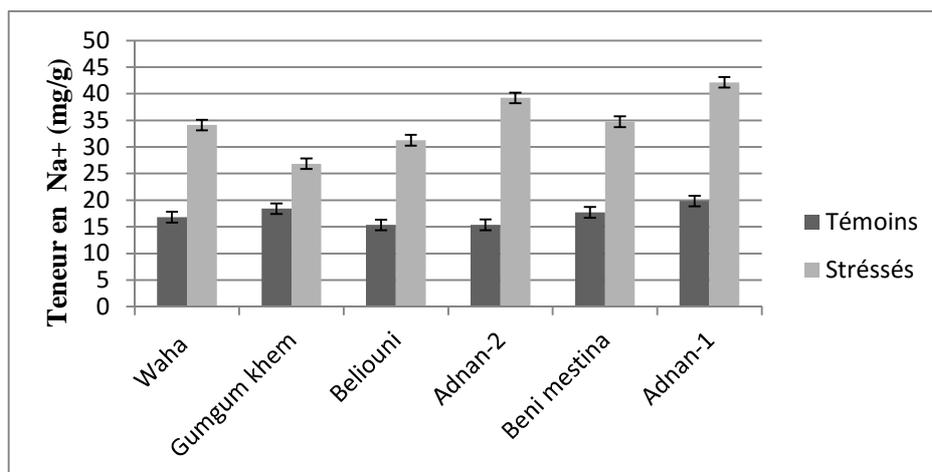


Figure. 19 : Teneur en Na⁺ des cals issus des six variétés de blé dur en présence et absence d'un stress progressif de NaCl.

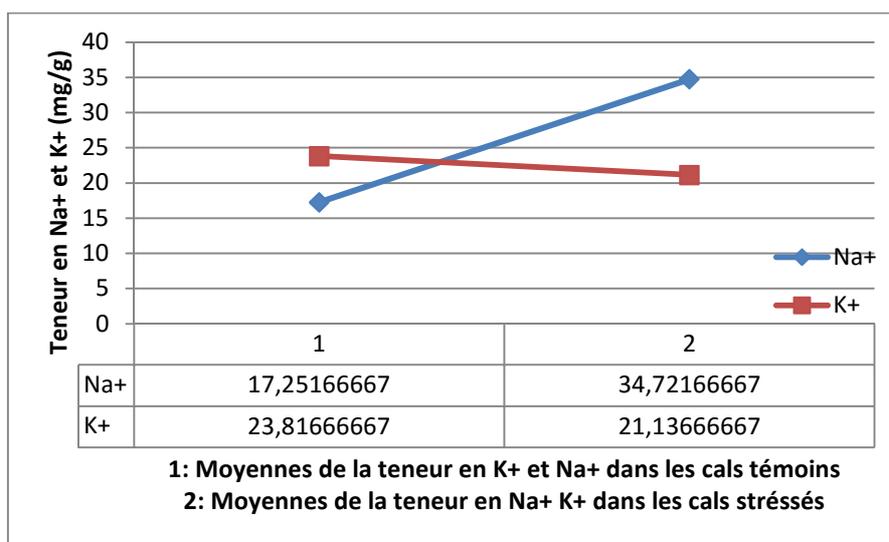


Figure. 20 : Réponses négativement corrélées des ions Na⁺ et K⁺ chez des cals issus d'embryons matures des six variétés de blé dur.

- **Rapport Na⁺/K⁺ :**

La comparaison de la moyenne de la teneur en Na⁺ et K⁺ dans les cals obtenus en absence de NaCl nous confirme que la teneur de K⁺ est plus importante que celle du Na⁺, car en conditions normales le K⁺ rentre dans le contrôle de plusieurs fonctions importantes de la cellule comme le contrôle de l'activité enzymatique, synthèse des protéines, la photosynthèse et l'homéostasie du pH cytoplasmique, comme il contrôle

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

aussi des fonctions connexes de la cellule comme l'élongation cellulaire, le contrôle des échanges gazeux à travers la régulation de l'ouverture et la fermeture des stomates ainsi que le contrôle de la pression de turgescence. En présence d'un stress salin dans le milieu de culture la diminution de la teneur en K^+ est enregistrée ce qui va causer des perturbations dans le développement cellulaire, un brunissement de cals est fortement remarquer. Cependant la teneur en Na^+ augmente en présence de NaCl, même si le Na^+ ne constitue pas un élément essentiel pour la plante, il peut remplacer le K^+ dans sa fonction de contrôle de la pression de turgescence, dans ce cas la plante peut l'utiliser avec profit et l'utiliser comme osmoticum vacuolaire. En conditions normales la concentration du Na^+ dans le cytoplasme doit être inférieure à celle du K^+ , sa toxicité est due à la compétition avec le K^+ . L'effet bénéfique du Na^+ est observé en carence de K^+ , dans ces conditions une accumulation contrôlée de Na^+ contribue probablement à assurer la pression de turgescence de la cellule. De plus une adsorption modérée de Na^+ peut être bénéfique s'il permet à la plante d'ajuster rapidement son potentiel osmotique au début d'un stress salin.

Dans le présent cas d'étude, les résultats obtenus nous indiquent qu'en présence d'un stress salin lors d'une embryogénèse somatique les cellules développent un mode de résistance qui permet un développement cellulaire normal en accumulant le Na^+ pour assurer l'ajustement du potentiel osmotique.

B. Application du stress salin par addition directe de différentes concentrations de NaCl lors de la phase d'induction de la callogénèse :

1. Influence de différents niveaux de stress sur l'induction de la callogénèse :

L'application de stress salin lors de l'induction de l'embryogénèse somatique influence significativement sur le taux de cals produits ($p < 0.0001$). Les résultats obtenus, démontrent qu'en présence de NaCl dans le milieu, le taux d'induction de cals diminue. En effet, on cite comme exemple ; le taux d'induction de cal de la variété la plus performante Gemguom Rhkem est égal à $85,10 \pm 3.25$ sur le milieu témoin. Cependant en présence de 4g/l et 16 g/l, ce taux diminue, il est de 61.35% et 34.40 % respectivement pour les deux concentrations. Les mêmes résultats sont enregistrés chez les six variétés, toutefois, le taux

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

de réponses varie d'une variété à une autre ($p < 0.0001$). (Tableau.19). Suite à ces réponses d'induction de callogénèse à partir d'embryons matures, on remarque que la réponse de nos explants dépend de la concentration du NaCl et du Génotype l'interaction de ces deux paramètres est significative ($p < 0.0001$). (Annexe.9)

Effectivement, les travaux réalisés par (oudija et al., 2002.a,b) lors de ces recherches sur l'étude de l'effet du NaCl sur le blé, les variétés utilisées lors de l'essai, répondent différemment à la culture. des travaux récemment réalisés sur le blé dur, maintiennent les mêmes conclusions (Ayolié et al.,2011 ;Hemaid et al., 2013 ; Ayed-Slama et al.,2015).

L'utilisation de concentrations élevées en NaCl affecte le taux de réponse à la callogénèse. Les résultats obtenus mettent en évidence l'effet négatif de ce dernier. Plus la concentration du milieu en NaCl est élevé, plus le taux d'induction diminue. Cela est remarqué à travers les moyennes obtenues à travers les trois niveaux de stress. Sur le milieu témoin , la moyenne d'induction est de 69.02 %, suivie de près par la moyenne de 61.35 % enregistrée sur le milieu additionné de 4g/l de NaCl, et de 34.40 % de cals induits en présence de 16g/l de NaCl (Tableau.19). Donc l'action du sel s'est donc traduite par une diminution progressive et significative du taux de callogénèse.

Cependant on remarque qu'en présence de concentrations élevées de NaCl, ce ne sont pas les variétés les plus performantes sur le milieu témoin qui détiennent le taux le plus élevé en présence de NaCl. Dans la présente étude la variété Beliouni répond le mieux à la culture en présence de NaCl avec le taux le plus élevé de (49,64±3.16%), suivi par Guegoum Rkhem, Beni mestina, Adna-2, Waha et adnan-1 avec des taux enregistrés respectivement (38,72±4.65%, 35,89±12.17%, 32,98±3.83%, 27,40±3.23% et 21.82% (Tableau.20). donc la variété Beliouni est considérée comme la plus tolérante aux concentrations élevées en NaCl.

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

Tableau 20: Moyennes et groupes homogènes de l'influence de différents niveaux de NaCl sur le taux d'induction de la callogénèse.

Variété	Taux d'induction de cals (%)		
	Témoins	Stressés 4g/l	stressés 16g/l
Waha	71,63±5.12abc	67,83±5.81abc	27,40±3.23ef
Guemgoum Rkhem	85,10±3.25a	86,34±2.69a	38,72±4.65def
Beliouni	76,91±8.08ab	60,14±3.13bcd	49,64±3.16cd
Adnan-2	76,66±7.83ab	69,98±4.82ab	32,98±3.83ef
Beni Mestina	69,16±3.93abc	62,11±2.32bc	35,89±12.17def
Adnan-1	34.70±1.63ef	21.73±0.51ef	21.82±1.67f
Moyenne	69.02	61.35	34.40

*(a,b...) indice de séparation des groupes homogènes par le test de NEWMAN-KEULS au seuil $\alpha=5\%$. n=3. (Moyenne \pm SE)

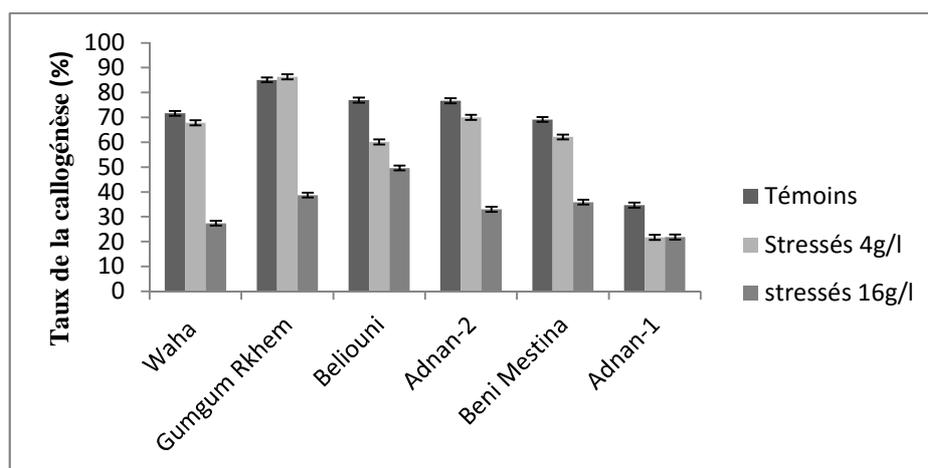


Figure. 21: comparaison du taux d'induction de la callogénèse issus d'embryons matures cultivés en absence et en présence (4, 16g/l) de NaCl.

2. Influence de différents niveaux de stress sur la production d'embryons somatiques : (Annexe. 9)

L'obtention de cals embryogènes et la formation d'embryons somatiques est l'une des principales étapes de la réussite de la régénération *in vitro* à travers l'embryogénèse somatique. La capacité à former des embryons somatiques est acquise à travers l'interaction entre l'explant et le milieu de culture. Les cellules issues de tissus

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

somatiques acquièrent leurs capacités embryogènes grâce au stimulant présent sur le milieu de culture. Selon l'étude de Féher,2008, les cellules de l'explant utilisées qui sont déjà différenciées doivent passer par un processus conduisant à l'obtention de cellules compétentes, cette compétence est définie comme l'aptitude à recevoir et/ ou à répondre à un signal de développement, qui est considéré comme un état physiologique, cellulaire et moléculaire nécessaire à la préparation de l'étape suivante du développement.

Dans la présente étude, le taux d'induction de cals embryogènes est largement affecté par la présence de concentrations élevées en NaCl. (Tableau.20 et Figure.22). L'analyse des résultats mettent en évidence les réponses hétérogènes des variétés aux différents traitements de NaCl. La capacité des différents génotypes à répondre aux différents traitements est significativement différente ($p < 0.0001$). (Annexe.9)

À travers une modélisation des données par ANOVA et un test de NEWMAN-KEULS au seuil 5%, un classement des différents groupes homogènes a été établi (Tableau.20), ainsi qu'une interaction significative entre la réponse des génotypes aux différents traitements a été mise en évidence ($p < 0.0001$) (Annexe.9). La variété Adnan-1 semble être la plus compétente à produire des cals embryogènes en présence de forte concentration de NaCl ; à une dose égale de 16g/l de l'agent sélectif, cette variété produit le taux le plus élevé en cals embryogènes. Tandis qu'en milieu témoin, la même variété induit un faible taux de cals. C'est le cas inverse pour la variété Waha sur le Milieu Témoin et en présence de faible concentration de NaCl (4g/l), le taux de formation de cals embryogènes est important ($61.45 \pm 1.30\%$), tandis que l'effet d'une forte dose de NaCl est fortement enregistré, il est égal à 2.60%, ce qui dévoile l'incapacité de cette variété à produire des cals embryogènes en présence de fortes concentrations de NaCl. tandis que les variétés (Guemgoum Rkhem, Beliouni, Adnan-2, Beni mestina et Adnan-1) produisent des taux assez importants de cals embryogènes en présence de 16g/l de NaCl, ils ont été enregistrés respectivement ($44.60 \pm 6.68\%$; $79.47 \pm 0.79\%$; $75.43 \pm 4.47\%$; $46.85 \pm 3.4\%$ et $73.07 \pm 0.7\%$) (Tableau.21 et Figure.22). Tandis que sur les milieux témoins et 4g/l de NaCl le taux de production de cals embryogènes se rapproche ou égal à celui du milieu additionné de 16g/l de NaCl.

Ce comportement peut être expliqué par des changements acquis par les génotypes lors de la culture cellulaire, cette capacité peut être un avantage ou bien un désavantage

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

pour le développement de la régénération des six génotypes de blé dur. Il a été clairement décrit que les longs cycles de la culture cellulaire, ainsi que la composition du milieu avec l'addition d'agents sélectifs, sont les principaux facteurs qui contrôlent le développement cellulaire (Simões et al., 2010). Dans le présent cas d'étude, la présence d'une concentration élevée de NaCl (16 g/l) a largement influencé la création de nouvelles bases de régénération. Ces changements peuvent expliquer sur le plan génétique par l'acquisition de nouveaux gènes qui redirigent le développement et la différenciation cellulaire. La création de nouveaux gènes peuvent être le résultat d'un remaniement chromosomique, des mutations ponctuelles. Il a été démontré par les travaux de Leroy *et al.*, 2001 sur la culture cellulaire de choux, les longs cycles de culture *in vitro* induisent ce genre de changement. Le même constat a été aussi observé dans des cultures cellulaires d'orge entretenues sur de longues périodes (McKnight *et al.*, 2002).

Ce changement spontané de développement est le résultat de la création de variations somaclonales lors de la culture cellulaire. Cette variation a été acquise à travers l'addition d'un agent sélectif, dans le cas présent le NaCl joue le principal rôle d'inducteur de variations somaclonales. Cependant ces fréquences de variation, qui sont interprétés dans la présente étude par le changement du taux de développement d'embryons somatiques peuvent être à l'origine de différents facteurs tels que ; le génotype et l'âge de la plante mère, l'origine de l'explant (génotype), la composition du milieu, type et concentration du régulateur de croissance, et la durée de la culture (Duncan, 1997 ; Jain, 2001 ; Cassells *et al.*, 2001 ; Sahijram *et al.* 2003; Bairu *et al.* 2011). Dans cette optique, on déduit que le principal facteur inducteur de Variations somaclonales lors de notre recherche est l'addition d'une forte concentration de l'agent sélectif (NaCl).

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

Tableau. 21: Moyennes et groupes homogènes de l'influence de différents niveaux de NaCl sur le taux d'induction d'embryons somatiques.

Taux de cals embryogènes (%)			
Variété	Témoins	Stressés 4g/l	stressés16g/l
Waha	74,38±5.25bcd	61,45±1.30de	2,60±1.90i
Guemgoum Rkhem	91,02±1.16a	54,49±2.89ef	44,60±6.68fgh
Beliouni	83,24±3.99ab	31,21±2.28h	79,47±0.79abc
Adnan-2	57,55±6.77cde	35,99±2.66h	75,43±4.47bcd
Beni Mestina	43,45±2.33fgh	43,58±3.00fgh	46,85±3.4fg
Adnan-1	67,92±1.81ef	30,95±2.83gh	73,07±2.81bcd

*(a,b...) indice de séparation des groupes homogènes par le test de NEWMAN-KEULS au seuil $\alpha=5\%$. n=3. (Moyenne ± SE)

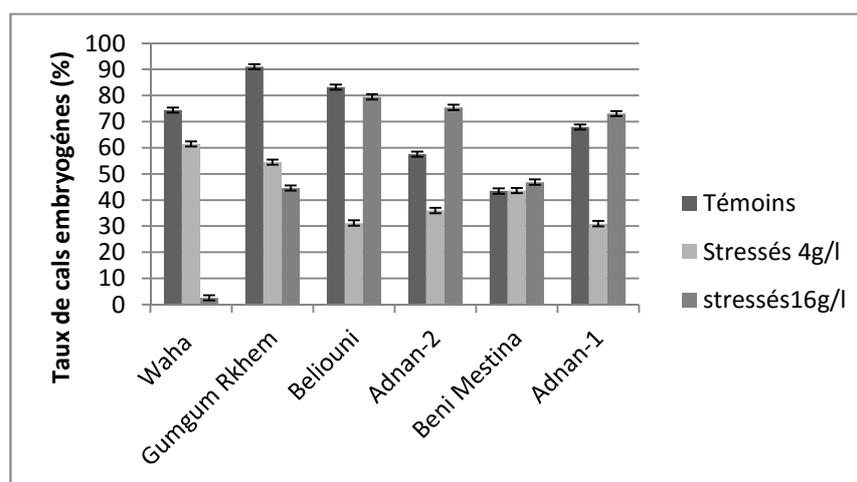


Figure. 22: Comparaison du taux d'induction de cals embryogènes (embryons somatiques) issus d'embryons matures cultivés en absence et en présence (4, 16g/l) de NaCl.

3. Influence de différents niveaux de stress sur le taux de régénération :

La régénération par l'embryogénèse somatique est le développement d'embryons somatique en une plante entière. Cette capacité de régénération est généralement contrôlée par l'addition de régulateurs de croissances spécifiques. Il a été largement mis en évidence que la réussite de la régénération chez le blé dur n'est pas une simple tâche, car en addition de son aspect plante récalcitrante, il y'a l'effet génotype qui rentre pour beaucoup en jeu.

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

Dans la présente étude, la réussite de la régénération des différents génotypes de blé dur a nécessité l'élaboration d'un protocole spécifique aux variétés utilisées, en addition de ces contraintes, la présence de stress salin dans le milieu de culture influence la capacité de régénération des différents génotypes. En effet des réponses hétérogènes a la régénération ont été enregistrés (Tableau.22).

L'aptitude de régénération de nos six variétés a donné des différences significatives de réponses entre les six variétés ($P < 0.0001$), ainsi que l'interaction entre les différents traitements et génotypes ($p < 0.0001$). A cet effet, les résultats d'analyse par AVOVA et le test de de NEWMAN-KEULS au seuil 5%, concrétisent nos observations (Annexe.9). L'effet génotype et composition du milieu est très largement présent lors de notre étude.

Sur le milieu Témoin, le taux de régénération de plante est largement supérieur à celui des milieux stressés. Les variétés : Beliouni, Adnan-2 et Waha enregistre les taux de régénération les plus élevés. (Figure.23). Tandis que les Variétés Guemguom Rkhem, Beni mestina et Adnan-1 se révèlent être incompetentes à la régénération. Les taux enregistrés sont très faible en milieu témoin par rapport aux variétés Beliouni, Waha et Adnan-2. Tandis que la présence de NaCl change le classement de la capacité des cals issue des différents génotypes à se régénérer en plante. La variété Guemgoum Rkhem en présence de NaCl son taux de régénération augmente par apport à celui du milieu témoin. Sur le milieu Témoin le taux de régénération a été enregistré de $1,30 \pm 0.69\%$ qui représente un faible taux. Cependant sur le milieu additionné de 16g/l de NaCl, ce taux a largement augmenter, il a été enregistré de $15,60 \pm 2.24\%$, ce qui classe cette variété en première classe de capacité a régénérer en présence de fortes concentrations de NaCl. Cette capacité de tolérance a été acquise lors de la culture cellulaire qui a induit des variations somaclonales et a permis à cette dernière d'avoir une forte capacité a la régénération, tandis que pour les autres variétés, cette capacité a été acquise mais en faible fréquence.

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

Tableau. 22: Moyennes et groupes homogènes de l'influence de différents niveaux de NaCl sur le taux de régénération de plantes à partir d'embryons matures issus des six variétés de blé dur

Taux de régénération (%)			
Variété	Témoin	Stressé 4g/l	Stressé 16g/l
Waha	13,33±1.31 cd	22,28±2.65 b	14,15±1.13 cd
Guemgoum Rkhem	1,30±0.69 e	4,67±1.70 e	15,60±2.24 c
Beliouni	30,36±1.53 a	5,26±0.60 e	4,07±0.57 e
Adnan-1	24,74±4.32 b	16,11±0.92 c	3,38±0.61 e
Beni Mestina	5,43±1.21 e	7,80±0.50 de	3,27±0.67 e
Adnan-2	6,20±0.52 e	5,39±0.70 e	5,61±1.08 de

*(a,b...) indice de séparation des groupes homogènes par le test de NEWMAN-KEULS au seuil $\alpha=5\%$. n=3. (Moyenne \pm SE)

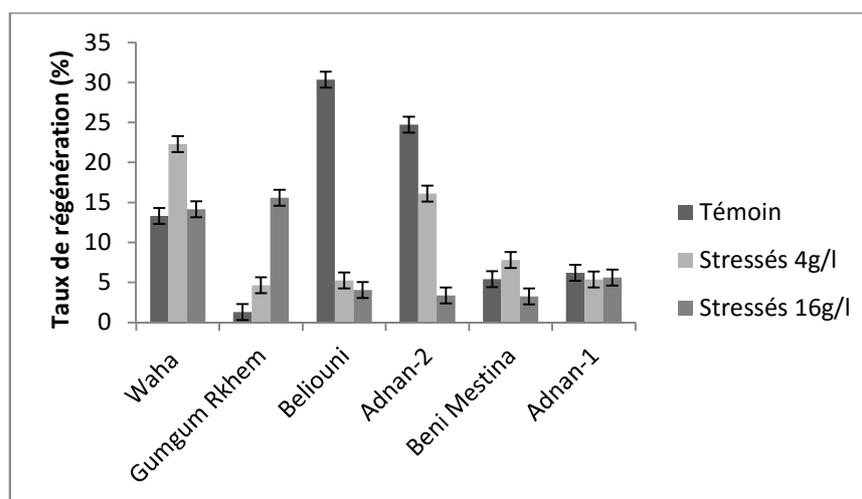


Figure. 23: Comparaison du taux de régénération de plantes par embryogénèse somatique à partir d'embryons matures des six variétés de blé dur cultivées en absence et en présence de (4, 16g/l) NaCl.

4. Influence de différents niveaux de stress sur le nombre de plantes régénérées par cal :

Le nombre de plantes régénérées par cal est un important paramètre qui peut nous confirmer la présence de variations somaclonales induites par la présence de fortes concentrations de NaCl, en effet à travers les résultats obtenus on remarque que le NPRC est largement plus important, sur le milieu de régénération de 16g/l. les fortes concentrations de NaCl qui ont permis l'amélioration de la capacité de régénération de

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

certaines variétés par rapport à leur aptitude de régénération sur les milieux témoins et en présence de 4g/l de NaCl, influence aussi la capacité des cals à produire un nombre plus élevé de plantes. Le (Tableau. 23) représente le NPRC obtenu par tous les cals qui ont acquis la capacité de régénération. Des résultats communs ont été obtenus par Mazouri et al., 2002 qui ont étudié l'effet du BAP sur l'embryogénèse somatique du blé tendre, en effet ce régulateur de croissance améliore la capacité de régénération ainsi que le NPRC.

On remarque que le NPRC varie entre 1 et 3 plantes par cal. Le NPRC est très remarqué sur les cals régénérés en présence de 16g/l de NaCl, dans notre cas d'étude l'addition de 16g/l de NaCl dans les milieux qui contrôlent la régénération *in vitro* grâce à l'embryogénèse somatique a peut être influencé négativement sur la capacité d'induction de cals, mais a une certaine étape de l'induction de l'embryogénèse somatique, et spécialement, une fois que les cals ont pu se développer et surmonter les fortes concentrations élevées de NaCl, l'effet négatif de ce dernier se transforme en effet positif, et permet aux cals issus des différents génotypes d'induire des variations somaclonales qui permettent l'amélioration de la production de cal embryogènes ainsi que de permettre l'amélioration de la capacité de régénération de certaines variétés en présence d'un stress sévère de NaCl.

Tableau. 23: Nombre de plantes régénérées par embryogénèse somatique à partir d'embryons matures cultivés en absence et en présence de (4 et 16g/l) de NaCl issus des six variétés de blé dur.

	Traitement par NaCl								
	Témoins			Stressés (4g/l)			Stressés (16g/l)		
	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal1	Cal 2	Cal 3	Cal1	Cal2	Cal3
Waha	1	0	1	1	1	1	3	2	2
Guemgoum Rkhem	0	0	1	1	1	1	1	1	3
Beliouni	3	2	1	1	2	2	1	1	0
Adnan-2	3	3	2	1	1	1	2	3	3
Beni mestina	2	3	1	2	2	2	3	3	1
Adnan-1	1	1	1	0	0	1	2	2	1

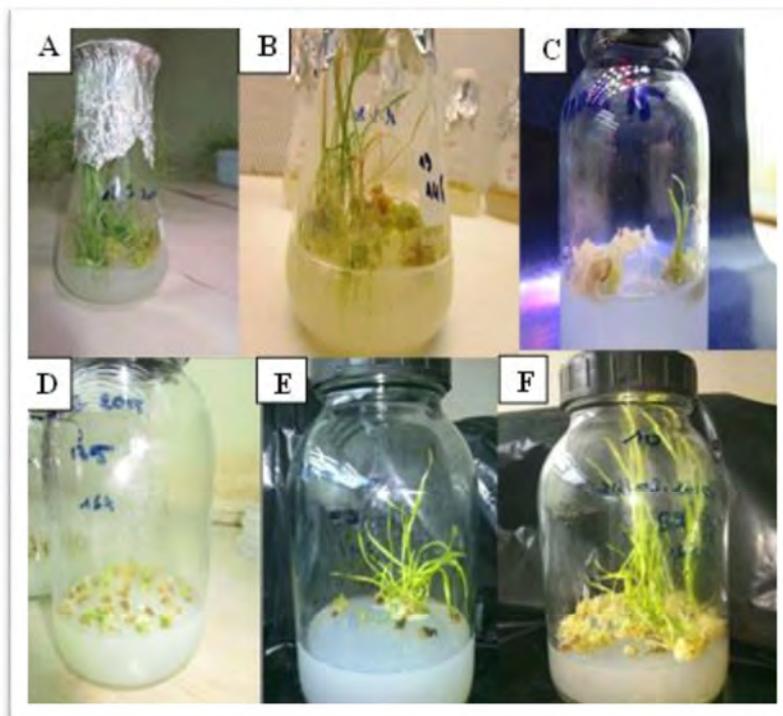


Figure.24: Régénération des six variétés de blé dur: (A) Beliouni (milieu témoin). (B) Adnan-2 (milieu témoin).(C) Waha MS +4g.l-1 NaCl. (D) Adnan-2 début de régénération MS + 16g.l-1 NaCl. (E) (F) Adnan-2 MS + 16g.l-1 NaCl.

IV. Conclusion :

Dans le présent chapitre, l'utilisation de deux modes d'application de stress salin nous a permis de réunir un maximum d'informations sur le mode d'adaptation et le comportement *in vitro* des six variétés de blé dur.

En premier lieu, l'application d'un stress progressif par le passage des cals par quatre niveaux de stress (0g/l , 4g/l, 8g/l, et 16 g/l) nous a permis de mettre en évidence que la longue durée de culture par des repiquages successifs permet aux cals issues des six variétés de blé dur de s'adapter progressivement aux nouvelles conditions de culture en développant des mécanismes d'adaptation spécifiques, l'étude du mécanisme d'absorption et exclusion des ions inorganiques (Na^+ et K^+) a fait l'objet de ce mode d'application de stress salin, il a été prouvé qu'en présence de stress salin dans le milieu de culture la teneur en K^+ diminue et la teneur en Na^+ augmente. Le K^+ est l'un des éléments importants qui régule plusieurs fonctions lors de la croissance de la plante. Son déficit peut mener à la mort cellulaire. L'un des mécanismes pour surmonter cette faiblesse en K^+ est de le

Chapitre III : Etude de L'effet du NaCl sur La Callogénèse, Le Développement d'embryons Somatiques et La Régénération In Vitro des Six Variétés de Blé dur.

remplacer par le Na⁺ qui en général est en faible concentration dans la cellule. Toutes les variétés de blé dur utilisées possèdent une capacité d'adaptation par le précédent mécanisme en présence de stress salin.

En second lieu, l'approche était d'induire le stress salin au premier stade de développement de l'embryogénèse somatique afin d'étudier l'effet du stress sur la régénération *in vitro* ainsi que de mettre en évidence l'induction de variations somaclonales comme moyen pour surmonter l'incapacité des variétés à résister face à un stress salin sévère. En effet l'application de l'agent sélectif en forte dose dans le milieu a été efficace pour déclencher la création de variations somaclonales et cela a été spécialement remarqué en présence de 16 g/l de NaCl. Suite à cela, la réponse des six variétés reste hétérogène, car certaines variétés possédant des taux différents de réponses à la production de cals, de cas embryogènes ainsi que la fréquence de régénération ainsi que le NPRC.

En terme de régénération complète de plantules en présence de fortes concentrations de NaCl (16g /l), les variétés Waha et Guemgoume Rkhem détiennent la plus grande capacité à se régénérer *in vitro* en présence de stress sévère. D'après cette conclusion ces variétés semblent être les plus compétentes à la production de variations somaclonales.

La production de variations somaclonales reste à être identifiée, le meilleur moyen de la mise en évidence des variations produites lors de la culture *in vitro* est l'identification par marqueurs moléculaires. En effets, différents travaux se sont basés sur l'utilisation de marqueurs moléculaires spécifiques afin d'identifier la présence de variations. Cela fera l'objet du prochain chapitre, qui révélera à travers l'utilisation de marquage par RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

*Chapitre IV : Mise en évidence de la Variation
Somaclonale par Marqueurs Moléculaires*

I. Introduction

La régénération de plantes par embryogénèse somatique à partir d'embryons matures de blé dur, nécessite des longs cycles de culture ainsi que, plusieurs repiquages. L'addition de régulateurs de croissance est indispensable pour le développement et la régénération *in vitro*. L'obtention de plantes tolérantes au stress salin est l'un des principaux objectifs de notre recherche, pour cela l'addition d'un agent sélectif (NaCl) est l'une des bases de notre pratique, l'ensemble de ces facteurs représente une source de variations somaclonales (Duncan, 1997 ; Jain, 2001 ; Cassells *et al.*, 2001 ; Sahijram *et al.* 2003; Bairu *et al.* 2011 ; Nimisha *et al.*,2012), qui pourra produire des variations génétiques exploitables pour l'amélioration des variétés de blé dur vis-à-vis du stress salin.

La mise en évidence de ces variations est généralement exploitée par des techniques de révélation par méthodes moléculaire, lors de la présente étude, une extraction de l'ADN à partir de plantes régénérées est réalisée et soumise à une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qui permet à partir de cette ADN matrice et de 2 amorces oligonucléotidiques, d'augmenter de manière quasi exponentielle le nombre de fragments limités par des séquences homologues aux amorces dans l'ADN matrice. On obtient alors l'amplification des fragments encadrés par les amorces. Lorsqu'on utilise une seule amorce de petite taille (8 à 12 bases), dont la séquence est choisie au hasard tout en respectant certaines règles quant à sa composition (contenu en GC), on peut constater, après PCR, l'amplification de fragments à partir d'un ADN génomique. Le nombre et les séquences des fragments amplifiés varient selon l'amorce utilisée. L'amplification de l'ADN génomique de deux génotypes différents, avec une même amorce, peut révéler des variations se traduisant par la présence ou l'absence d'un fragment donné selon le génotype. On dispose alors d'un fragment d'ADN polymorphe amplifié au hasard ou RAPD (*random amplified polymorphic DNA* (Williams *et al.*, 1990) , qui représente un marqueur anonyme potentiel. Les marqueurs RAPD sont traités comme des marqueurs dominants (Williams *et al.*, 1992) ; la présence d'un fragment est considéré comme allèle de son absence. Dans ce cas, le génotype d'un hétérozygote se traduit par la présence d'un fragment amplifié ; il est indiscernable de celui d'un homozygote pour la présence du fragment. On peut cependant supposer l'existence de fragments amplifiés, à la suite d'une délétion par exemple, mais ce type de situation semble rare. D'un point de vue pratique, ce type de marqueur se

Chapitre IV : Mise En Evidence De La Variation Somaclonale Par Marqueurs Moléculaires

caractérise par une plus grande facilité de mise en évidence par rapport aux marqueurs de type RFLP ou microsatellites, qui sont aussi utilisés pour le même but.

Les marqueurs obtenus par cette technique ont généralement une transmission mendélienne, Ils peuvent être utilisés comme marqueurs d'introgression (Arnold, Met et al.,1991) ils sont utilisés dans la construction des cartes de liaison génétique (Klein-Lankhorst et al.,1991, Reiter et al.,1992). Cette technique n'est pas limitée par le nombre d'amorces et permet d'identifier fréquemment le polymorphisme qui existe entre individus étudiés. Elle offre le moyen d'étudier la variabilité génétique au sein d'un complexe d'espèces, dans les populations naturelles d'une même espèce ou pour caractériser les différents génotypes (Khadari et al.,1994 ; Sheeba et al., 2014 ; Radwan et al.,2014 ; Ergül et al.,2015) .

En se basant sur la fréquence de polymorphisme, des variations somaclonales ont pu être détectés en comparant l'ADN génomique issu de plantes régénérées *in vitro* à partir d'embryons matures, en présence et absence de stress salin, ainsi que des plantes régénérées *in vivo*, en absence et présence de stress salin. Ces essais ont pour but de prouver la capacité de la régénération *in vitro* de produire des variations somaclonales, ainsi que, de mettre en évidence le rôle principal de l'agent sélectif dans l'introgression de variations somaclonales voulues. Donc la comparaison sur la base de taux de polymorphisme va se réaliser entre des plantes régénérées *in vitro* et *in vivo*, en présence et en absence de stress salin. Ce même principe de comparaison pour la détection de variations somaclonales a été utilisé par (Khoddamzadeh et al.,2010 ; Afrasiab et al.,2012 ; Nimisha et al., 2012 ;Pathak et al.,2013) pour la détection de variations somaclonales après régénération *in vitro* chez deux génotypes *Bacopa monnieri* et *Tylophora indica*.

Le présent chapitre représente une bonne mise en valeur de nos travaux de recherche, par l'utilisation de nouvelles techniques récentes de la biotechnologie telle, l'utilisation de marqueurs moléculaires.

II. Matériel et Méthodes

1. Matériels végétal :

L'étude a porté sur les variétés de blé dur (*Triticum durum*) ; Waha, Gumgum Rkhem, Beliouni et Beni mestina, qui ont aboutie à une régénération complète de plante par embryogénèse somatique, à partir d'embryons matures, cultivés en présence et absence de stress salin. L'ADN issu de ces plantes a été confronté à une comparaison avec de l'ADN des six génotypes issue de plantes cultivé *in vivo*, en présence et absence de stress salin. La concentration de stress salin utilisés est principalement 16 g/l de NaCl, car elle représente la concentration idéale pour l'induction de la variation somaclonale.

2. Mise en Place pour la réalisation d'une RAPD :

L'essai a été conduit au sein du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale (GBBV) de l'université des frères Mentouri Constantine durant la période 2014/2015.

- ***Extraction de l'ADN Génomique à partir de Feuilles :***

L'extraction de L'ADN est réalisée grâce à la méthode CTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide). (doyle and doyle , 1990) (Annexe .10) à partir des feuilles des plantes régénérées selon le protocole suivant : Préparation solutions et tampons (Annexe.11).

- ***Révélation de la présence de l'ADN par gel d'électrophorèse :***

La réussite de l'extraction est confirmée par la migration de l'ADN sur un gel d'agarose 0.8%. (100 ml TBE 1X+ 0.8g agarose). La présence de l'ADN est confirmée par l'obtention d'un profil d'électrophorèse avec des bandes bien claire.

La concentration de l'ADN pour la réalisation d'une RAPD est en minimum de 20 ng, pour cela le dosage de l'ADN est assure par le Nanodrope. Si les concentrations de l'ADN sont concentrées, une dilution est réalisée.

- ***L'amplification par PCR :***

La révélation de la présence de variations somaclonales par RAPD nécessite une amplification par PCR, l'amplification est réalisée grâce à des amorces RAPD arbitraires de petite taille avec une concentration élevée en bases (GC), l'amplification est réalisé à partir d'un mélange réactionnel appelé (Mix) le volume utilisé est de 25µl : 12.5µl AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied biosystems) + 1µl de l'amorce+ 1µl GC inhancer (360, GC Enhancer Applied Biosystems) + 1µl d'ADN + qsp. 25µl H2O.

- ❖ Listes des Amorce utilisées :

Tableau. 24: Code des amorces RAPD utilisées.

No	Primer	Sequence (5'to3')
1	OPC-05	GATGACCGCC
2	OPG-09	CTGACGTCAC
3	OPE-13	CCCGATTTCGG
4	OPF-20	GGTCTAGAGG
5	OPA-17	GACCGCTTGT
6	OPO-05	CCCAGTCACT
7	OPO-06	CCACGGGAAG
8	OPO-03	CTGATACGCC
9	B-19	ACCCCGAAG

- ❖ Programme PCR :

L'ensemble du Mix est soumis à 40 cycles d'amplification, chaque cycle étant composé d'une dénaturation à 94°C pendant 1 minute, d'une dénaturation à 37°C pendant une minute à 72°C et une élongation finale à 72°C pendant 7 minutes. L'amplification est réalisée avec un thermocycleur (Applied Bio systems 9700).

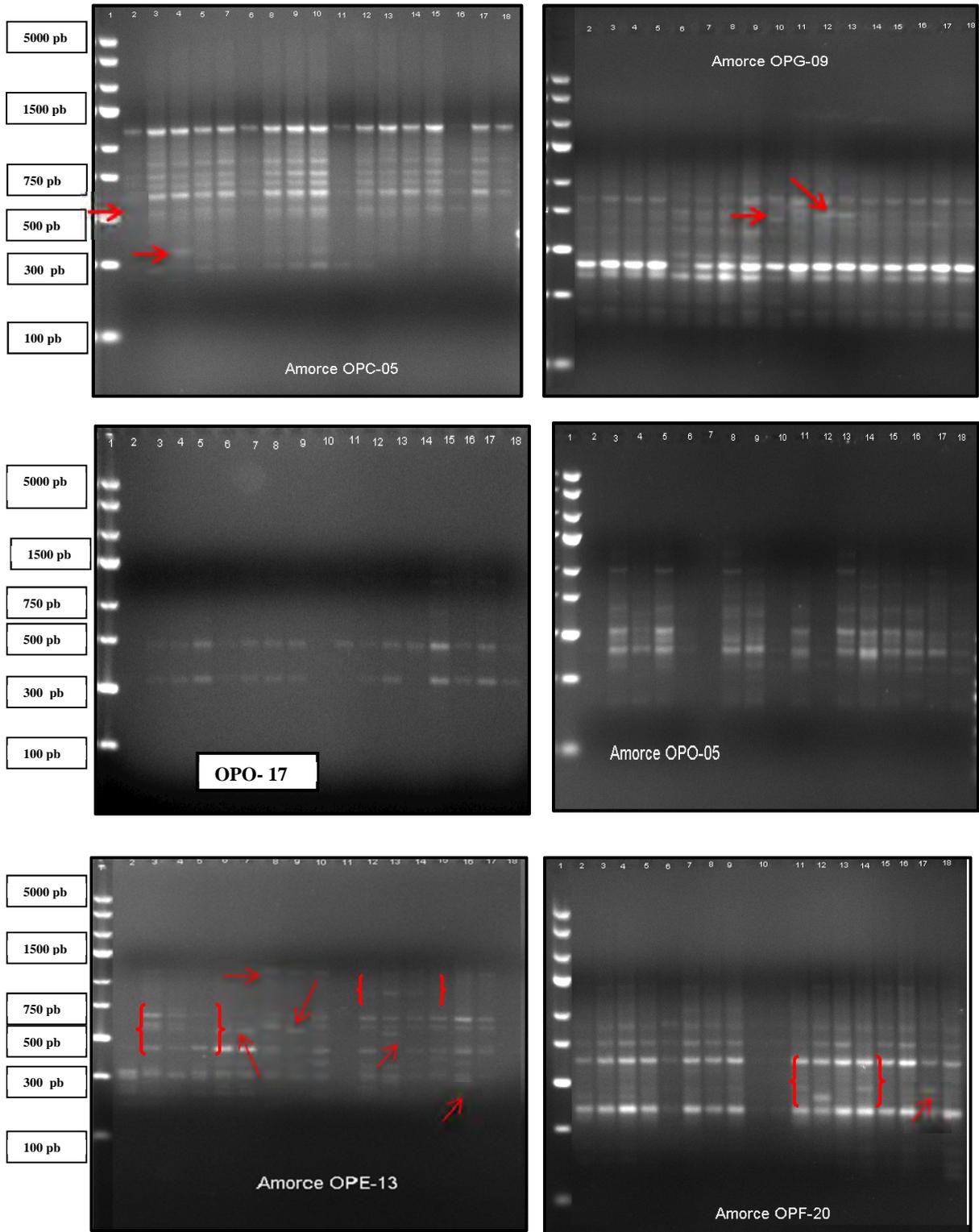
- ***Révélation des bandes RAPD par gel électrophorèse 1.5% :***

La confirmation de l'amplification et la révélation de présence de bande polymorphe qui traduisent la présence de variation somaclonales est révélée sur une électrophorèse sur gel d'agarose 1.5 % (100 ml TBE 1X+ 1.5g Agarose), deux à trois gouttes de bromure d'éthidium sont ajoutées lors de la préparation du gel d'agarose. Le bromure d'éthidium est un agent intercalant qui s'intercale entre la base de l'ADN. En contact rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent. Il est généralement utilisé pour la révélation des bandes d'amplification de l'ADN. Les bandes RAPD sont visualisées grâce à des rayons UV et photographié grâce à E-BOX VX2 system. Un marqueur de taille spécifique est utilisé pour comparer les tailles des bandes obtenues (O'GeneRuler Express DNA leader 1 Kb (Thermos scientific)).

III. Résultats et discussions

Après migration sur gel d'agarose, les profils obtenus sont visionnés et photographiés par le système E-BOX VX2, un traitement par un logiciel spécifique (E-capt) est indispensable pour la détermination des tailles des Bandes RAPD obtenues. Les résultats obtenus après traitement sont ainsi représentés :

Chapitre IV : Mise En Evidence De La Variation Somaclonale Par Marqueurs Moléculaires



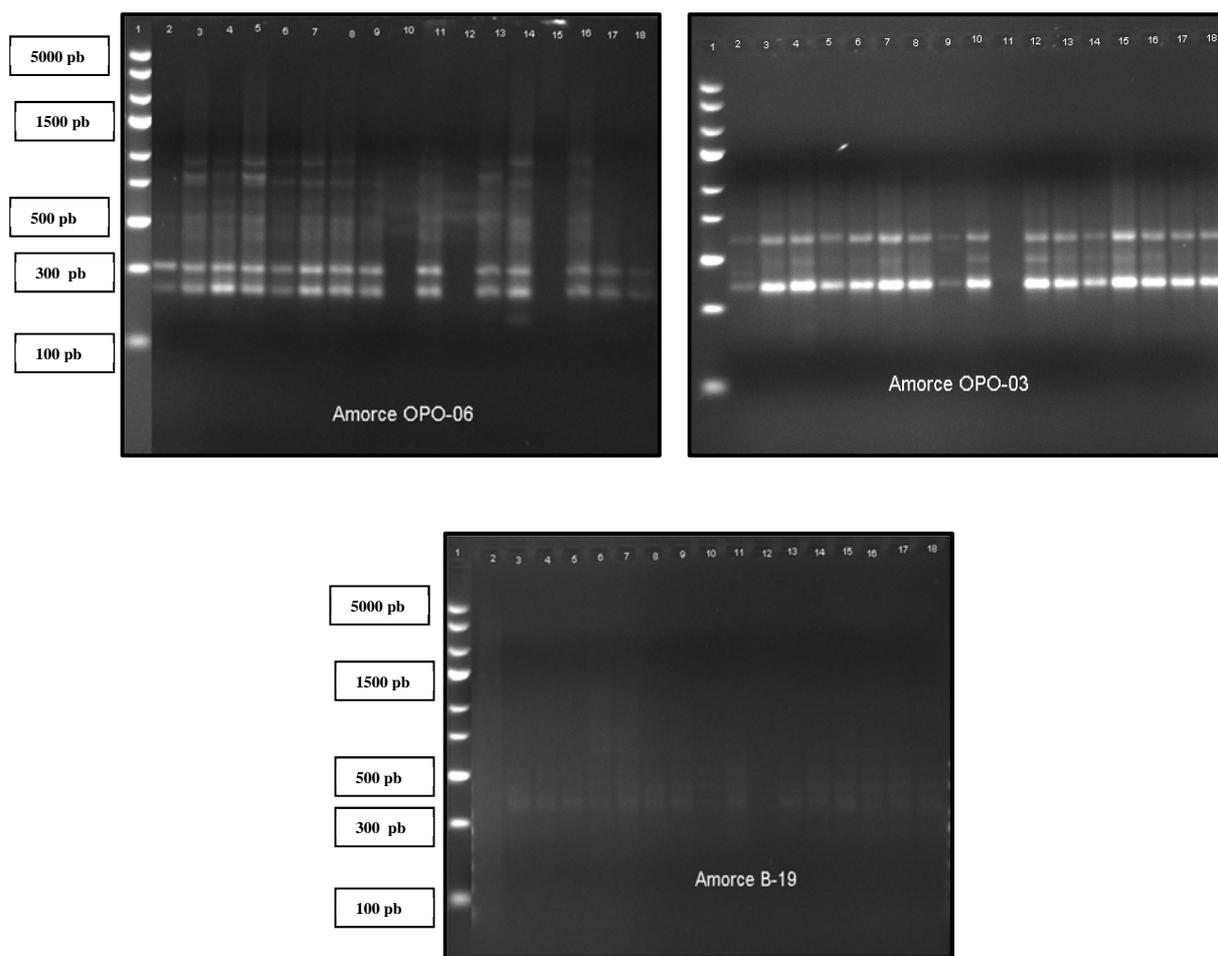


Figure 25 : Produits RAPD obtenus par une amplification PCR et neuf différentes amorces (OPC-05, OPG-09, OPE-13, OPF-20, OPA-17, OPO-05, OPO-06, OPO-03, B-19) d'ADN isolées à partir des six géotypes de blé dur régénérés sous différentes conditions de culture. **2**-Waha régénéré (*in vitro*) avec 16% NaCl après acclimatation. **3**-Waha régénéré (*in vitro*) avec 16% NaCl avant acclimatation. **4**-Waha Témoin (*ex vitro*) en absence de NaCl. **5**-Waha Témoin (*ex vitro*) en 16% NaCl. **6**-Beliouni régénéré (*in vitro*) avec 16% NaCl. **7**-Beliouni Témoin (*ex vitro*) en 16% NaCl. **8**-Beliouni Témoin (*ex vitro*) in absence of NaCl. **9**-Gemgum Khem régénéré (*in vitro*) avec 16% NaCl. **10**-Gemgum Khem Témoin (*ex vitro*) en absence de NaCl. **11**-Adna-2 régénéré (*in vitro*) avec 16% NaCl. **12**-Adna-2 Témoin (*ex vitro*) en 16% NaCl. **13**-Adna-2 Témoin (*ex vitro*) en absence de NaCl. **14**-Beni mestina Témoin (*ex vitro*) en 16% NaCl. **15**-Beni Mestina Témoin (*ex vitro*) in absence of NaCl. **16**-Adna-1 régénéré (*in vitro*) avec 16% NaCl. **17**-Adnan-1 Témoin (*ex vitro*) en absence de NaCl. **18**- Adna-1 Témoin (*ex vitro*) en 16% NaCl. 1: Marqueur de taille a droit de l'image.

Chapitre IV : Mise En Evidence De La Variation Somaclonale Par Marqueurs Moléculaires

Tableau.25: Taux de polymorphisme des six variétés de blé dur obtenus avec les neuf amorces RAPD : OPC-05, OPG-09, OPO-13, OPF-20, OPA-17, OPO-05, OPO-06, OPO-03 and B-19.

Code Primer	Sequence (5'-3')	Totale des bandes amplifiées	Bands polymorph	Polymorphisme (%)
OPC-05	GATGACCGCC	128	2	4.54
OPG-09	CTGACGTCAC	89	1	1.12
OPE-13	CCCGATTCCGG	72	8	11.11
OPF-20	GGTCTAGAGG	80	4	5
OPA-17	GACCGCTTGT	32	2	6.25
OPO-05	CCCAGTCACT	44	2	4.54
OPO-06	CCACGGGAAG	69	1	1.44
OPO-03	CTGATACGCC	43	2	4.64
B-19	ACCCCCGAAG	/	/	/
total		557	22	/

Les résultats obtenues révèlent que huit amorces sur neuf ont produit des bandes polymorphes, au totale 557 bandes ont été amplifié par l'ensemble des amorces utilisées, le nombre de bandes polymorphes est de 22 bandes sur 557, l'amorce OPA-13 a produit le taux le plus élevé de polymorphisme avec un pourcentages de 11.11% et des bandes de taille qui varie entre 300 et 700pb , suivit par l'amorce OPA-17 avec 6.25% taux de polymorphisme et des bandes de tailles 300 et 500pb et OPF-20 avec 5% de polymorphismes et des bandes de tailles 100 et 750 pb, les amorces OPO-03, OPO-05 et OPC-05 ont produit respectivement (4.64%, 4.54% et 4.45%) de polymorphisme avec des bandes de taille entre 300 et 1500 pb. Les amorces OPG-09 et OPO-06 représentent des amorces avec un faible taux de polymorphisme. (Tableau.25). la présence de polymorphisme est l'indicateur principale de variation somaclonale, différent travaux de recherches se sont basés sur l'analyse du taux de polymorphisme afin de mettre en évidence la présence de variations somaclonales, Nos résultats concordent avec les résultats obtenues par l Mahmoood et al.,2012 ; Nimisha et al.,2012 ; Balkrishna et al., 2013 ;Joshi et al.,2013 ;Khoddamzadeh et al.,2013 ;Pathak et al., 2013 .

Chapitre IV : Mise En Evidence De La Variation Somaclonale Par Marqueurs Moléculaires

Il a été démontré que la présence d'une variation somaclonale est le résultat d'une altération de nucléotide sur les sites d'hybridation des amorces ou bien par une insertion ou délétions sur le fragment amplifié qui se traduisent par la suite par une observation présence ou absence de produits d'amplification des différents loci (Tingey et al.,1993 ; Pathak et al., 2013).

L'observation des présents profils nous révèle que les régions d'amplification sont différentes d'une amorce à une autre, et pour chaque amorce des différences entre les régions d'amplification sont enregistrées, chaque amorce produit un nombre de bandes amplifiées différents. La comparaison entre l'amplification des bandes issues des plantes cultivées *in vitro* et *in vivo*, met en évidence la présence de différences d'amplification, en effet des travaux réalisés par Pathak et al., 2013 ont révélé que des plantes régénérés *in vitro* et *in vivo* donnent des produits d'amplification différents. Les mêmes résultats ont été observés dans notre cas d'étude. L'Amorce OPC-05 révèle la différence de produits d'amplifications entre les plantes cultivées *in vitro* et *ex vitro* ; la présence d'une bande d'une tailles de 347pb sur le produit d'amplification du puit n° 4 (Waha témoin cultivé *ex vitro* en absence de NaCl) et son absence sur les 3 premiers puits de la même variété mais régénéré *in vitro* sous d'autres conditions révèlent des différences de séquences. Ainsi que d'autres différences de séquences entre les plantes cultivées *in vitro* et *ex vitro* sont révélés par les amorces : OPE-13, OPF-20, OPG-09. Ces différences de séquences sont expliquées par l'induction de variation somaclonales par la culture *in vitro*, car, la culture cellulaire est l'un des facteur inducteur de variation somaclonales (Duncan, 1997 ; Jain, 2001 ; Cassells *et al.*, 2001 ; Sahijram *et al.* 2003; Bairu *et al.* 2011 ; Nimisha *et al.*,2012 ; Sheeba.,2014)

Des différences de séquences ont aussi été enregistrées entre les produits d'amplification obtenue en présence et en absence de stress, lors de la comparaison et de l'analyse de l'ADN des plantes régénérées en absence (plantes témoins *in vitro* et *in vivo*) et en présence de 16 g/l de NaCl (*in vitro* et *in vivo*) l'amorce OPC-05 et l'amorce OPG-09 révèlent toutes deux la présence de différence de séquence entre les plantes régénérées en absence et présence de stress, en effet l'exposition des plantes pendant la régénération induit des changement de séquence exprimées par le développement de variations somaclonales, ces variation sont dues à la capacité de la cellule de développées un mécanisme spécifique qui lui permet de surmonter les contraintes présentent lors de la culture. L'analyse du profil RAPD de l'amorce OPC-05 indique la présence de différences

de séquences entre les plantes témoins et stressés, le puit n°11 représente l'amplification de l'ADN de la variété Adnan-2 régénérée *in vitro* en présence de 16g/l de NaCl, en comparant les bandes de ce dernier avec le puit n° 13 qui représente les plantes témoins, on remarque l'absence d'une bande sur le puit n°11, cela est un indicateur de variations entre les témoin et les stressés. La même observation est enregistré sur le puit n° 6 du profil de l'amorce OPG-09, dans ce cas, la variété concernée est la variété Beliouni, cette dernière enregistre une différence de séquence en présentant une absence de bande sur le puit de l'ADN obtenus à partir des plantes régénérées en présence de NaCl. Ces variations dues à l'application d'un stress sévère a été largement démontré par différents travaux tels que les travaux réalisées par Balkrishna et al., 2013.

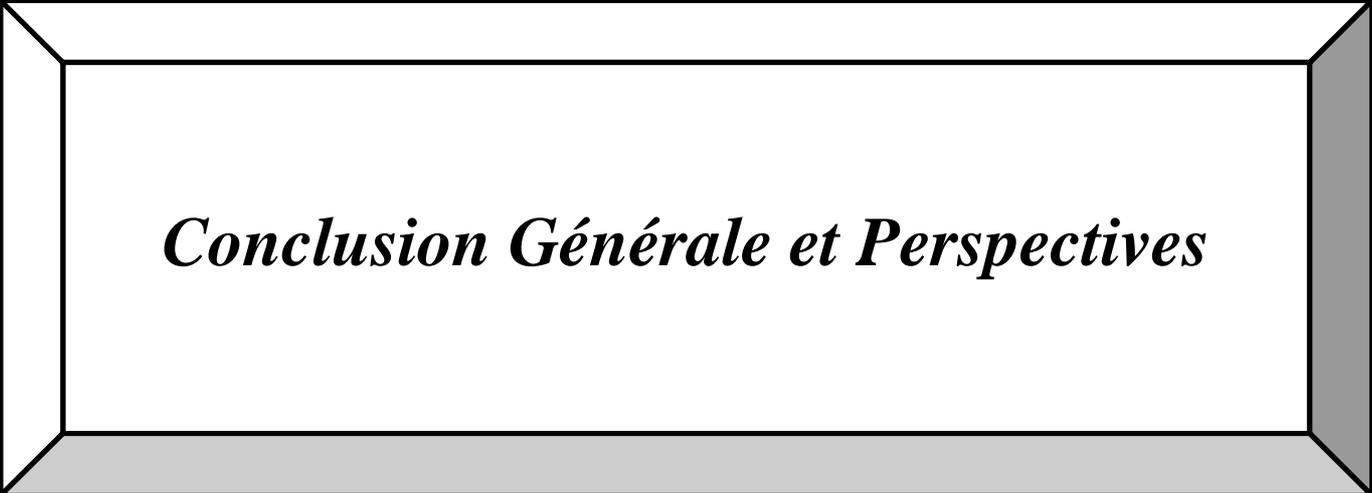
La comparaison de la présence ou absence de bandes entre les six différentes variétés nous révèle aussi la différence de comportement des six génotypes, chaque génotype répond différemment à l'induction de la variation somaclonale. La comparaison de plantes stressées régénérées *in vitro* montre la présence de différences de séquence, cette information est obtenue par l'amplification en présence de l'amorce OPO-13.les puits concerné sont les : n° 2 (Waha: acclimatation après régénération *in vitro*), puit n° 3 (Waha régénéré *in vitro*), puit n° 6 (Beliouni régénéré *in vitro*), puit n° 9 (Gumgum Rkhem régénéré *in vitro*), puit n° 11(Adnan-2 régénérés *in vitro*) et le puit n° 16 (Adnan-1 régénéré *in vitro*). La différence de séquences entre les six génotypes est noté par l'absence de la bande de la taille (549 pb) chez la variété Beliouni et Gemgum Rkhem, et sa présence chez les variétés restantes. Les mêmes résultats ont été obtenue par (Sheeba et al.,2014 Ergül et al.,2015).

IV. Conclusion :

La révélation de présence de polymorphisme par une RAPD représente la mise en évidence de la présence de variation somaclonales. Ces dernières sont présentes avec des taux de distribution hétérogènes. Les profils électrophorétiques nous confirment que ces variations sont révélées à travers la comparaison entre l'ADN génomique issue des plantes régénérées *in vitro*, et *in vivo*, la comparaison avec les deux différents modes de culture nous confirme aussi que la régénération par embryogénèse somatique est un moyen efficace pour l'obtention de variations somaclonales et cela chez les six génotypes utilisés. Ainsi , l'analyse des profils nous indique sur la capacité de l'agent sélectif de produire les

Chapitre IV : Mise En Evidence De La Variation Somaclonale Par Marqueurs Moléculaires

variations somaclonales, le présent cas d'études nous indique qu'une concentration égale à 16 g/l est une concentration inductrice de variations. L'influence du génotype sur le développement des variations somaclonales a été aussi démontrés par la révélation de polymorphisme par RAPD, ces résultats nous confirment les résultats obtenues lors des précédents chapitres ; le facteur génotypes est très importants lors de la sélection par régénération *in vitro*. Donc la principale conclusion de ce chapitre c'est que des variations somaclonales ont été induites lors de la régénération *in vitro* chez les six génotypes de blé dur, cependant ces variations peuvent avoir différentes causes, elles peuvent être dues aux multiples cycles de cultures, à l'application d'un stress sévère lors de la régénération ou bien l'effet génotype qui se traduit par la différence de réponses par rapport à la culture *in vitro* des six génotypes.



Conclusion Générale et Perspectives

Conclusion générale Perspectives:

La spécificité de ce travail de thèse s'est reflété dans les trois axes de recherches développées : i) l'étude de l'aptitude des six variétés de blé dur à la culture *in vitro* ; ii) L'étude de l'effet du NaCl sur la callogénèse, le développement d'embryons somatiques et la régénération *in vitro* ; iii) La mise en évidence de la variation somaclonale par marqueurs moléculaires.

Une élaboration d'une concentration spécifique de 3.5 mg/l de 2.4-D a permis le développement d'un taux important de la callogénèse chez les six géotypes de blé dur, ainsi qu'un développement d'amas cellulaires assez importants, l'addition du 2.4-D est l'un des facteurs dirigeant du développement d'embryons somatiques, qui représente le point de départ d'une régénération *in vitro* de plantules. Cette régénération est considérablement contrôlée par la composition du milieu de culture et principalement par les régulateurs de croissance qui représentent la principale composante incitatrice de la régénération. La présente recherche s'est appuyée sur l'essai de plusieurs combinaisons hormonales. La combinaison (1 mg/l Kinétine + 2mg/l AIA) est la combinaison adéquate pour la régénération *in vitro* de plantules issues des six géotypes de blé dur (Waha, Beliouni, Gumgu Rkhem, Adnan-1, Beni mestina et Adnan-2). Il a été prouvé que le choix de la combinaison hormonale est fortement liée aux géotypes, chaque géotype répond spécifiquement à la culture. Le taux de régénération obtenue lors de l'essai est plus au moins faible, le taux le plus élevé a été enregistré chez la variété Beliouni avec un taux de régénération de 33.69 ± 1.45 %, cependant ce taux est considéré comme un taux important, car la nature récalcitrante de la plante du blé dur fait que cette dernière ne répond pas facilement à la culture *in vitro*. Un des atouts majeur de ce chapitre est représenté par l'effort majeur élaboré pour la compréhension du comportement *in vitro* des six géotypes de blé dur. Donc la démarche du choix de la concentration du 2.4-D et la combinaison hormonale nécessaire à la régénération représente un atout majeur pour la réussite de la culture *in vitro*. D'un point de vue méthodologique, le choix de l'explant est aussi important, le présent essai est réalisé à partir d'embryons matures issus des six variétés de blé dur, ce dernier est disponible tout au long de l'année, et permet à tous moment de l'essai de reprendre et rediriger nos travaux.

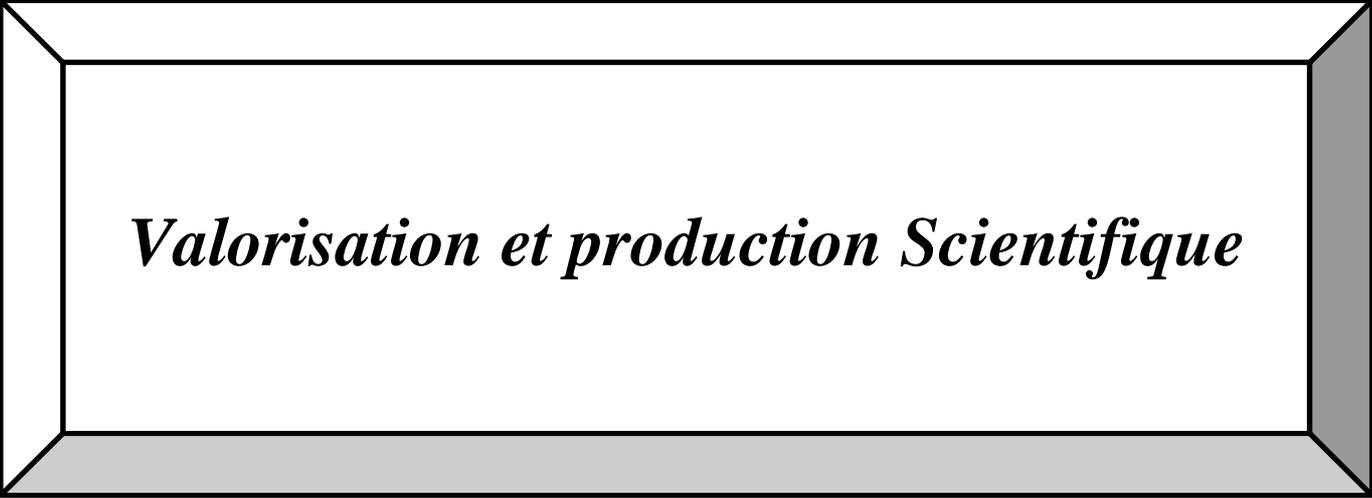
Comme deuxième approche principale de l'étude, une contrainte saline contrôlée a été appliquée pour l'étude de l'effet du stress salin sur la régénération *in vitro*. La sélection des géotypes résistants a été élaborée à travers l'application de stress salin suivant deux

Conclusion Générale

approches. La première consiste à l'application d'un stress par addition progressive de concentration de NaCl (0g/l, 4g/l, 8g/l, et 16 g/l). Cette approche nous a permis de comprendre et de mettre en évidence le mécanisme de résistance ; lequel est développé par les cals lors de l'application du stress, la longue durée de culture par des repiquages successifs permet aux cals issus des six variétés de blé dur de s'adapter progressivement aux nouvelles conditions de culture en développant des mécanismes d'adaptation spécifiques, ces derniers sont contrôlés par le mode d'absorption et exclusion des ions inorganiques (Na^+ et K^+). Lors de la présence d'un stress salin la diminution de la teneur en K^+ est très remarquable chez les plantes stressées comparativement aux plantes témoins, le K^+ représente l'un des minéraux les plus importants, considéré comme cations inorganique majoritaire de la cellule, sa carence peut mener à la détérioration de la cellule végétale et générer une mort cellulaire. Les résultats du présent travail mettent en évidence la présence de deux types d'amas cellulaires ; le premier type représente des amas nécrosés (sensibles au NaCl), là où le développement en plante est impossible, le second type d'amas, représente des cals bien développés d'une couleur jaunâtre (jaune pâle) qui sont considérés comme cals résistants au stress salin. La présence de ce type de cals est le résultat du déclenchement d'un mécanisme de résistance, le Na^+ ne constituant pas un élément essentiel chez les cellules. Cependant, son rôle reste important. Lors d'une carence de K^+ entraînée par un stress salin, le Na^+ rentre en compétition avec le K^+ afin de maintenir en équilibre du potentiel osmotique permettant le bon développement cellulaire. Un des atouts majeurs de ce chapitre est la mise en évidence du mécanisme que développent les cellules somatiques lors de leur différenciation en plantes. Ces dernières acquièrent une capacité de résistance qui permettra la régénération de plantes résistantes au stress salin. L'une des influences du stress sévère est le développement de variations somaclonales. Pour cela la deuxième approche vise à étudier l'effet du NaCl sur la régénération *in vitro*. Cette approche consiste à appliquer directement lors de l'induction de l'embryogénèse somatique différentes concentrations de NaCl (0 g/l ; 4g/l et 16g/l). Les résultats obtenus mettent en évidence l'effet néfaste d'une forte concentration du NaCl (16g/l) sur le taux de la callogénèse, cependant cette concentration considérée comme sévère, n'affecte pas le taux de développement des embryons somatiques, ainsi que le taux de régénération. Car il a été démontré qu'une concentration sévère est l'un des facteurs influençant la création de variations somaclonales. Suite à ces variations, les cellules somatiques peuvent surmonter la contrainte saline et régénérer des plantes résistantes.

Conclusion Générale

L'analyse de la présence de variations somaclonales par RAPD s'est avérée assez performante pour permettre la mise en évidence de polymorphisme entre les six variétés. Les différents traitements par NaCl et le type de culture. En effet la mise en évidence des variations somaclonales a permis de déduire que le développement des variations somaclonales est contrôlé par : le type de la culture, le génotype, l'application du stress sévère.



Valorisation et production Scientifique



ISSN NO. 2320-5407

Journal homepage: <http://www.journalijar.com>

INTERNATIONAL JOURNAL
OF ADVANCED RESEARCH

RESEARCH ARTICLE

Selection for salinity tolerance and molecular genetic markers in Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.)

Zoheira BENABDELHAFID*, BOULDJADJ Ryma, Nadia YKHLEF, Abdelhamid DJEKOUN.

Genetics, Biochemistry and Plant Biotechnology Laboratory 'Team II Biotechnology and Plant Amelioration',
Faculty of Nature and Life Science, Frère Mentouri University, Constantine, Algeria.

Manuscript Info

Manuscript History:

Received: 15 August 2015

Final Accepted: 22 September 2015

Published Online: October 2015

Key words:

Durum wheat, embryogenic callus, NaCl, RAPD markers, regeneration, salt stress.

*Corresponding Author

Zoheira
BENABDELHAFID

Abstract

Response of six genotypes of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) Waha, Beliouni, Gungoum Rkhem, Adna-2, Beni mestina and Adna-1; to mature embryo culture, embryogenic callus production and *in vitro* salt tolerance, were the main objective of this study. The effect of salt stress induced by NaCl on MS medium (Murashige and Skoog., 1962), the callus embryogenic medium was added to 3.5mg/l of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and were subcultured on regeneration media containing 1mg/l of kinetin and 2 mg/l of AIA (β -indoleacetic acid), for roots proliferation, plantlets regenerated was transferred to MS/2 medium added to 1 mg/l. The embryogenic callus induction and regeneration rate were determined. The results showed that salt influence the regeneration rate and embryogenic callus induction. The influence of these two parameters is very marked when NaCl concentration reached 16g.l⁻¹ in medium culture. For RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analysis, the six genotype of durum wheat was cultivated *ex vitro* in absence and under salt stress. DNA (RAPD) markers were used to evaluate the genetic variability of the regenerated plants. Nine arbitrary primers were used to amplify genomic DNA of the original durum wheat cultivars and regenerated plants. Twenty two bands of 557 were polymorphic. The presence of polymorphic bands showed the presence of somaclonal variation, which can be used for selection of durum wheat toward desirable traits.

Copy Right, IJAR, 2015,. All rights reserved

INTRODUCTION

Algeria is the second importing country of wheat in Africa after Egypt, with a global import market average of 5.5 million tons (68% of needs) in 2014 against a demand of 8 million tons. The observed deficit of the cereal sector in Algeria is caused by different stress conditions including salt stress. As wheat is considered as salt sensitive species (Ayolié *et al.*, 2011), there is a need to develop stress tolerant cultivars.

Plant tissue culture plays an important role in plant amelioration and in the manipulation of plants for improved agronomic performance (Zale *et al.*, 2004). *In vitro* culture of plant cell tissues has shown a growing interest over recent years. This approach is considered as a powerful mean to study plant physiological, genetic process and to increase genetic variability which can be used in breeding programs (Karp *et al.*, 1987). Somatic embryogenesis is a process in which any somatic tissue is potent to regenerate into a whole plant through formation of embryo-like structures (Rao., 1996, Jiménez., 2005), and represents a unique developmental pathway that involves a number of characteristic events: cells dedifferentiation, cell division activation, reprogramming of their physiology, metabolism and gene expression patterns (Pathak *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2010). The phytohormones, auxins and cytokinins are important regulators and play a role in the developmental fate of pluripotent plant cells to regenerate plants which is well known, nevertheless, the mechanism is quite complicated (Ray *et al.*, 1996, Pernisová *et al.*, 2006.). Auxins are

known to be associated with plants genetic instability, a phenomenon called somaclonal variation (Karp., 1989, Phillips *et al.*, 1994, Cullis., 1999). Although somaclonal variation can be used as a source for variation to obtain superior clones (Karp., 1993; Cassells *et al.*, 1999). This somaclonal variation can be caused by exogenous factors, as osmotic pressure or mutagenic treatment. The salt stress application during the regeneration process constitutes a convenient way to study the effects of salinity on the morphogenic step developments. Several studies showed that the selective pressure can be applied during the callus formation phase and/ or regeneration (Bouiamrin *et al.*, 2012, Soliman *et al.*, 2013, Balkishna *et al.*, 2013). In wheat species, different explant sources have been used for embryogenic callus formation and plant regeneration including mature and immature embryos (Ozgen *et al.*, 1996) immature inflorescences and coleoptiles (Benkirane, H *et al.*, 2000), shoot apical meristems (Ahmed *et al.*, 2002) and others. Indeed, these tissues vary in their ability to regenerate into a whole drought stressed plants in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) (Delporte *et al.*, 2001). Embryo is the most frequently used explants for the initiation of wheat tissue culture either for callus production or direct DNA delivery techniques. Moreover, mature embryo are readily available all over the year and are used for transformation studies in the recent years (Patnaik *et al.*, 2006).

The development of RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) has allowed simple, easy and less time-consuming genom analysis at the DNA level compared with RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Numerous investigators have successfully employed RAPD to find a molecular marker that could be used for genetic analysis of micropropagated and regenerated plants, taxonomic studies and classification, cultivar identification, genotypic screening and breeding programmes (Mahmoud *et al.*, 1998).

The aim objective of our experiment is to select salinity tolerant genotype and to identify molecular markers and somaclonal variations associated with salt tolerance in durum wheat, although it is difficult to identify the genetic variation in regenerated somaclones, but, as RAPD using the arbitrary primers, it can be used to characterize somaclonal variation.

Materials and Methods

Plant Materials and Explant Preparation: This study was carried out by Genetics, Biochemistry and Plant Biotechnology Laboratory, Faculty of Nature and Life Science, Frères Mentouri University, Constantine, Algeria, during the period from 2012 to 2015.

Six durum wheat (*Triticum durum* Desf.) genotypes: Waha, Beliouni, Gumgoum Rkhem, Adna-2, Beni mestina and Adna-1 were used as the material for this study. The seeds were provided by ITGC, Institut Technique des Grandes Cultures (Station El-khroub Constantine, Algeria). The explant source was mature embryos collected from mature seed.

Callus induction and selection for salt tolerance callus: The mature seeds have been disinfected with 75% ethanol for 5 min, then washed with sterile distilled water and have been sterilized in 0.1% HgCl₂ supplemented with 1-2 drops of tween 20 for 30 min with shaking and then have been washed five times with sterile distilled water in order to remove excess of the chemical, and have been imbibed in sterile water 24-36h, at room temperature (22-25°C) in complete darkness. The mature embryos of each cultivars have been aseptically isolated from the freshly imbibed seeds with a sharp knife, and ten mature embryos have been cultured with scutellum side by scalpel and forceps in petri dish containing MS medium salt (Murashige and Skoog, 1962). Callus induction salt media have been supplemented with 3.5 mg/l 2,4-D, 30g/l sucrose, then, solidified with 10g/l agar and various concentration of NaCl (0, 4, 16 g/l). The pH of the medium was adjusted to 5.8 prior to autoclaved at 120°C for 20 min. petri dishes have been sealed with polyethylene film and have been placed in a growth culture room under a photoperiod of 16h light/8h dark, at a temperature between 22-25°C.

After four weeks of incubation on callus multiplication and salt media, the obtained calli have been sub-cultured on fresh callus and salt medium, the experiments have been repeated three times.

Plant regeneration under salt treatment: the obtained calli have been shifted to regeneration medium supplemented with 30g/l sucrose, 10g/l agar and plant growth regulators (1mg/l Kinetin and 2mg/l AIA). The calli have been incubated at 25±2°C temperature with 16h light and 8h dark photoperiod for four weeks, then the regenerated shoots cultures have been transferred to MS/2 medium containing 1mg/l kinetin for rooting regeneration.

The callogenesis, Somatic embryogenesis and regeneration rate have been determined.

The percentages of callus induction, embryogenic calli induction and regeneration percentage have been calculated by the following formula:

- $\text{Percentage of callus induction} = \frac{\text{number of calli}}{\text{total number of explants cultured}} \times 100;$
- $\text{Percentage of embryogenic callus} = \frac{\text{number of embryogenic calli}}{\text{total number of calli induced}} \times 100;$
- $\text{Regeneration percentage} = \frac{\text{number of calli with regenerated seedlings}}{\text{total number of calli}} \times 100.$

Acclimatization of plant regenerated: Three-to four-weeks after regenerated rooting, *in vitro* raised healthy plantlets have been taken out from the culture bottles and washed gently with sterile water to remove the adhering medium completely. Thereafter, they have been transferred to pots containing autoclaved compost mixture and vermiculite (3:1 v/v). The plantlets have been covered with transparent polyethylene bags to prevent desiccation and have been maintained in room-culture at temperature $28 \pm 2^\circ\text{C}$ with a photoperiod 16h light and 8h dark for four weeks.

Plants germination experiments:

Seeds have been sterilized and pre-germinated in Petri dishes for 48h at room temperature and then transferred into pots containing compost and grown under greenhouse conditions (16h light/8h dark photoperiod, $27 \pm 10^\circ\text{C}$, $50 \pm 10\%$ relative humidity). Salt stresses have been imposed watering by salt solution (16g/l NaCl).

Molecular analysis:

Regenerated plantlets produced from plant regeneration medium and plant germination experiment were subjected to RAPD analysis and comparison between the responses to salt stress of two culture condition.

DNA isolation: DNA has been extracted from leaf tissue of the six regenerated and germinated wheat genotype using a cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method according to (Maniatis *et al.*, 1982), after freezing by liquid nitrogen, leaves has been grounded in a mortar with a pestle. 150 mg from the powder has been used for DNA extraction. DNA quality has been tested using 0.8 % agarose gel electrophoresis, the measuring DNA concentrations using Nano Drop instrument and has been diluted to 20 ng with addition sterile distilled water.

PCR amplification: A 25 μl mixture contained 1 μl of genomic DNA, 12.5 μl of ampli Taq DNA polymerase, 1 μm of GC Enhancer, 1 μl of RAPD Primer and 9.5 μl of distilled sterile water. Nine RAPD primers have been used in the study for detect a marker related to salt tolerance. The list of primers is shown in Table1. Amplification has been carried out using a thermal cycler (Applied Bio systems 9700) programmed for 40 cycles as follows: initial denaturing at 94°C for 5 min, further denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 37°C for 1 min, extension at 72°C for 1 min and final extension for 7 min at 72°C . The PCR products have been analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gels containing ethidium bromide in 1 X TBE buffer. The RAPD bands have been visualized under UV light and photographed using E-BOX VX2 system. The O'GeneRuler Express DNA leader 1 Kb (Thermos scientific) has been used as a standard molecular weight marker.

Statistical Analysis: Analysis of variance (ANOVA) has been executed and treatment means have been compared by using Duncan multiple range test. Means are the result of three replicated.

Results:

Callus induction with NaCl: Mature embryos cultured on MS medium with 3.5 mg.l^{-1} 2,4-D supplemented with 0,4 and 16 g.l^{-1} of NaCl for six durum wheat genotype and incubated under a photoperiod of 16h light/8h at temperature varied between $22\text{-}25^\circ\text{C}$ for eight weeks. Observation made during the incubation of cultures showed that the callus is induced after 5 to 8 days of seeding, NaCl have a great effect on regeneration capacity of callus medium. The regeneration rate of callus change with the different concentration of NaCl in the culture medium, callus initiated on MS medium added to 4 g.l^{-1} NaCl produced a percentage of regeneration identical significantly to callus initiated on MS medium without NaCl (control), whereas, the percentage of callus initiated on MS medium added to 16 g.l^{-1} was significantly different. Also, wheat has different behaviors in their ability to produce plants via callus cultivated in salt medium. The varieties Beliouni, Gumgum Rkhem and beni mestina have better responded better with high concentration of NaCl (16 g.l^{-1}) (Table 2). Significant effects were observed between the wheat varieties studied. So, according to their sensibility to NaCl, wheat varieties can be divided into two groups. The regeneration media supplemented with 0 and 4 g.l^{-1} NaCl are the first group produces more regenerated callus and the regeneration media containing 16 g.l^{-1} is the second group. Calli of Waha et Adnan-1 are more sensitive to salinity than others varieties. With 16 g.l^{-1} NaCl the calli of Beni mestina Gumgum Rkhem and Beliouni gives a good callus regeneration rate.

Somatic embryogenesis induction with NaCl: Table 3 illustrates the results obtained from embryogenic competence for plantlets for the six genotypes tested in different concentrations of salt medium. These results show that the production means of somatic embryogenesis calli for all genotype in the medium added to 16 g.l^{-1} (53.67%)

are more important than the means obtained in medium added to 4 g.l⁻¹ (42.94%) beside means obtained in control medium with a rate of (69.59%). the genotype effect and concentration of NaCl is also remarked, in control medium; the highest percentage of somatic embryogenesis calli have been registered in Waha, Gumgum Rkhem and Beliouni these percentages were respectively 74.38%, 91.02% and 83.24%. nevertheless, with 16g.l⁻¹ NaCl the results showed that it's not the same genotypes witch registered the highest percentage, in these case Adna-1, Adna-2 and Beliouni are the varieties with the highest results, (73.07%,75.43% and 79.47%) respectively.

Regeneration via Somatic Embryo and transplanting: the regeneration started with the appearance of green dots on callus after 4 weeks incubation on regeneration medium and generally produced normal stem and leaves. The results showed that best regeneration percentage in control medium was observed on Beliouni (30.36%) and Adna-2 (24.74%) genotypes; the minimum number of regenerated plantlets was recoded in Gumgum Rkhem genotype (1.3%). While at 16g.l⁻¹ concentration the highest rate was reported in Waha and Gumgum Rkhem genotypes (14.15% and 15.6%) respectively, and minimum rate was reported in Adnan-2 (3.38%) and Beni Mestina (3.27%) genotype.(Table 4, Figure 1) resume the results obtained.

Molecular Genetic Marker:

Somaclonal variation among 18 regenerated plant, their original cultivars control and cultured under 16g.l⁻¹ NaCl were tested by RAPD analysis. Nine arbitrary oligonucleotide primers were used, number of fragment amplified using these different primers showed that: the numbers of amplified fragment with some primers different from on genotype to another and these primers have amplified 557 PCR bands in all tested genotypes. A maximum of 128 fragments were amplified with primer OPC-05 and minimum of 32 fragments were amplified with primer OPA-17. Eight primers (OPC-05, OPG-09, OPO-13, OPF-20, OPA-17, OPO-05, OPO-06, OPO-03) produced polymorphic RAPD profiles only one primer (B-19) gave monomorphic bands and with a low concentration of DNA. The OPO-13 primer recorded the percentage of polymorphism (11.11%) as it revealed 8 bands in 72 amplified fragments (Table 5). The size of amplified ranged from 1500bp to 100bp approximately (figure 2). The comparison of amplification with OPO-13 primer highlights a difference between the six genotypes of wheat and their response to salt pressure that what is observed in (figure 2). When we want to associate these markers with the salt tolerance we observed positive markers: the amplified band in the regenerated *in vitro* plant in 16 g.l⁻¹ NaCl (lane 1: waha, lane 8: Gumgum Khem lane 15: Adnan-1) and negative markers: the bands amplified in controls plants (lane 7: Beliouni control, lane 9: Gemgum Rhem control and lane 12 Adnan-2 Control). The same results were observed in the OPG-09 primer, which recorded the least percentage (1.12%) by revealing one polymorphic band in 89 amplified fragment (table 5). The OPG-09 primer amplified 89 band in all genotypes the size of amplified was ranged from 100bp to 1000bp, number of band Is different from a genotype in another one: Waha,Gemgum Khem, Adnane 2, Beni Mestina and Adnan-1 genotypes cultured *in vitro* and their plants control amplified tree bands in every tested plant (170bp, 220bp and 888bp) Whereas Beliouni genotype amplified only two bands (170bp and 220bp) in control tested plants and only one band *in vitro* cultured plants with 16g.l⁻¹ NaCl. The results of RAPD analysis using primer OPG-09 are illustrated in (figure 2).

Table 1: Nucleotide sequences of the 09 primers used in the study.

No	Primer	Sequence (5'to3')
1	OPC-05	GATGACCGCC
2	OPG-09	CTGACGTAC
3	OPE-13	CCCGATTCCGG
4	OPF-20	GGTCTAGAGG
5	OPA-17	GACCGCTTGT
6	OPO-05	CCCAGTCACT
7	OPO-06	CCACGGGAAG
8	OPO-03	CTGATACGCC
9	B-19	ACCCCGAAG

Table 2: Regeneration of callus induced in medium with different concentration of NaCl after 8 weeks. Means with the same letter(s) in the same column are not significantly different at 5% using Duncan multiple range test

Genotypes of wheat	Percentage of callus regeneration (%)		
	NaCl Concentration (g.l ⁻¹)		
	0	4	16
Waha	71.63 ^{bcd}	68.83 ^{cd}	27.4 ^{gh}
Gumgum Rkhem	85.01 ^{ab}	86.34 ^a	38.72 ^{fg}
Belioni	76.91 ^{abc}	60.14 ^{de}	49.64 ^{ef}
Adnan-2	76.66 ^{abc}	73.34 ^{abc}	32.98 ^{gh}
Beni mestina	69.16 ^{cd}	62.11 ^{de}	35.89 ^{fg}
Adna-1	34.7 ^{gh}	29.65 ^{gh}	21.82 ^h
<i>Means</i>	69,03 ^a	61,36 ^b	34,48 ^c

Means with the same letter(s) in the same column are not significantly different at 5% using Duncan multiple range test

Table 3: Regeneration of embryogenic callus induced in medium with different concentration of NaCl after 8 weeks.

Genotypes of wheat	Percentage of embryogenic callus (%)		
	NaCl Concentration (g.l ⁻¹)		
	0	4	16
Waha	74.38 ^{bc}	61.45 ^{dc}	2.6 ^j
Gumgum Rkhem	91.02 ^a	54.49 ^{efg}	44.6 ^{gh}
Belioni	83.24 ^{ab}	31.21 ⁱ	79.47 ^b
Adnan-2	57.55 ^{def}	35.99 ^{hi}	75.43 ^{bc}
Beni mestina	43.45 ^{gh}	43.58 ^{gh}	46.85 ^{fgh}
Adna-1	67.92 ^{cd}	30.95 ⁱ	73.07 ^{bc}
<i>Means</i>	69.59 ^a	42.94 ^b	53.67 ^c

Means with the same letter(s) in the same column are not significantly different at 5% using Duncan multiple range test

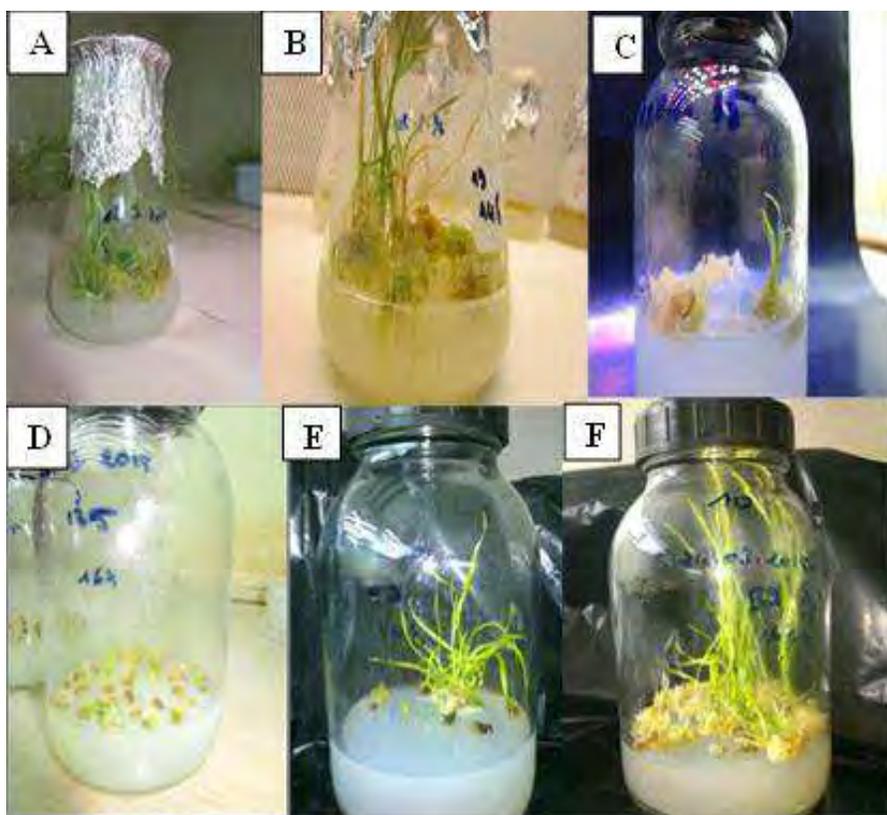
Table 4: Regeneration via Somatic Embryo induced in regeneration medium with different concentration of NaCl after 4 weeks of incubation.

Genotypes of wheat	Percentage of Regeneration (%)		
	NaCl Concentration (g.l ⁻¹)		
	0	4	16
Waha	13.33	22.28	14.15
Gumgum Rkhem	1.3	4.67	15.6
Belioni	30.36	5.26	4.07
Adnan-2	24.74	16.11	3.38
Beni mestina	5.43	7.8	3.27
Adna-1	6.2	5.39	5.71
<i>Means</i>	13.56	10.25	7.68

Means with the same letter(s) in the same column are not significantly different at 5% using Duncan multiple range test.

Table 5: polymorphism rate for the six durum wheat using OPC-05, OPG-09, OPO-13, OPF-20, OPA-17, OPO-05, OPO-06, OPO-03 and B-19 random primers

Primer code	Sequence (5'-3')	Total amplified band	Polymorphic band	Polymorphism (%)
OPC-05	GATGACCGCC	128	2	4.54
OPG-09	CTGACGTCAC	89	1	1.12
OPE-13	CCCGATTCCGG	72	8	11.11
OPF-20	GGTCTAGAGG	80	4	5
OPA-17	GACCGCTTGT	32	2	6.25
OPO-05	CCCAGTCACT	44	2	4.54
OPO-06	CCACGGGAAG	69	1	1.44
OPO-03	CTGATACGCC	43	2	4.64
B-19	ACCCCCGAAG	/	/	/
Total		557	22	/

**Figure.1:** Regeneration of wheat varieties: (A) regeneration of Beliouni genotype on control medium. (B) regeneration of Adnan-2 genotype in control medium. (C) regeneration of Waha genotype on MS medium supplemented with 4g.l^{-1} NaCl. (D) regeneration started of Adnan-2 genotype on MS medium supplemented with 16g.l^{-1} NaCl. (E) (F) regeneration of Adnan-2 genotype on MS medium supplemented with 16g.l^{-1} NaCl.

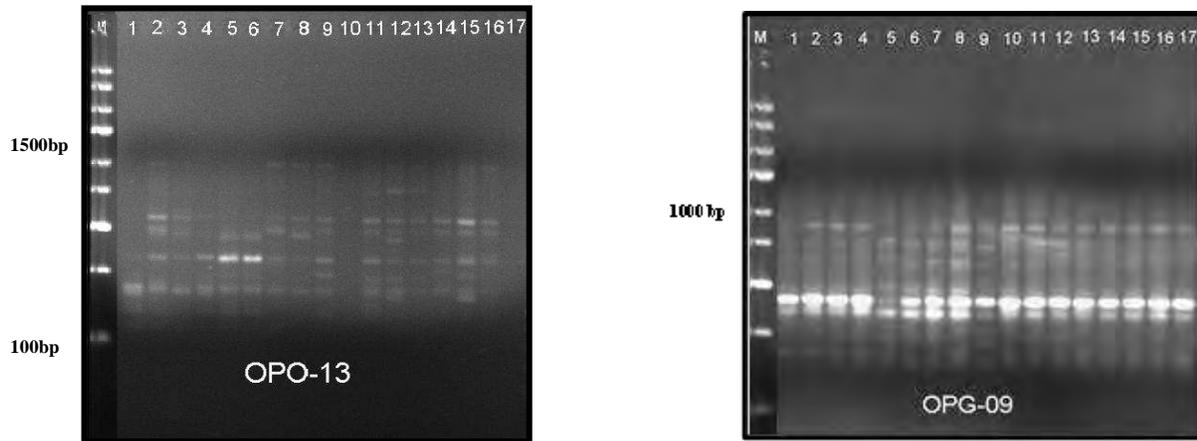


Figure.2: RAPD products obtained by PCR amplification and different primers OPO-13 and OPG-09 of DNA isolated from six durum wheat genotypes in different condition of culture. 1-Waha regenerated (*in vitro*) with 16% NaCl after acclimatization. 2-Waha regenerated (*in vitro*) with 16% NaCl before acclimatization. 3-Waha control regenerated (*ex vitro*) in absence of NaCl. 4-Waha control regenerated (*ex vitro*) in 16% NaCl. 5-Beliouni regenerated (*in vitro*) with 16% NaCl. 6-Beliouni control regenerated (*ex vitro*) in 16% NaCl. 7-Beliouni control regenerated (*ex vitro*) in absence of NaCl. 8-Gemgum Khem regenerated (*in vitro*) with 16% NaCl. 9-Gemgum Khem control regenerated (*ex vitro*) in absence of NaCl. 10-Adna-2 regenerated (*in vitro*) with 16% NaCl. 11-Adna-2 control regenerated (*ex vitro*) in 16% NaCl. 12-Adna-2 control regenerated (*ex vitro*) in absence of NaCl. 13-Beni mestina control regenerated (*ex vitro*) in 16% NaCl. 14-Beni Mestina control regenerated (*ex vitro*) in absence of NaCl. 15-Adna-1 regenerated (*in vitro*) with 16% NaCl. 16-Adnan-1 control regenerated (*ex vitro*) in absence of NaCl. 17- Adna-1 control regenerated (*ex vitro*) in 16% NaCl. M: DNA Marker shown to the left of the figure.

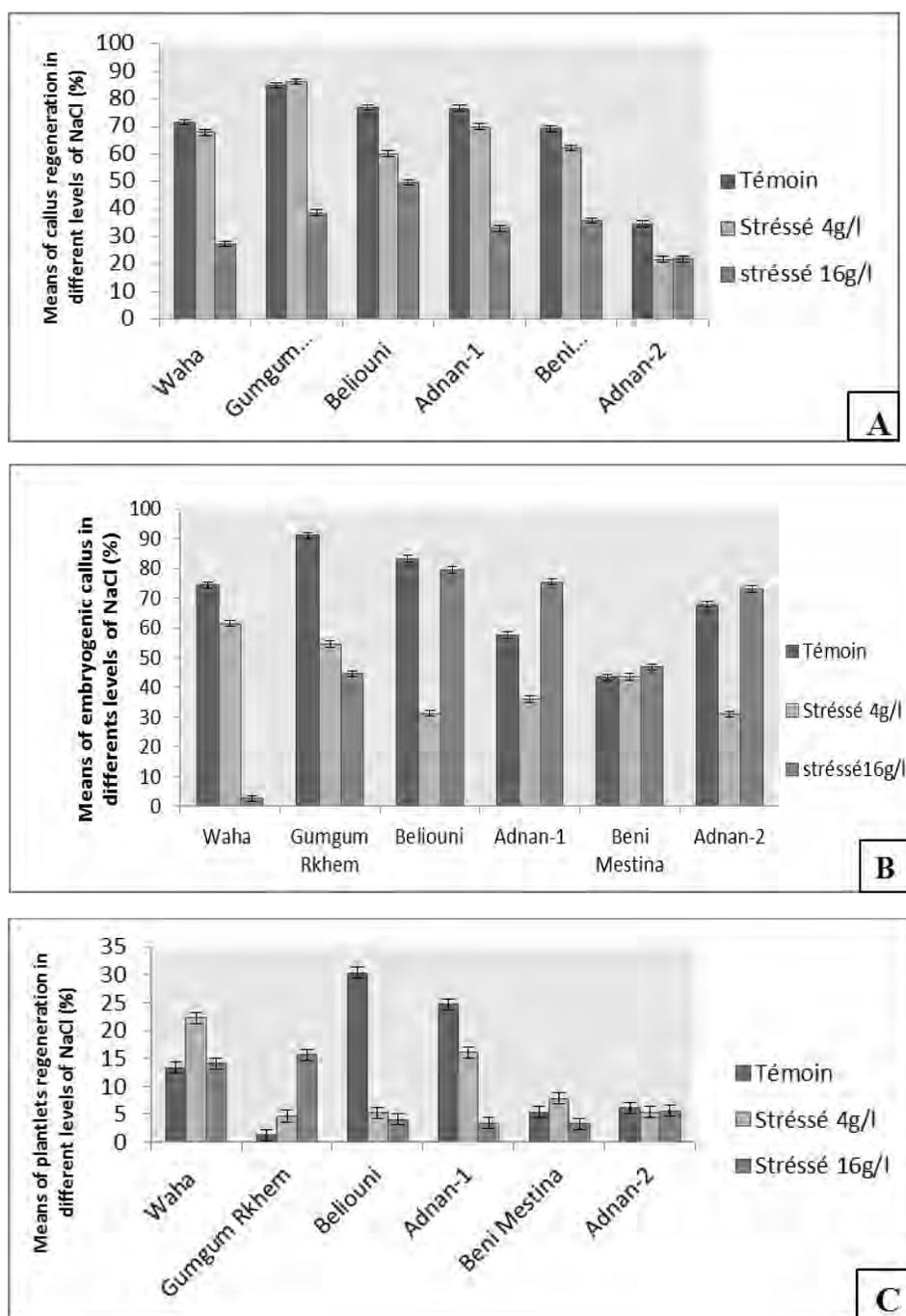


Figure 3: *in vitro* culture response of mature embryo of six different durum wheat genotypes. A) Means of callus regeneration in the six genotypes of wheat in different levels of NaCl. Values are means + SD (n=3). B) Means of embryogenic callus in the six genotypes of wheat in different levels of NaCl. Values are means + SD (n=3). C) Means plantlets regeneration in the six genotypes of wheat in different levels of NaCl. Values are means + SD (n=3).

Discussion:

The callogenesis was initiated from mature embryos, which are the most frequently used explants for the initiation of wheat tissue culture and DNA delivery techniques, moreover, mature embryos are readily available throughout the year, these results are confirmed by different works (Delporte *et al.*, 2001, Salama *et al.*, 2013, Almobasher *et al.*, 2014), the production of callus in wheat is limited by addition of 2,4-D at the medium induction. 2,4-D was reported as the most widely used growth regulator for induction and callus maintenance in wheat (Quiroz-Figeroa *et al.*, 2006, Al. Abdallah *et al.*, 2012), the regulator was added in low concentration, several researches indicated that for callus and embryogenesis induction in wheat the optimal concentration is between 2 mg/l and 4mg/l it depend on the genotypes (Aydin *et al.*, 2011, Bouiamrine *et al.*, 2012, Rjurkar *et al.*, 2013) in our experimentation the concentration of 3.5mg/l gives a good response to culture these results agree with those reported in (Umer *et al.*, 2009, Ayolié *et al.*, 2011).

For purpose of studied the effect of the NaCl on the callogenesis, the development of somatic embryo and selection tolerant genotypes of wheat; different concentrations of NaCl were added on the culture medium, the results showed that the regeneration rate of callus was reduced with increasing NaCl level in the culture medium, but the effects were different among various NaCl levels. This level is very important with 16g.l⁻¹ NaCl. Callus initiated on MS medium added to 4g.l⁻¹ NaCl produced a percentage of regeneration identically significant to callus initiated on MS medium without NaCl (control), the same results was observed in (Ayolié *et al.*, 2011) works. In our case the rate of regeneration of callus represent 88.88 and, 49.94% of the one of control respectively with 4, 16g.l⁻¹ NaCl, also wheat has different behaviors in their ability to produce plantlets via callus cultivated in salt medium. The analyses of (Figure. 3) highlights that the six varieties of wheat behaves differently in the different stage of cultures, in the callus induction; Gungum Rkhem, Beliouni and Waha have the highest percentage of response in control medium whereas, in 16g.l⁻¹ NaCl medium, the varieties react differently in the culture. Beni mestina genotype product a highest percentage of callus in 16g.l⁻¹ than in control medium it means that Beni mestina varieties Resist better to the salt stress than anthers varieties (Figure.3 A). Our results are in agreement with those obtained by (Benderradji *et al.*, 2007). That shows that the efficiency of callus proliferation differed significantly between two bread wheat genotype at each of the tested salt stress levels. However when we analyse the responses of the six durum wheat genotype in the somatic embryogenesis induction (Figure. 3 B), we note that: in the control medium the varieties which have the highest rate of induction of callus are not the ones which produced the highest rate of somatic embryos, however in 16g.l⁻¹ NaCl Adnan-1, Adnan-2 and Beliouni are the varieties witch has de highest rate of somatic callus, it means that these varieties are more tolerant to salt than the first one. When we compared the rate of somatic callus induction in the two levels of NaCl (4 and 16g.l⁻¹) the results showed that the rate in 16g.l⁻¹ is more important than in 4g.l⁻¹, we deduct that salt stress at 16g.l⁻¹ stimulates embryogenic callus development, this information is in agreement with the results reported by (Solis-Marroquin *et al.*, 2011) . Salts stress was applied during callus induction and regeneration phase, the results showed that salinity causes a significant reduction in plantlets regenerative capacity the results in (figure. 3 C) prove that the rate of regeneration is decreasing whit increasing the concentration of salt stress NaCl, our results agree with those reported by (Nawaz *et al.*, 2013) ,and we observed that the percentage of regeneration is very low 13.5, 10.25 and 7.68% respectively in 0, 4, 16g.l⁻¹ NaCl, this weakness is due at recalcitrant nature of durum wheat (Yones *et al.*, 2013) , thus Somatic embryo formation and plant regeneration under saline conditions was shown to be strongly genotype dependent. The genotype effect on salt stress response has been recently shown by (Zair *et al.*, 2003).

The results of the *in vitro* culture are confirmed by the Molecular Genetic Marker; the aim of the present study was to provide polymorphic RAPD markers suitable for detected somaclonal variation produced under salt stress. RAPD amplification polymorphism is a powerful technique for detection of somaclonal variation (Khatib *et al.*, 2011).

Eight positive markers (OPC-05, OPG-09, OPO-13, OPF-20, OPA-17, OPO-05, OPO-06, OPO-03) were found to be related with salt stress which are in conformity with the results obtained by (Rajurkar *et al.*, 2013) with found six positive markers related with salt stress in maize. (Younis *et al.*, 2007) developed four RAPD markers for salt tolerance in sorghum. In our study the result showed that the primer used and there amplification in the plant regenerated *in vitro* under salt stress, can be the proof that the six genotypes of durum wheat has developed a somatic variation under salt stress, We notice that There is a difference between the numbers of fragment amplified, its means that all durum wheat genotypes are not always identical in their DNA capacity to be amplified. The same results was fond in the work of (Hamaid *et al.*, 2013).

Conclusion:

In vitro tissue culture could be an important means of improving crop tolerance and yield through genetic transformation as well as by induced somaclonal variation. Therefore, it is important to control well all the parameters during the *in vitro* culture: The choice of the explant, the best concentration of regulator and the level of

tissue culture to start the stress selection. The results of this study indicated that the effect of callus production, embryogenic callus induction and plantlets regeneration was influenced by addition NaCl in the culture medium, in a low concentration of NaCl (4g.l^{-1}), there is no significant effects on the tissue culture, but depressive effect accentuated by high concentration of salt (16g.l^{-1}). Differential genotypic response was also noted in callus ability to proliferate and regenerate plantlets under concentration of NaCl. Also, the results showed that all durum wheat genotypes were not always identical in their DNA ability to be amplified. RAPD analysis is useful molecular tools to indicate genetic polymorphism between the durum wheat genotypes under salt stress.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria. Authors thank the ITGC (Institut Technique des Grandes Cultures) for providing seeds. Authors thank also Mr BELBEKRI Nadir for his help.

Références

- Abdollah¹, H. A., Said, A. G. E., & Khalafalla, M. M. (2014). Embryogenesis and plantlet regeneration optimization of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agricultural Technology*, 10(3), 679-693.
- Ahmad, A., Zhong, H., Wang, W., & Sticklen, M. B. (2002). Shoot apical meristem: in vitro regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38(2), 163-167.
- Aydin, M., Tosun, M., & Haliloglu, K. (2013). Plant regeneration in wheat mature embryo culture. *African Journal of Biotechnology*, 10(70), 15749-15755.
- Ayolié, K., El Yakoubi, H., Kouakou, T.H., and Atman, R. (2011). Responses of some wheat genotypes to callus regeneration under in vitro salt stress. *International journal of research in biotechnology and biochemistry*, 1(1):11-17.
- Balkrishna, R. A., & Shankarrao, S. S. (2013). In vitro screening and molecular genetic markers associated with salt tolerance in maize. *African Journal of Biotechnology*, 12(27), 4251-4255.
- Benkirane, H., Sabounji, K., Chlyah, A., & Chlyah, H. (2000). Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61(2), 107-113.
- Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., & Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115(5), 591-602.
- Bouharmont, J. (1991). Utilisation de la variation somaclonale et de la sélection in vitro à l'amélioration du riz. In 2. *Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Vegetales. Tunis (Tunisie). 4-9 Dec 1989.*
- Bouiamrine, E., Diouri, M., & El-Halimi, R. (2012). Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity from mature and immature durum wheat embryos. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 2(9), 29-39.
- Cassells, A. C., Joyce, S. M., Curry, R. F., & McCarthy, T. F. (1999). Detection of economically important variability in micropropagation. In *Plant Biotechnology and in vitro Biology in the 21st Century* (pp. 241-244). Springer Netherlands.
- Cullis, C., Rademan, S., & Kunert, K. J. (1999). Method for finding genetic markers of somaclonal variation. *International publication number WO, 99(53100)*, 1999.
- Delporte, F., Mostade, O., & Jacquemin, J. M. (2001). Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67(1), 73-80.
- El Goumi, Y., Fakiri, M., Lamsaouri, O., Benchekroun, M., & Hassani, M. F. (2014). Analyse de la capacité androgénétique de trois cultivars de blé dur (*Triticum durum*) et trois cultivars de blé tendre (*Triticum aestivum*). *Lebanese Science Journal*, 15(1), 85.
- El-Houssine, B., & Mohammed, D. (2012). Response of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) callus culture to osmosis induced drought stress caused by polyethylene glycol (PEG). *Ann Biol Res*, 3(9), 4555-4563.
- Joshi, R., Shukla, A., & Kumar, P. (2013). In Vitro Water Deficit Stress Induced Genotypic Alterations In Protein Profile Among Aromatic Rice Varieties. *Annals of Plant Sciences*, 2(10), 455-458.
- Karp, A. (1989). Can genetic instability be controlled in plant tissue cultures. *IAPTC newsletter*, 58, 2-11.
- Karp, A. (1993). Are your plants normal? Genetic instability in regenerated and transgenic plants. *Agro-Food-Industry Hi-Tech May/June*, 7-12.
- Karp, A., Steele, 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(3), 405-412.
- Khatib, I., and EL-Banna, A. N. (2011). Detection of somaclonal variations in potato using RAPD markers. *Egypt.J. Genet. Cytol*, (40) : 227-238.

- Nawaz, S., Ahmed, N., Iqbal, A., & Khaliq, I. (2013). Optimization of regeneration protocols for wheat under drought and salt stress. *Pak. J. Agri. Sci*, 50(4), 663-670.
- Özgen, M., Türet, M., Özcan, S., & Sancak, C. (1996). Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. *Plant Breeding*, 115(6), 455-458.
- Pathak, M. R., & Hamzah, R. Y. (2008). An effective method of sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation of chickpeas. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(1), 65-71.
- Patnaik, D., Vishnudasana, D., & Khurana, P. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of mature embryos of *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. *Current science*, 91(3), 307-317.
- Pernisová, M., Klíma, P., Horák, J., Válková, M., Malbeck, J., Souček, P., ... & Hejátko, J. (2009). Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3609-3614.
- Pernisová, M., Klíma, P., Horák, J., Válková, M., Malbeck, J., Souček, P., ... & Hejátko, J. (2009). Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3609-3614.
- Phillips, R. L., Kaepler, S. M., & Olhoft, P. (1994). Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5222-5226.
- Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M., & Loyola-Vargas, V. M. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(3), 285-301.
- Rashid, U., Ali, S., Ali, G. M., Ayub, N., & Masood, M. S. (2009). Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in Pakistani wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(3), 4-5.
- Ray, M., Ghosh, S. and Ghosh, B. (1996) Plant Regeneration from Embryogenic Calli of Heat Tolerant and Sensitive Cultivars under Thermal Stress. *Physiology and Molecular Biology of Plant*, 2, 59-66.
- Saker, M. M., & Sawahel, W. A. (1998). Cultivar identification and detection of somaclonal variations using RAPD fingerprinting in Garlic. *Arab. J. Biotechnol*, 1, 69-75.
- Salama, E.A., Abido, A.I.A., Khaled, A.E., and Abdelsalam, N.R. (2013). Embryo callus induction and regeneration of some Egyptian wheat cultivars. *Research journal of agriculture and biological sciences*, 9 (2): 69-103.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor.
- Soliman, H. I., & Hendawy, M. H. (2013). Selection for drought tolerance genotypes in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) under *in vitro* conditions. *Middle-East J. Sci. Res*, 14, 69-78.
- Soliman, H. I., & Hendawy, M. H. (2013). Selection for drought tolerance genotypes in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) under *in vitro* conditions. *Middle-East J. Sci. Res*, 14, 69-78.
- Solís-Marroquín, D., Lecona-Guzmán, C. A., Canto-Flick, A., Bello-Bello, J. J., Santana-Buzzy, N., & Iglesias-Andreu, L. (2011). *In vitro* selection of a salt-tolerant embryogenic line in Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience*, 46(12), 1666-1671.
- Wani, S. H., Lone, A. A., da Silva, T., & Gosal, S. S. (2010). Effects of NaCl stress on callus induction and plant regeneration from mature seeds of rice (*Oryza sativa* L.). *Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, 4(1), 57-61.
- Yang, X., & Zhang, X. (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 29(1), 36-57.
- Younis, R. A., Ahmed, M. F., & El-Menshaway, M. M. (2007). Molecular genetic markers associated with salt tolerance in grain sorghum. *Arab J. Biotechnol*, 10, 249-258.
- Zair, I., Chlyah, A., Sabounji, K., Tittahsen, M., & Chlyah, H. (2003). Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of *in vitro* selection pressure. *Plant cell, tissue and organ culture*, 73(3), 237-244.
- Zale, J. M., Borchardt-Wier, H., Kidwell, K. K., & Steber, C. M. (2004). Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76(3), 277-281.

- **Résumés des Communications scientifique :**

1) BENABDELHAFID.Z; DJEKOUN. A (2010) : Effet Du Poly Ethylene Glycol (PEG) A Différentes Concentrations Sur La Callogénese Chez Les Varietes De Ble Dur Et Tendre (Culture D'embryons Matures) Séminaire Internationale De Biologie Végétale Et Ecologie. Constantine : 22-25 Novembre 2010. « Communication affichée »

Résumé :

La culture *in vitro* est utilisée comme un moyen de sélection ; les vitro variations sont utilisées comme source pour la sélection des variétés à valeurs ajoutées.

En exerçant une pression sélective sur les différents cals cultivées sur différentes concentrations de PEG, il est ainsi possible d'orienter ces vitro plants vers l'acquisition d'un caractère intéressant par la plante.

L'objectif essentiel visé par ce travail consiste à cultiver *in vitro* des embryons matures issus des six variétés de blé sur un milieu MS, afin d'induire une callogénèse sous l'effet d'un régulateur de croissance (2.4-D), et d'induire un stress hydrique par l'utilisation de trois différentes concentrations d'un agent sélectif (1g/l, 3g/l et 5g/l) , Poly Ethylène Glycol, afin d'exercer une pression sélective et pouvoir sélectionner *in vitro* la variété la plus résistante à différentes concentrations de PEG.

Mots clés : 2.4-D (l'Acide 2.4- dichlorophenoxyacetic), PEG (Polyéthylène Glycol), Blé, Callogénèse, Embryon mature

- 2) **BENABDELHAFID.Z; DJEKOUN. A ; YKHLEF.N (2012)** : Obtention et fusion de protoplastes à partir de cals embryogènes de différents types de céréales. Tolérance à la sécheresse chez le blé dur (Aspect moléculaire et génétique). 1^{er} congrès Aide à l'agriculture Algérienne. Annaba 22-25 Novembre. « Communication affichée ».

Résumé :

Pour but d'obtenir une variété de blé dur plus résistante à la sécheresse, six différentes variétés de blé dur (Gumgoumer Khmer, Azzegar, Adnan-2, Lahn/ch 12003, Azzagar116) ; trois variétés d'eagilops (AC.Géniculata, Trincialis, Ventricosa) ; une variété de seigle RC 9 ; et six variétés de triticales (Babor, Meliani, Foca, Babor/Meliani ; Babor/Foca ; Meliani/Foca) ont été mis en culture *in vitro* sur milieu MS additionnée a une auxine (2.4-D) en vue d'obtenir des cals embryogènes et acquérir l'obtention de protoplastes pour pouvoir réunir le matériels génétique de ces derniers ; sur ce principe, un pourcentage élevé d'embryons somatiques a été remarquer à partir du sixième mois de culture, le pourcentage le plus élevé a été remarqué chez la variété Adnan -2.

La réussite de l'obtention de protoplastes à partir de cals a été acquise chez toutes les céréales utilisées, cependant la densité de protoplastes viables reste à améliorer afin de réussir la fusion des différentes espèces.

Mot clé : Blé dur, protoplastes, embryons somatiques, culture *in vitro*, 2.4-D

- 3) **BENABDELHAFID.Z; DJEKOUN. A. (2013).** Embryogénèse Somatique Et Variations Somaclonales Chez Le Blé Dur (*Triticum durum*). Tolérance A La Salinité (Aspect Génétique Et Moléculaire). Les doctoriales 2013. Université des frères Mentouri, Constantine, 2-3 Mars 2013. Filière : Biologie Végétale et Ecologie. (Communication orale et affichée).

Afin d'obtenir des plantes indépendantes des contraintes naturelles, nous optons pour les techniques de la biotechnologie végétale qui joueront un rôle capital, ainsi, nous permettrons de franchir les barrières génétiques et de mieux exploiter les ressources végétales.

L'embryogénèse somatique est le seul moyen pour comprendre les bases moléculaires et cellulaires du développement de la plante (Attila et al., 2003), celle-ci consiste en un processus de développement de cellules somatiques, non-gamétiques, produisant des embryons normaux du point de vue morphologique et du développement. Les explants sont cultivés dans un milieu riche en auxine. Les cellules de l'explant se différencient et se divisent, elles deviennent compétentes pour initier un programme embryogène, mais ce n'est que lorsqu'elles sont mises en culture dans un milieu sans auxine que le développement des embryons somatiques a lieu.

Différentes approches ont été étudiées et réalisées au courant des trois années de pratiques :

- Réalisation d'une callogénèse à partir d'embryons matures de six variétés de blé dur, et sélection des variétés les plus tolérantes.
- Obtention d'embryons somatiques après plusieurs mois de cultures afin d'arriver à une régénération de plantules *in vitro* et étudier les variations somaclonales.
- Obtention de protoplastes à partir de cals embryogènes afin de procéder à des fusions et à l'obtention de génotypes tolérants.
- Etude de l'effet des PGPR sur la régénération de plantules a partir de cals et étudier la possibilité de remplacer l'effet des hormones de croissance par des PGPR.
- Etude de l'effet de différents agents de sélection sur l'embryogénèse somatique comme (NaCl, PEG)

Vu la complexité du sujet, le temps que prend l'obtention et la réussite de l'embryogénèse somatique, ainsi que l'aspect récalcitrant du blé dur, l'objectif principal de la thèse est en cours de réalisation, une étude moléculaire est indispensable pour la finalisation du sujet et la rédaction d'un article.

- 4) **BENABDELHAFID.Z; DJEKOUN. A. (2013)** Embryogénèse Somatique and somaclonales variations at durum wheat forced abiotic Tolerance (genetic and molecular Aspect). Les "Journées Scientifiques Le 14 et 15 mai 2013 " Biotechnologie Végétale maîtrise et applications. « Communication orale et affichée ».

Résumé :

Afin d'obtenir des plantes indépendantes des contraintes naturelles, nous optons pour les techniques de la biotechnologie végétale qui joueront un rôle capital, ainsi, nous permettrons de franchir les barrières génétiques et de mieux exploiter les ressources végétales.

L'embryogénèse somatique est le seul moyen pour comprendre les bases moléculaires et cellulaires du développement de la plante (Attila et al., 2003), celle-ci consiste en un processus de développement de cellules somatiques, non-gamétiques, produisant des embryons normaux du point de vue morphologique et du développement. Les explants sont cultivés dans un milieu riche en auxine. Les cellules de l'explant se dédifférencient et se divisent, elles deviennent compétentes pour initier un programme embryogène, mais ce n'est que lorsqu'elles sont mises en culture dans un milieu sans auxine que le développement des embryons somatiques a lieu.

Pour obtenir des embryons somatiques et étudier la variation somaclonale, des embryons matures ont été obtenues à partir de six variétés de blé dur. Après plusieurs mois de culture des variétés compétentes ont été mise en évidence, ces dernières ont été soumises à différentes techniques comme l'obtention et la culture et fusion de protoplastes. Cependant cette approche n'a pas donné des résultats favorables vu que le blé est une plante récalcitrante, d'autres essais sont en cours ainsi que d'autres approches ont été réalisées comme l'interaction entre PGPR et les cellules somatiques, l'effet des PGPR sur le développement de la callogénèse est en cours de développement afin de mettre en évidence un éventuel remplacement des régulateurs de croissance par des PGPR.

Mots clés : blé dur, embryon mature, embryogénèse somatique, variations somaclonales, protoplastes, PGPR.

- 5) **BENABDELHAFID.Z; DJEKOUN. A (2014)** : Contribution des techniques de biotechnologie pour l'amélioration de la résistance du blé dur aux différents stress abiotiques. Séminaire Internationale Sur Les Sciences Alimentaires. Constantine les :14, 15, 16 octobre 2014. « Communication affichée ».

Résumé :

Afin d'obtenir des plantes indépendantes des contraintes naturelles et contribuer à l'amélioration de la production céréalière pour but de réaliser une sécurité alimentaire, nous optons pour les techniques de la biotechnologie végétale qui joueront un rôle capital, ainsi, nous permettrons de franchir les barrières génétiques et de mieux exploiter les ressources végétales.

L'embryogénèse somatique est le seule moyen pour comprendre les bases moléculaires et cellulaires du développement de la plante, celle-ci consiste en un processus de développement de cellules somatiques, non-gamétiques, produisent des embryons normaux du point de vue morphologique et du développement. Les explants sont cultivés dans un milieu riche en auxine. Les cellules de l'explant se dédifférencient et se divisent, elles deviennent compétentes pour initier un programme embryogène, mais ce n'est que lorsqu'elles sont mises en culture dans un milieu sans auxine que le développement des embryons somatiques a lieu.

Différentes approches ont été étudiées et réalisées :

- Réalisation d'une callogénèse à partir d'embryons matures de six variétés de blé dur, et sélection des variétés les plus tolérantes.
- Obtention d'embryons somatiques après plusieurs mois de cultures afin d'arriver à une régénération de plantules *in vitro* et étudier les variations somaclonales.
- Obtention de protoplastes à partir de cals embryogène afin de procéder à des fusions et à l'obtention de génotypes tolérants.
- Etude de l'effet des PGPR sur la régénération de plantules à partir de cals et étudier la possibilité de remplacer l'effet des hormones de croissance par des PGPR.
- Etude de l'effet de différents agents de sélection sur l'embryogénèse somatique comme (NaCl, PEG)

- 6) **BENABDELHAFID.Z; DJEKOUN. A. (2015).** Embryogénèse Somatique Et Variations Somaclonales Chez Le Blé Dur (*Triticum durum*). Tolérance A La Salinité (Aspect Génétique Et Moléculaire). Les doctorales 2015. Université des frères Mentouri, Constantine, Avril 21. Filière : Biologie Végétale et Ecologie. (Communication orale et affichée).

Résumé :

Afin de surmonter les contraintes naturelles ; différentes techniques et approches de biotechnologie ont été utilisées pour améliorer le comportement des différentes variétés et sélectionner les variétés les plus performantes.

La voie de l'embryogénèse somatique est actuellement intégrée dans de nombreux schémas de sélection puisqu'elle permet de diminuer sensiblement la longueur des cycles d'amélioration comme par exemple , le temps nécessaire à la valorisation du matériel sélectionné âgé ou juvénile ou la production de parents hybrides nécessaires à la diffusion de nouvelles variétés, le développement des embryons somatiques est obtenu après une mise en culture de plusieurs mois de six variétés de blé dur sur un milieu nutritif additionné de 2.4-D qui est une auxine nécessaire au développement de la callogénèse ainsi d'embryon somatique, la sélection des variétés tolérantes par apport à un stress abiotique se fait par l'addition d'un agent sélective tels que le PEG pour la tolérance à la sécheresse et le NaCl pour la tolérance au stress salin.

La présente étude s'est basée sur l'addition de différentes concentrations de NaCl (0, 4, 8, 12, 16g/l) au milieu de culture afin d'étudier l'effet de stress salin sur l'embryogénèse somatique. Les différents paramètres étudiés en ce qui concerne la culture d'embryons matures sont : le taux de la callogénèse, taux de germination, taux de cals embryogènes le nombre moyens de plantes régénérées par cal et pour l'étude de l'effet du stress salin les différents paramètres sont : le taux de croissance des cals, la teneur en eau, teneur en K^+ , teneur en Na^+ et le rapport K^+/Na^+ .

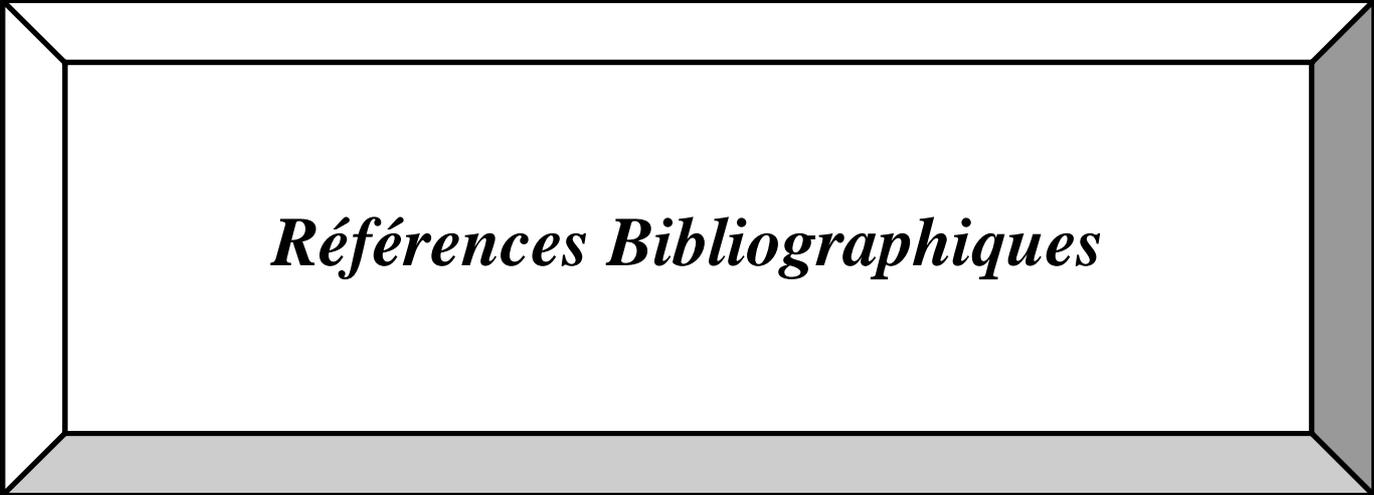
Après plusieurs mois de culture les cals embryogènes (cals élites) ont été transférés sur milieu de régénération MS+1mg/l Kin + 2 mg/l AIA afin de régénérer des plantes entières et pouvoir étudier les différentes variations somaclonales produites lors de la culture *in vitro*.

La mise en évidence de ces variations est généralement exploitée par des techniques de révélation par méthodes moléculaire. Lors de la présente étude, une extraction de l'ADN à partir de plantes régénérées est réalisée et soumise à une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qui permet à partir de cette ADN matrice et la présence de 9 amorces RAPD arbitraire,

Valorisation et productions Scientifiques

un taux de polymorphisme important a été révélé indiquant la présence de variations somaclonales.

Mots clés : blé dur, embryon mature, embryogénèse somatique, variations somaclonales, stress salin



Références Bibliographiques

- Abbassenne, F., Bouzerzour, H., & Hachemi, L. (1997). Phénologie et production du blé dur (*Triticum durum* Desf.) en zone semi-aride. *Ann. Agron. INA*, 18, 24-36.
- Abdallah, H. A., Said, A. G. E., & Khalafalla, M. M. (2012). Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in some wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars grown in Sudan. *African Journal of Biotechnology*, 11(16), 3793-3799.
- Abdelly, C., Öztürk, M., Ashraf, M., & Grignon, C. (Eds.). (2008). *Biosaline agriculture and high salinity tolerance*. Springer Science & Business Media. ISBN 978-3-7643-8553-8 Birkhäuser Verlag AG, Basel – Boston – Berlin.
- Afrasiab, H., & Iqbal, J. (2012). Genetic analysis of somaclonal variants and induced mutants of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Diamant using RAPD markers. *Pak. J. Bot.*, 44(1), 215-220.
- Afzal, A., Rashid, H., Khan, M. H., Chaudhry, Z., & Malik, S. A. (2010). High frequency regeneration system optimization for wheat cultivar inqilab-91. *Pak. J. Bot.*, 42(3), 1857-1862.
- AgriMer. (2015). Turbulences sur le marché du blé dur ? Retour sur la campagne 2014/15 et perspectives 2015/16. Note de conjoncture : Analyse économique de France AgriMer.
- AL Masoody, M. M. M., & Stănică, F. (2015). Effect of growth regulators for the induction of Callus from the apical bud on In Vitro of Rosemary Plant (*Rosmarinus officinalis* L.).
- Alaoui, M. M., El Jourmi, L., Ouarzane, A., Lazar, S., El Antri, S., Zahouily, M., & Hmyene, A. (2013). Effet du stress salin sur la germination et la croissance de six variétés marocaines de blé (Effect of salt stress on germination and growth of six Moroccan wheat varieties).
- Alcantara, G. B. D., Dibax, R., Oliveira, R. A. D., Bessalho Filho, J. C., & Daros, E. (2014). Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars RB855156 and RB72454. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 36(1), 63-72.
- Al-Karaki, G. N., & Clark, R. B. (1998). Growth, mineral acquisition, and water use by mycorrhizal wheat grown under water stress. *Journal of Plant Nutrition*, 21(2), 263-276.

Références bibliographiques

- Allal, M. (2015). L'Algérie va importer 4.5 million de quintaux de blé. Citer dans : OAIC : Office Algérienne Interprofessionnel des céréales. L'Econews : http://www.leconews.com/fr/actualites/nationale/commerce/l-algerie-va-importer-4-5-millions-quintaux-de-ble-01-06-2015-174543_292.php. (28/07/2015).
- Amtmann, A., & Sanders, D. (1998). Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Advances in Botanical Research*, 29, 75-112.
- Anonyme. (2008). L'Algérie couvre seulement 25 % de ses besoins en céréales. <http://www.liberte-algerie.com> (29/10/2015).
- Archak, S., Gaikwad, A. B., Gautam, D., Rao, E. V., Swamy, K. R., & Karihaloo, J. L. (2003). Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. *Genome*, 46(3), 362-369.
- Arnold, M. L., Buckner, C. M., & Robinson, J. J. (1991). Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(4), 1398-1402.
- Arzani, A., & Mirodjagh, S. S. (1999). Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction and in vitro salt stress. *Plant cell, tissue and organ culture*, 58(1), 67-72.
- Asemota, O., Eke, C. R., & Odewale, J. O. (2007). Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. *African Journal of Biotechnology*, 6(20).
- Ashraf, M., & Khanum, A. (1997). Relationship between ion accumulation and growth in two spring wheat lines differing in salt tolerance at different growth stages. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 178(1), 39-51.
- Aydin, M., Tosun, M., & Haliloglu, K. (2013). Plant regeneration in wheat mature embryo culture. *African Journal of Biotechnology*, 10(70), 15749-15755.
- Ayed-Slama, O., Ayed, S., & Slim-Amara, H. (2015). Selection of Tolerant Lines to Salinity Derived from Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) in Vitro Culture. *Agricultural Sciences*, 6(7), 699.
- Ayolié K, El Yakoubi H, Kouakou TH, Atman R. 2011. Responses of some wheat genotypes to callus regeneration under in vitro salt stress. *International journal of research in biotechnology and biochemistry*, 1,11-17

Références bibliographiques

- Ayolié, K., El Yacoubi, H., & Rochidi, A. (2007). Influence du 2, 4-D et de l'explant embryonnaire sur la callogenèse du blé dur. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 146, 97-112.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O., & Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63(2), 147-173.
- Balkrishna, R. A., & Shankarrao, S. S. (2013). In vitro screening and molecular genetic markers associated with salt tolerance in maize. *African Journal of Biotechnology*, 12(27), 4251.
- Barakat, M. N., & Abdel-Latif, T. H. (1996). In vitro selection of wheat callus tolerant to high levels of salt and plant regeneration. *Euphytica*, 91(2), 127-140.
- Bartels, D., & Nelson, D. (1994). Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics. *Plant, Cell & Environment*, 17(5), 659-667.
- Ben Nja. R. (2014). Effet d'un stress salin sur la teneur en polymères pariétaux dans les feuilles de luzerne (*Medicago sativacv* Gabès) et sur la distribution dans les cellules de transfert des fines nervures. Thèse de doctorat en Biosciences de l'Environnement et de la Santé Discipline Biologie et Physiologie Végétales. Cotutelle entre l'Université de Limoges et Carthage. Pages : 81- 82.
- Benderradji, L., Brini, F., Kellou, K., Ykhlef, N., Djekoun, A., Masmoudi, K., & Bouzerzour, H. (2011). Callus induction, proliferation, and plantlets regeneration of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under saline and heat stress conditions. *ISRN Agronomy*, 2012.
- Benidire, L., Daoui, K., Fatemi, Z. A., Achouak, W., Bouarab, L., & Oufdou, K. Effet du stress salin sur la germination et le développement des plantules de *Vicia faba* L. (Effect of salt stress on germination and seedling of *Vicia faba* L.).
- Bettaieb, T., Denden, M., & Mhamdi, M. (2008). Régénération in vitro et caractérisation physiologique de variants somaclonaux de glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) tolérants aux basses températures. *Tropicultura*, 26(1), 10-16.
- Bhalla, P. L. (2006). Genetic engineering of wheat—current challenges and opportunities. *Trends in biotechnology*, 24(7), 305-311.
- Blaha, G., Stelzl, U., Spahn, C. M., Agrawal, R. K., Frank, J., & Nierhaus, K. H. (1999). Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Methods in enzymology*, 317, 292-309.

Références bibliographiques

- Bosila, H. A., Mohamed, S., El-Gamal, S., & Bekhit, M. (2001, July). Factors Affecting Callus Production and Glycosidal Content of Leaf Tissue Culture of *Digitalis lanata* Ehrh. In *International Conference on Medicinal and Aromatic Plants (Part II)* 597 (pp. 289-301).
- Bouaouina, S., Zid, E., & Hajji, M. (2000). Tolérance à la salinité, transports ioniques et fluorescence chlorophyllienne chez le blé dur (*Triticum turgidum* L.). *Royo C., Nachit MM, Di Fonzo N. & Araus JL, eds. L'amélioration du blé dur dans la région méditerranéenne: nouveaux défis. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 239-243.*
- Bouiamrine, E., Diouri, M., & El-Halimi, R. (2012). Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity from mature and immature durum wheat embryos. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 2(9), 29-39.
- Braun, V., Buchner, O., & Neuner, G. (2002). Thermotolerance of photosystem 2 of three alpine plant species under field conditions. *Photosynthetica*, 40(4), 587-595.
- Brhadda, N., & Abousalim, A. (2007). Étude histologique de l'embryogenèse somatique de l'olivier *Olea europaea* cv. Picholine marocaine. *Fruits*, 62(02), 115-124.
- Brini, F., Hanin, M., Mezghani, I., Berkowitz, G. A., & Masmoudi, K. (2007). Overexpression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter TNH1 and H⁺-pyrophosphatase TVP1 improve salt-and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 301-308.
- Cavallini, A., Natali, L., Polizzi, E., & Giordani, T. (1996). Variation of repetitive DNA sequences in progenies of regenerated plants of *Pisum sativum*. *Journal of Heredity*, 87(3), 233-237.
- Chawla. (2002). *Introduction to plant biotechnology*. Science Publishers,inc. 383-386.
- Chennafi, H., Aïdaoui, A., Bouzerzour, H., & Saci, A. (2006). Yield response of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivar Waha to deficit irrigation under semi arid growth conditions. *Asian Journal of Plant Sciences*.
- Chetto, O., Dambier, D., Fadli, A., Benkirane, R., Talha, A., & Benyahia, H. (2015). Mise au point d'un test in vitro de comportement au sel de quatre géotypes d'agrumes. *Journal of Applied Biosciences*, 88(1), 8154-8166.
- Choi, Y. E., Kim, J. W., & Yoon, E. S. (1999). High Frequency of Plant Production via Somatic Embryogenesis from Callus or Cell Suspension Cultures in *Eleutherococcus senticosus*. *Annals of Botany*, 83(3), 309-314.

Références bibliographiques

- Choi, Y. E., Ko, S. K., Lee, K. S., & Yoon, E. S. (2002). Production of plantlets of *Eleutherococcus sessiliflorus* via somatic embryogenesis and successful transfer to soil. *Plant cell, tissue and organ culture*, 69(2), 201-204.
- Clabaut, A. (2009). Analyse génétique de l'embryogénèse somatique chez la chicorée (*Cichorium intybus* L.) Cartographie des QTL et des gènes candidats. Thèse de doctorat en Science et technologie. Spécialité : stratégies d'exportation des fonctions biologiques. Université Lille 1. France.
- Dağüstü, N. (2008). Comparison of Callus Formation and Plantlet Regeneration Capacity from Immature Embryo Culture of Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Genotypes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 22(3), 778-781.
- Dale, P. J., & Deambrogio, E. (1979). A comparison of callus induction and plant regeneration from different explants of *Hordeum vulgare*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 94(1), 65-77.
- Davenport, S. B., Gallego, S. M., Benavides, M. P., & Tomaro, M. L. (2003). Behaviour of antioxidant defense system in the adaptive response to salt stress in *Helianthus annuus* L. cells. *Plant Growth Regulation*, 40(1), 81-88.
- Debnath, B. (2013). In vitro response, growth and maintenance of callus of *Aquilaria agallocha* Roxb.(Thymelaeaceae). *Bioscience Discovery*, 4(2): 155-159.
- Debnath, S. C., Vyas, P., Goyali, J. C., & Igamberdiev, A. U. (2012). Morphological and molecular analyses in micropropagated berry plants acclimatized under ex vitro condition. *Canadian Journal of Plant Science*, 92(6), 1065-1073.
- Djermoun, A. (2009). La production céréalière en Algérie : Les principales caractéristiques. *Revue Nature et Technologie*. Pages : 45 à 53.
- Downton, W. J. S., Grant, W. J. R., & Robinson, S. P. (1985). Photosynthetic and stomatal responses of spinach leaves to salt stress. *Plant Physiology*, 78(1), 85-88.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from plant material. *Focus*, 12: 13-15.
- Dubois, T., Dubois, J., Guedira, M., Diop, A., & Vasseur, J. (1992). SEM characterization of an extracellular matrix around somatic proembryos in roots of *Cichorium*. *Annals of Botany*, 70(2), 119-124.
- Duncan, R. R. (1997). *Tissue culture-induced variation and crop improvement. Advances in agronomy (USA)*.

Références bibliographiques

- Durand, J. L. (2007). Les effets du déficit hydrique sur la plante: aspects physiologiques. *Acte de Journées de l'APFP*, 27-28.
- El Jaafari, S., Qariani, L., El Hadrami, I., Fagroud, M., & Paul, R. (2001). Intégration des outils biotechnologiques et agrophysiologiques: le blé, une plante modèle.
- Ergül, A., Marasali, B., & Ağaoğlu, Y. S. (2015). Molecular discrimination and identification of some Turkish grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) by RAPD markers. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 41(3), 159.
- Etienne, H., & Bertrand, B. (2003). Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. *Tree Physiology*, 23(6), 419-426.
- FAO. 2015. En dépit d'un réajustement des prévisions à la baisse, la production mondiale de céréales en 2015 devrait être presque suffisante pour couvrir l'utilisation, n'entraînant qu'une légère diminution des stocks existants, qui sont abondants. Bulletin de la FAO sur l'offre et la demande de céréales. <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/fr/>. (16/12/2015).
- Farshadfar, E., Elyasi, P., & Aghaee, M. (2012). In Vitro selection for drought tolerance in common wheat (*Triticum aestivum* L) genotypes by mature embryo culture. *Americ J Scien Res*, 48, 102-115.
- Fazelinasab, B., Omid, M., & Amiritokaldani, M. (2004). Effects of abscisic acid on callus induction and regeneration of different wheat cultivars to mature embryo culture. *News directions for a diverse planet: Proceedings of the 4th International Brisbane, Australia*, 26.
- Fehér, A. (2006). Why somatic plant cells start to form embryos?. In *Somatic embryogenesis* (pp. 85-101). Springer Berlin Heidelberg.
- Feher, A. (2008). The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. *Acta Biol Szeged*, 52(1), 53-56.
- Filipecki, M., Yin, Z., Wiśniewska, A., Śmiech, M., Malinowski, R., & Malepszy, S. (2006). Tissue-culture-responsive and autotetraploidy-responsive changes in metabolic profiles of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of applied genetics*, 47(1), 17-21.
- Filippov, M., Miroshnichenko, D., Vernikovskaya, D., & Dolgov, S. (2006). The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. *Plant cell, tissue and organ culture*, 84(2), 213-222.

Références bibliographiques

- Forooghian, S., & Esfarayeni, S. (2013). An Evaluation of Effect of Salt Stress on Callus Induction in Different Potato Cultivars. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 13 (8): 1135-1140, 2013
- Galović, V., Rausch, T., & Gršić-Rausch, S. (2010). Mature embryo-derived wheat transformation with major stress-modulated antioxidant target gene. *Archives of Biological Sciences*, 62(3), 539-546.
- Gatica-Arias, A. M., Arrieta-Espinoza, G., & Espinoza Esquivel, A. M. (2008). Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(1), 101-112.
- Ghars, M. A., Parre, E., Debez, A., Bordenave, M., Richard, L., Leport, L., ... & Abdelly, C. (2008). Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on K⁺/Na⁺ selectivity and proline accumulation. *Journal of plant physiology*, 165(6), 588-599.
- Gill, A. K., Gosal, S. S., & Sah, S. K. (2014). DIFFERENTIAL CULTURAL RESPONSES OF WHEAT (*Triticum aestivum* L.) WITH DIFFERENT EXPLANTS. *Journal of Cell and Tissue Research Vol*, 14(2), 4351-4356.
- Gupta, B., & Huang, B. (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International journal of genomics*, 2014.
- Gutiérrez-Mora, A., González-Gutiérrez, A. G., Ascencio-Cabral, A., Rodríguez-Garay, B., & Li-Wei, L. (2012). *Plant somatic embryogenesis: some useful considerations*. INTECH Open Access Publisher.
- Hakam, N., Udupa, S. M., Gaboun, F., Rabha, A., Ibriz, M., & Iraqi, D. (2014). EFFECT OF GENOTYPES AND CULTURE MEDIA ON EMBRYOGENIC CALLUS INDUCTION AND PLANTLET REGENERATION FROM MATURE EMBRYOS OF DURUM WHEAT. *Romanian Agricultural Research*, 31, 121-128.
- Halperin, W. (1967). Population density effects on embryogenesis in carrot-cell cultures. *Experimental cell research*, 48(1), 170-173.
- Hamama L. (2002). éléments du déterminisme de l'orientation des cellules du sporophyte vers la voie de l'embryogenèse somatique chez le jojoba (*Simonsia chinensis*(L.). Physiologie et contrôle moléculaire de la régénération. Thèse doctorat. Université Cadi Ayyad. Faculté des Sciences- Semlalia Marrakech. 262p.

Références bibliographiques

- Hanchinal, R. R., Salimath, P. M., & Tandon, J. P. (1994). variation and adaptation of wheat varieties for heat tolerance in Peninsular India. In *Proc. Int. Conf. Wheat in Hot, Dry and Irrigated Environs* (pp. 175-183).
- Hanus-Fajerska, E., & Ciarkowska, K. (2012). The effect of *Nicotiana tabacum* L. extracts on cultures of tobacco callus. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, 11(4).
- Hassani, A., Seddiki, D., Kouadria, M., Bouchenafa, N., Negadi, M., & Labdaoui, D. Effet de la salinité sur le comportement physiologique et biochimique de l'Oléastre (Olivier spontané) et l'olivier cultivé (variété Sigoise).
- Havaux, M. (1992). Stress tolerance of photosystem II in vivo antagonistic effects of water, heat, and photoinhibition stresses. *Plant Physiology*, 100(1), 424-432.
- Hoisington, D., Bohorova N., Fennell S., Khairallah M., Pellegrineschi A., Ribaut J.M. (2002). "The application of biotechnology to wheat improvement". In "Bread Wheat: Improvement and Production", edited by B.C. Curtis, S. Rajaram, H. Gómez MacPherson, FAO Plant Production and Protection Series No. 30, Food And Agriculture Organization Of The United Nations, Rome.
- Houshmand, S., Arzani, A., Maibody, S. A. M., & Feizi, M. (2005). Evaluation of salt-tolerant genotypes of durum wheat derived from in vitro and field experiments. *Field Crops Research*, 91(2), 345-354.
- Htwe, N. N., Maziah, M., Ling, H. C., Zaman, F. Q., & Zain, A. M. (2013). Responses of some selected Malaysian rice genotypes to callus induction under in vitro salt stress. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), 350-362.
- Htwe, N. N., Maziah, M., Ling, H. C., Zaman, F. Q., & Zain, A. M. (2013). Responses of some selected Malaysian rice genotypes to callus induction under in vitro salt stress. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), 350-362.
- Huang, L., Brooks, S. A., Li, W., Fellers, J. P., Trick, H. N., & Gill, B. S. (2003). Map-based cloning of leaf rust resistance gene Lr21 from the large and polyploid genome of bread wheat. *Genetics*, 164(2), 655-664.
- Ibrahim, A. S. (2012). An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in some Egyptian durum wheat cultivars mediated high-throughput transformation of durum wheat using *Agrobacterium tumefaciens*. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 8(3), 369-384.

Références bibliographiques

- Jaboune.M. (2008). Adaptation des plantes aux stress salin : caractérisation de transporteurs de sodium et potassium de la famille HKT chez le riz. Thèse de doctorat en Biologie intégrative des plantes. Spécialité : systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydro science, Environnement. Laboratoire de Biochimie et physiologie moléculaire des plantes. UMR 5004, CNRS/INRA/Sup Agro/ Université Montpellier II. France.
- Jain, S. M. (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118(2), 153-166.
- Jaligot, E., Rival, A., Beule, T., Dussert, S., & Verdeil, J. L. (2000). Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. *Plant Cell Reports*, 19(7), 684-690.
- Janakiraman, V., Steinau, M., McCoy, S.B, Trick H.D. (2002). Recent advances in Wheat transformatio. *In vitro Cell.Dev.Biol-Plant*, 38:404-414.
- Jones, H. G., Stoll, M., Santos, T., De Sousa, C., Chaves, M. M., & Grant, O. M. (2002). Use of infrared thermography for monitoring stomatal closure in the field: application to grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 53(378), 2249-2260.
- Joshi, R., Shukla, A., & Kumar, P. (2013). In Vitro Water Deficit Stress Induced Genotypic Alterations In Protein Profile Among Aromatic Rice Varieties. *Annals of Plant Sciences*, 2(10), 455-458.
- Kaeppeler, S. M., Kaeppeler, H. F., & Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant molecular biology*, 43(2-3), 179-188.
- Kaeppeler, S., Phillips, R., & Olhoft, P. (1998). 23. Molecular Basis of Heritable Tissue Culture-induced Variation in Plants. *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*, 32, 465.
- Kameli, A., & Lösel, D. M. (1996). Growth and sugar accumulation in durum wheat plants under water stress. *New phytologist*, 132(1), 57-62.
- Karim, R., Chlyah, H., Douira, A., & Hsaine, M. (2011). Vitrovariation et régénération par embryogenèse somatique à partir d'embryons mûrs de blé tendre (*Triticum aestivum* L. var.'Nesma'149): effet du borate de sodium, de la fragmentation et du scutellum. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 15(4), 523-534.

Références bibliographiques

- Khadari, B., Lashermes, P., & Kjellberg, F. (1994). Identification variétale et ressources génétiques chez le figuier (*Ficus carica* L.): utilisation des marqueurs RAPD.
- Khaled, L. B., Ouarraqi, E. M., & Zid, E. (2007). Impact du NaCl sur la croissance et la nutrition de la variété de blé dur Massa cultivée en milieu hydroponique. *Acta Botanica Gallica*, 154(1), 101-116.
- Khoddamzadeh, A. A., Sinniah, U. R., Kadir, M. A., Kadzimin, S. B., Mahmood, M., & Sreeramanan, S. (2013). Detection of somaclonal variation by random amplified polymorphic DNA analysis during micropropagation of *Phalaenopsis bellina* (Rchb. f.) Christenson. *African Journal of Biotechnology*, 9(40), 6632-6639.
- Klein-Lankhorst, R. M., Vermunt, A., Weide, R., Liharska, T., & Zabel, P. (1991). Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theoretical and Applied Genetics*, 83(1), 108-114.
- Koutoua, A., Hmouni, D., ElYacoubi.H., Hassikou.R, Zidane.L., Rochdi.A. (2012). Sélection et évaluation *in vitro* de lignées de cals tolérants à la salinité chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.). *ScienceLib Editions Mersenne*, (4) : 2111-4706.
- Kronstad .W.E. (1998). “Agricultural development and wheat breeding in the 20th century. In: H-J Braun, F Altay, WE Kronstad, SPS Beniwal, A McNab, eds. “Wheat: Developments in Plant Breeding. Vol. 6. Prospects for Global Improvement”. Proceedings of the 5th International Wheat Conference, Ankara,Turkey, Dordrecht: Kluwer Academic, , pp 1– 10.
- Kumar, H. A., Murthy, H. N., & Paek, K. Y. (2002). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Gymnema sylvestre*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 71(1), 85-88.
- Kuo, C. L., Chang, J. Y., Chang, H. C., Gupta, S. K., Chan, H. S., Chen, E. C. F., & Tsay, H. S. (2011). In vitro production of benzylisoquinoline from *Stephania tetrandra* through callus culture under the influence of different additives. *Bot Studies*, 52, 285-294.
- L’Herbier. C. (2014). Le marché du blé dur. Comité technique blé dur Ouest Océan. *ARVALIS : Institut végétal*.
- Laverne.S et Olson.F. (2015). CANADA perspectives des principales grandes cultures. Groupe de l’analyse des marchés et oléagineux .direction du développement et de l’analyse du secteur, direction générale des services à l’industrie et aux marchés. Agriculture et Agri-food CANADA. Pages : 3-4.

Références bibliographiques

- Lebeau, Y. (2014). La consommation des produits issus du blé dur au Maghreb. 16^{ème} journée filière blé dur. Montpellier. Arvalis : Institut végétale.
- Lee, K. S., Zapata-Arias, F. J., Brunner, H., & Afza, R. (1997). Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51(1), 1-8.
- Leva A.R., Petruccelli R., Rinaldi LMR. (2012). Somaclonal Variation in Tissue Culture: A Case Study with Olive. *Recent Advances in Plant in vitro Culture* 10-17..
- Levy, A. A., & Feldman, M. (2002). The impact of polyploidy on grass genome evolution. *Plant physiology*, 130(4), 1587-1593.
- Li, W., Ding, C. H., Hu, Z., Lu, W., & Guo, G. Q. (2003). Relationship between tissue culture and agronomic traits of spring wheat. *Plant science*, 164(6), 1079-1085.
- Lima, M. A. C., Garcia, R. D. O., Martins, G. S., & Mansur, E. (2001). In vitro morphogenesis of Brazilian sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties and callus susceptibility to selective markers used in genetic transformation systems. *Brazilian Journal of Botany*, 24(1), 73-77.
- Linacero, R., Alves, E. F., & Vázquez, A. M. (2000). Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(3-4), 506-511.
- Ly, M., Kumar, D., Diouf, M., Nautiyal, S., & Diop, T. (2014). Effet de la salinité sur la croissance et la production de biomasse de deux provenances de *Jatropha curcas* L. cultivés en serre. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 8(1), 46-56.
- M'hamed, H. C., Abdellaoui, R., Kadri, K., Naceur, M. B., & Hadj, S. B. (2008). Evaluation De La Tolerance Au Stress Salin De Quelques Accessions d'orge (*Hordium Vulgare* L.) Cultivees En Tunisie: Approche Physiologique. *Sciences & Technologie C*, (28), 30-37.
- Mac Key, J. (2005). Wheat: its concept, evolution and taxonomy. *Durum wheat breeding. Current approaches and future strategies*, 1(part 1), 3-61.
- Madlung, A., & Comai, L. (2004). The effect of stress on genome regulation and structure. *Annals of botany*, 94(4), 481-495.
- Mahmood, T., Jameel, A., Abbasi, B. H., Munir, F., & Naqvi, S. M. S. (2012). In vitro callogenesis and detection of somaclonal variations in *Plantago ovata* L. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 15(4), 289-295.

Références bibliographiques

- Malik, S. I., Rashid, H., Yasmin, Tayyaba., & Minhas, N. M. (2004). Effect of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction from mature wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds. *Int. J. Agric. Biol*, 6(1), 156-159.
- Mantri, N., Patade, V., & Pang, E. (2014). Recent advances in rapid and sensitive screening for abiotic stress tolerance. In *Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes* (pp. 37-47). Springer New York.
- Marschner, H., Kirkby, E. A., & Cakmak, I. (1996). Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *Journal of experimental botany*, 47(Special Issue), 1255-1263.
- Martin, K. P. (2004). Plant regeneration protocol of medicinally important *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Wallich ex Nees via somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40(2), 204-209.
- Masmoudi, a., hemeir, a., & benaissa, m. (2014). Impacts de la concentration et du type de sel sur le potentiel germinatif et la production de biomasse chez l'orge (*hordeum vulgare*). *Courrier du Savoir*, 18.
- McClintock, B. (1984). *The significance of responses of the genome to challenge* (pp. 180-199). Singapore: World Scientific Pub. Co.
- McKnight, T. D., Riha, K., & Shippen, D. E. (2002). Telomeres, telomerase, and stability of the plant genome. *Plant molecular biology*, 48(4), 331-337.
- Mehmood, khalid., Arshad, Muhamma. D., Muhammad-Ali, G., & Razzaq, A. (2013). Tissue culture responses of some wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars grown in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 45, 545-549.
- Mendoza, M. G., & Kaeppler, H. F. (2002). Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38(1), 39-45.
- Mezni, M., Bizid, E., & Harnza, M. (1999). Effets de la salinité des eaux d'irrigation sur la survie et la croissance de trois cultivars de luzerne pérenne. *Fourrages(Versailles)*, (158), 169-178.
- Michel, M. K., John, B. M., & Jules, K. N. (2015). Effets de doses croissantes de NaCl sur le comportement du bananier et la morpho diversité de champignons du sol [Different NaCl levels impact on banana growth and morphological diversity of soil's fungi]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 10(4), 1150.

Références bibliographiques

- Mitić, N., Dodig, D., & Nikolić, R. (2006). Variability of in vitro culture response in wheat genotypes, genotype and environmental effects. *Genetika*, 38(3), 183-192.
- Mokhtari, M., Dorion, N., & Ramdani, K. (2014). Conditions de sélection in vitro de cals issus des disques foliaires et des protoplastes de *Pelargonium* tolérant plus la sécheresse. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 2(3).
- Morgan Mozas & Alexis Ghosn. (2013). État des lieux du secteur de l'eau en Algérie. Etudes et analyses. IEMD : Institut de prospective économique du monde méditerranéen.
- Munazir, M., Qureshi, R., Ali, G. M., Rashid, U., Noor, S., Mehmood, K., ... & Arshad, M. (2010). Primary callus induction, somatic embryogenesis and regeneration studies in selected elite wheat varieties from Pakistan. *Pak. J. Bot*, 42(6), 3957-3965.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment*, 25(2), 239-250.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-681.
- Mzouri, K., Amssa, M., & Bouiamrine, E. H. (2001). Embryogenese somatique a partir d'embryons immatures de ble tendre: effet genotypique. *African Crop Science Journal*, 9(2), 339-350.
- Narciso, J. O., & Hattori, K. (2010). Genotypic differences in morphology and ultrastructures of callus derived from selected rice varieties. *Phillipine Science Letters*, 3(1), 59-65.
- Nawaz, S., Ahmed, N., Iqbal, A., & Khaliq, I. (2013). Optimization of regeneration protocols for wheat under drought and salt stress. *Pak. J. Agri. Sci*, 50(4), 663-670.
- Ndiaye, A., Faya, E., & Touré, M. A. (2014). Effets du stress salin sur la germination des graines de *Gossypium hirsutum* L. *Journal of Applied Biosciences*, 80(1), 7081-7092.
- Nimisha, J. J. K., Anu, M. A., & Nambisan, P. (2012). Evaluation of somaclonal variation in callus cultures of *Jatropha curcas* maintained on different hormonal combinations using RAPD markers. *World Journal of Agricultural Sciences*, 8(6), 616-623.
- Nishi, T., Yamada, Y., & Takahashi, E. (1968). Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus.

Références bibliographiques

- Niu, X., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., & Pardo, J. M. (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant physiology*, 109(3), 735.
- Noor, S., Ali, G. M., Rashid, U., Arshad, M., Ali, S., & Zafar, Y. (2009). Optimization of callus induction and regeneration system for Pakistani wheat cultivars Kohsar and Khyber-87. *African Journal of Biotechnology*, 8(20).
- Oudija, F., Ismaili, M., & Amsa, M. (2002,b). Effet de la concentration en NaCl sur l'embryogenese somatique et sur les capacites de regenerationchez le ble. *African Crop Science Journal*. (10) : 3, 211-219.
- Parmar, S. S., Sainger, M., Chaudhary, D., & Jaiwal, P. K. (2012). Plant regeneration from mature embryo of commercial Indian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18(2), 177-183.
- Pathak, A., Dwivedi, M., Laddha, N. C., Begum, R., & Joshi, A. (2013). Detection of somaclonal variants using RAPD marker in *Bacopa monnieri* and *Tylophora indica*. *Journal of Agricultural Technology*, 9(5), 1253-1260.
- Patnaik, D., & Khurana, P. (2001). Wheat biotechnology: A minireview. *Electronic Journal of Biotechnology*, 4(2), 7-8.
- Patnaik, D., Vishnudasana, D., & Khurana, P. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of mature embryos of *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. *Current science*, 91(3), 307-317.
- Pérez-Clemente, R. M., & Gómez-Cadenas, A. (2012). *In vitro tissue culture, a tool for the study and breeding of plants subjected to abiotic stress conditions*. INTECH Open Access Publisher.
- Pernisová, M., Klíma, P., Horák, J., Válková, M., Malbeck, J., Souček, P., ... & Hejátko, J. (2009). Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3609-3614.
- Peschke, V. M., Phillips, R. L., & Gengenbach, B. G. (1987). Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture—derived maize plants. *Science*, 238(4828), 804-807.
- Phillips, R. L., Kaeppler, S. M., & Olhoft, P. (1994). Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5222-5226.

Références bibliographiques

- Pingali, P. L; Rajaram, S. (1999). “Global wheat research in a changing world:options for sustaining growth in wheat productivity”. CIMMYT world wheat facts and trends.: 1-18.
- Queiros, F., Fidalgo, F., Santos, I., & Salema, R. (2007). In vitro selection of salt tolerant cell lines in *Solanum tuberosum* L. *Biologia Plantarum*, 51(4), 728-734.
- Radwan, S. A. A. (2014). Molecular discrimination and genetic relationships between some cultivars of *Cucurbita pepo* ssp. *pepo* using random amplification of polymorphic DNA (RAPD) analysis. *African Journal of Biotechnology*, 13(11), 1202-1209.
- Rai, M. K., Kalia, R. K., Singh, R., Gangola, M. P., & Dhawan, A. K. (2011). Developing stress tolerant plants through in vitro selection—an overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany*, 71(1), 89-98.
- Rani, V., Singh, K. P., Shiran, B., Nandy, S., Goel, S., Devarumath, R. M., ... & Raina, S. N. (2000). Evidence for new nuclear and mitochondrial genome organizations among high-frequency somatic embryogenesis-derived plants of allotetraploid *Coffea arabica* L.(Rubiaceae). *Plant Cell Reports*, 19(10), 1013-1020.
- Rashid, U., Ali, S., Ali, G. M., Ayub, N., & Masood, M. S. (2009). Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in Pakistani wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(3), 4-5.
- Rawson, D. M., Willmer, A. J., & Turner, A. P. (1989). Whole-cell biosensors for environmental monitoring. *Biosensors*, 4(5), 299-311.
- Ray, M., Ghosh, S. and Ghosh, B. (1996). Plant Regeneration from Embryogenic Calli of Heat Tolerant and Sensitive Cultivars under Thermal Stress. *Physiology and Molecular Biology of Plant*, 2, 59-66.
- Razmjoo, M., Mohammadi, R., & Shooshtari, L.(2015). *In vitro* evaluation of durum wheat genotypes for drought tolerance. *Journal on New Biological Reports* 4(1): 33-40.
- Reiter, R. S., Williams, J. G., Feldmann, K. A., Rafalski, J. A., Tingey, S. V., & Scolnik, P. A. (1992). Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(4), 1477-1481.
- Rejeb, M. N., Laffray, D., & Louguet, P. (1991). Modification de la conductance stomatique de diverses origines tunisiennes de caroubier (*Ceratonia Siliqua* L.)

Références bibliographiques

soumises à une contrainte hydrique. L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides. Paris; Montrouge: Aupelf-Uref. *L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides*, 149.

- Rengasamy, P. (2010). Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. *Functional Plant Biology*, 37(7), 613-620.
- Rival, A., Bertrand, L., Beule, T., Combes, M. C., Trouslot, P., & Lashermes, P. (1998). Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *PLANT BREEDING-JOURNAL*-, 117, 73-76.
- Rochdi, A., El Yacoubi, H., & Rachidai, A. (2003). Comportement vis-à-vis de la salinité de calcs de porte-greffes d'agrumes *Citrus aurantium*, Citrange troyer et *Poncirus trifoliata*: évaluation de critères certifiant la réponse des agrumes au stress salin. *Agronomie*, 23(7), 643-649.
- Rubio, F., Gassmann, W., & Schroeder, J. I. (1995). Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science*, 270(5242), 1660-1663.
- Sahijram, L., Soneji, J. R., & Bollamma, K. T. (2003). Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39(6), 551-556.
- Salama, S., Trivedi, S., Busheva, M., Arafa, A. A., Garab, G., & Erdei, L. (1994). Effects of NaCl salinity on growth, cation accumulation, chloroplast structure and function in wheat cultivars differing in salt tolerance. *Journal of plant physiology*, 144(2), 241-247.
- Salgotra, R. K., Gupta, B. B., & Sood, M. (2015). Biotechnological Interventions and their Role in Sustainable Hill Agriculture.
- Salvucci, M. E., & Crafts-Brandner, S. J. (2004). Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 120(2), 179-186.
- Šamaj, J., Bobák, M., Blehová, A., & Pret'ová, A. (2006). Importance of cytoskeleton and cell wall in somatic embryogenesis. In *Somatic embryogenesis* (pp. 35-50). Springer Berlin Heidelberg.
- Satger.O. (2015). Céréales et oléagineux les cours se redressent en fin de l'année Agreste Synthèses : Grandes cultures : 2015/257.

Références bibliographiques

- Satish, L., Rathinapriya, P., Ceasar, S. A., Rency, A. S., Pandian, S., Rameshkumar, R., ... & Ramesh, M. (2015). Effects of cefotaxime, amino acids and carbon source on somatic embryogenesis and plant regeneration in four Indian genotypes of foxtail millet (*Setaria italica* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1-14.
- Sauvage.H. (2015). Le marché mondial a besoin de blé dur. Cultivar magazine. <http://www.cultivar.fr/marches/le-marche-mondial-besoin-de-ble-dur>. (28/12/2015).
- Shafi, M., AND, F. U., & Akmal, M. (2010). Effect of cultivars and culture medium on callus formation and plant regeneration from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pak. J. Bot*, 42(1), 639-652.
- Shah, M. M., Khalid, Q., Khan, U. W., Shah, S. A. H., Shah, S. H., Hassan, A., ... & Azevedo, V. (2009). Variation in genotypic responses and biochemical analysis of callus induction in cultivated wheat. *Genet. Mol. Res*, 8(3), 783-793.
- Shannon, M. C. (1997). Adaptation of plants to salinity. *Advances in agronomy*, 60(1).
- Shannon, M. C., & Grieve, C. M. (1998). Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia horticulturae*, 78(1), 5-38.
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Jaleel, C. A., & Zhao, C. X. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes rendus biologiques*, 331(3), 215-225.
- Sharp, W. R., Sondahl, M. R., Caldas, L. S., & Maraffa, S. B. (1980). The physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Horticultural Reviews, Volume 2*, 268-310.
- Sheeba, M. S., Hamza, K. M., Radhika, N. K., & Asha, V. V. (2014). Molecular diversities among *Cardiospermum halicacabum* Linn. populations in Kerala assessed using RAPD markers.
- Shepherd, T., & Wynne Griffiths, D. (2006). The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, 171(3), 469-499.
- Shukla, R., Dube, A., & Koshy, E. P. (2014). Production of high quality embryogenic callus of rice. *An International Quarterly J. Life Sciences*, 9(3), 1077-1080.
- Sibi, M. L., & Fakiri, M. (2000). Androgenèse et gynogenèse, sources de vitroviation et de tolérance à la salinité chez l'orge *Hordeum vulgare*?. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 11(2), 125-32.
- Sidorov, V. A. (2013). Plant tissue culture in biotechnology: recent advances in transformation through somatic embryogenesis. *Biotechnologia Acta*, 6(4).

Références bibliographiques

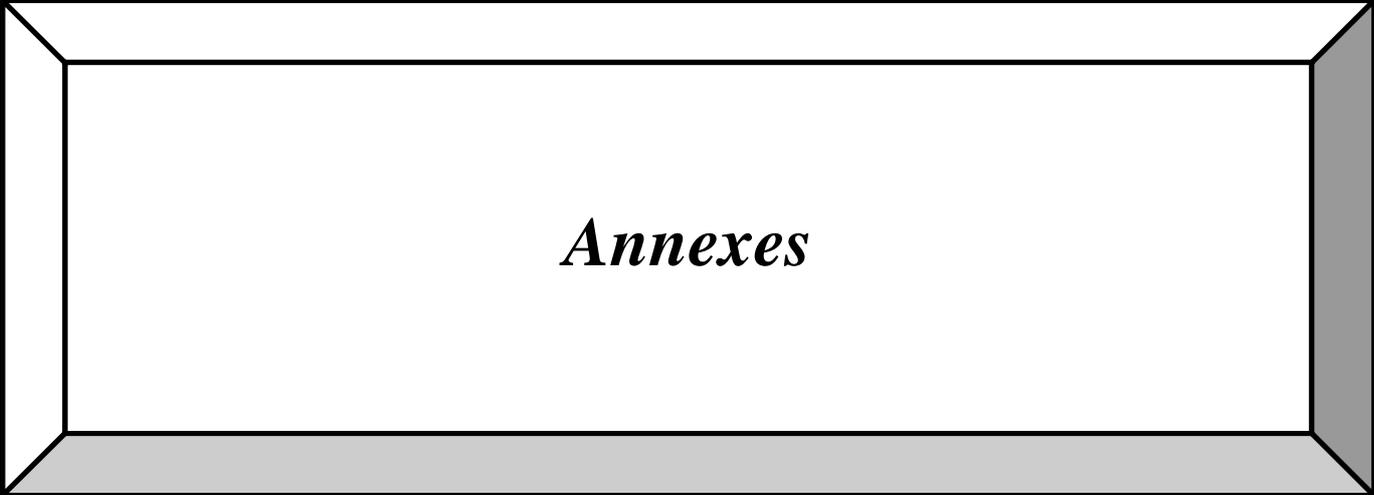
- Singh, S. R., Dalal, S., Singh, R., Dhawan, A. K., & Kalia, R. K. (2013). Ascertaining clonal fidelity of micropropagated plants of *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro using molecular markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(5), 572-583.
- Solís-Marroquín, D., Lecona-Guzmán, C. A., Canto-Flick, A., Bello-Bello, J. J., Santana-Buzzy, N., & Iglesias-Andreu, L. (2011). In vitro selection of a salt-tolerant embryogenic line in Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience*, 46(12), 1666-1671.
- Son, D., Compaoré, E., Bonkoungou, S., & Sangaré, S. (2011). Effet du stress hydrique sur la croissance et la production du sésame (*Sesamum indicum*). *Appl. Biosci*, 37, 2460-2467.
- Sorina, P., Maria, B. O., Lazăr, A., & Ursu, C. (2013). The assessment of the variability induced by tissue culture to *Cymbidium* sp. using RAPD markers. *JOURNAL of Horticulture, Forestry and Biotechnology*. 17(2), 273- 276.
- Tam, D. M., & Lang, N. T. (2003). In vitro selection for salt tolerance in rice. *OmonRice*, 11, 68-73.
- Tamás, C., Szűcs, P., Rakszegi, M., Tamás, L., & Bedő, Z. (2004). Effect of combined changes in culture medium and incubation conditions on the regeneration from immature embryos of elite varieties of winter wheat. *Plant cell, tissue and organ culture*, 79(1), 39-44.
- Tanji, K. K., & Wallender, W. W. (1990). Nature and extent of agricultural salinity and sodicity. In *Agricultural salinity assessment and management* (pp. 1-25). ASCE.
- Tardieu, F. (2005). Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress. *Comptes Rendus Geoscience*, 337(1), 57-67.
- Tchorbadjieva, M. I. (2006). Protein markers for somatic embryogenesis. In *Somatic Embryogenesis* (pp. 215-233). Springer Berlin Heidelberg.
- Tingey, S. V., & del Tufo, J. P. (1993). Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiology*, 101(2), 349.
- Vendruscolo, E. C. G., Schuster, I., Negra, E. S., & Scapim, C. A. (2008). Callus induction and plant regeneration by Brazilian new elite wheat genotypes. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 8(3), 195-201.
- Verdeil, J. L., Dussert, S., Grosdemange, F., & Huet, C. (1994). [Multiplication végétative du cocotier par embryogenese somatique]. *Reperes (France)*.

Références bibliographiques

- von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 233-249.
- Walker, D. J., Leigh, R. A., & Miller, A. J. (1996). Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(19), 10510-10514.
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.
- Wann, S. R. (1988). Somatic embryogenesis in woody species. *Horticultural Reviews*, Volume 10, 153-181.
- Wardlaw, I. F., & Willenbrink, J. (1994). Carbohydrate storage and mobilisation by the culm of wheat between heading and grain maturity: the relation to sucrose synthase and sucrose-phosphate synthase. *Functional Plant Biology*, 21(3), 255-271.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.
- WILLIAMS, J., HANAFEY, M., ANTONI RAFALSKI, J., & TINGEY, S. (1993). Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in enzymology*, 218(1), 704-740.
- Yacoubi, H. E. I., & Rochdi, A. (2009, August). Improvement of Cellular Salt Tolerance of 'Troyer' Citrange In Vitro. In *I All Africa Horticultural Congress 911* (pp. 337-348).
- Yasmin, S., Khan, I. A., Khatri, A., Seema, N., Nizamani, G. S., & Arain, M. A. (2009). In vitro plant regeneration in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pak. J. Bot*, 41(6), 2869-2876.
- Yulianti, S. I., Wijayanto, N., Darma, I. G. K. T., & Syamsuwida, D. (2011). Genetic variation of *Melia azedarach* in community forests of West Java assessed by RAPD. *J Biodiversitas*, 12(2), 64-69.
- Zheng, J., Fu, J., Gou, M., Huai, J., Liu, Y., Jian, M., ... & Wang, G. (2010). Genome-wide transcriptome analysis of two maize inbred lines under drought stress. *Plant molecular biology*, 72(4-5), 407-421.
- Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in plant science*, 6(2), 66-71.

Références bibliographiques

- Zhu, J. K., Liu, J., & Xiong, L. (1998). Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for a critical role of potassium nutrition. *The Plant Cell*, 10(7), 1181-1191.
- Zid, E., & Grignon, C. (1991). Les tests de sélection précoce pour la résistance des plantes aux stress. Cas des stress salin et hydrique. In 2. *Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Vegetales. Tunis (Tunisie). 4-9 Dec 1989*.
- Zimmerman, J.L (1993). Somatic embryogenesis : A model for Early development in higher plants. *Plant cell*, 5: 1411-1423.



Annexes

Annexes

Annexe. 1 : Composition du milieu MS.

	Concentration finale (mg par litre)	Volume à ajouter (ml par litre)
Macroéléments		
NH ₄ NO ₃	1650	
KNO ₃	1900	50
CaCl ₂	440	
MgSO ₄	370	
KH ₂ PO ₄	170	
Microéléments		
H ₃ BO ₃	6.2	
MnSO ₄ -H ₂ O	22.3	10
ZnSO ₄ -7H ₂ O	8.6	
CoCl ₂ -6H ₂ O	0.025	
CuSO ₄ -5H ₂ O	0.025	
Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	0.25	
KI	0.83	
Vitamines		
Acide nicotinique	0.5	
Pyridoxine HCl	0.5	10
Thiamine HCl	0.1	
Glycine	2.0	
Myo-inositol	100	
Fer		
Na ₂ EDTA	37.3	10
Fe SO ₄ -7H ₂ O	27.8	
Gélifiant		
Agar		10 000 mg
Sucres		
Saccharose		30 000 mg

Annexes

Annexe. 2 : Modélisation de la variable Taux d'induction :

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	6	4704,830	784,138	8,050	0,002
Résidus	11	1071,528	97,412		
Total	17	5776,358			

Annexes. 3 : Modélisation de la variable Taille des cals

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	5	11,041	2,208	2,698	0,074
Résidus	12	9,821	0,818		
Total	17	20,862			

Annexe.4 : Modélisation de la variable Poids des cals

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	5	1,032	0,206	5,433	0,008
Résidus	12	0,456	0,038		
Total	17	1,488			

Annexe. 5 : Modélisation de la variable taux de cals embryogène :

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	5	4499,225	899,845	18,361	< 0,0001
Résidus	12	588,109	49,009		
Total	17	5087,334			

Annexes

Annexe. 6 : Modélisation de la variable taux régénération :

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	5	2420,228	484,046	32,507	< 0,0001
Résidus	12	178,687	14,891		
Total	17	2598,914			

Annexe. 7 : modélisation de la variable nombre de plantes régénérées par cal.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	5	12,444	2,489	4,978	0,011
Résidus	12	6,000	0,500		
Total	17	18,444			

Annexe .8 : Carrées moyens de l'analyse de variance du taux de croissance (TC), Teneur en eau (WC), teneur en Na⁺ et Teneur en K⁺ des six variétés de blé dur en présence et absence de stress salin.

Paramètres				
Facteur	Taux de croissance	Teneur en eau	Teneur en Na ⁺	Teneur en K ⁺
Variété	1.097***	21.86 ^{ns}	56.634***	73,921***
Traitement	4.568***	640.868***	3951.255***	79,465***
Interaction (TxG)	1.702**	2.612*	35.354**	2,665*

ns : Effet non significatif, *effet significatif p<0.05, **effet significatif p<0.01, ***effet significatif p<0.001.

Annexe.9 : Carrées moyens de l'analyse de variance du taux d'induction de cal, taux d'induction de cals embryogènes, taux de régénération, nombre de plantes régénérées par cal chez les six variétés de blé dur en absence et présence de stress salin.

Paramètres				
Facteur	Taux d'induction de cals	Taux d'induction de cals embryogène	Taux de régénération	Nombre de plantes régénérées par cal
Variété	1810.506***	639.358***	172.018***	1.804**
Traitement	6079.932***	3236.222***	222.345***	2.350*
Interaction (TxG)	247.166***	1647.891***	216.821***	1.301*

Annexes

ns : Effet non significatif, *effet significatif $p < 0.05$, **effet significatif $p < 0.01$, ***effet significatif $p < 0.001$

Annexe. 10 : Méthode d'extraction d'ADN génomique :

- ✓ Préchauffer le tampon **CTAB 2x additionné de Beta-mercaptoéthanol** dans un bain marie à 65°C.
- ✓ Broyer le matériel végétal (environ 150mg) dans un mortier avec d'azote liquide.
- ✓ Transférer le broyat dans un tube à vis.
- ✓ Ajouter **900µl** de Tampon **CTAB 2x additionné de Beta-mercaptoéthanol** préchauffé à 65°C.
- ✓ Homogénéiser au vortex.
- ✓ Incuber 60min dans un bain marie à 65°C avec agitation.
- ✓ Centrifuger 15min à 10000 rpm à 4°C.
- ✓ Récupérer le surnageant (~800µl) dans un nouveau tube d'ependorf de 2 ml (stocker le culot à 4°C à l'abri de la lumière).
- ✓ Ajouter 800µl (1vol) **Chloroforme/Alcool isoamylique (24:1)**
- ✓ Agiter pendant 45min à vitesse lente (100 à 150rpm) sur une table.
- ✓ Centrifuger 15min à 10000 rpm à 4°C.
- ✓ Récupérer la phase aqueuse supérieure à l'aide de micropipette P1000 et la mettre dans un nouveau tube d'ependorf. (éviter de prendre la couche blanche au milieu)
- ✓ Ajouter 3 à 5µl de **RNase A** (10mg/ml), agiter par inversion et incuber 30min à 37°C.
- ✓ Ajouter 540µl (2/3Vol) d'**Isopropanol froid** (-20°C)
- ✓ Inverser les tubes doucement jusqu'à l'apparition d'une pelote blanche.
- ✓ Laisser précipiter à -20°C pendant 5 à 10 min.
- ✓ Centrifuger 10min à 10000 rpm à 4°C.
- ✓ Eliminer le surnageant très délicatement.
- ✓ Ajouter 500µL de **solution de lavage 1**.
- ✓ Incuber pendant 15min à température ambiante.
- ✓ Centrifuger 5min à 10000 rpm à 4°C.
- ✓ Eliminer le surnageant et ajouter 500µL de **solution de lavage 2**.
- ✓ Ne pas incuber plus de 5 min.
- ✓ Centrifuger 5min à 10000 rpm à 4°C.
- ✓ Eliminer le surnageant et sécher l'ADN à l'air libre pendant 10 à 20 min.

Annexes

- ✓ Suspendre le culot d'ADN dans 100 µl de **TE 0.1X**
- ✓ Stocker l'ADN pendant une nuit à 4°C avant dosage.

Annexe. 11 : Préparation des solutions :

a) **Tampon CTAB 2X (pH 8)**

	Concentration finale	PM (g/mol)	1 litre	200ml	100ml
CTAB	2% (P/V)	364,45	20g	4g	2g
Tris de base	100mM	121,14	12,11 g	2.42g	1.21g
Na2EDTA	20mM	372,24	7,44 g	1.49g	0.75g
NaCl	1.4M	58,44	81.8g	16.36g	8.18g
PVP 40	1% (P/V)		10 g	2g	1g
H2O up			Qsp 1litre	Qsp 200ml	Qsp 100ml

b) **Chloroforme / Alcool isoamylique (24:1)**

Pour 25ml : Ajouter 24ml Chloroforme + 1ml Alcool isoamylique

Pour 100ml : Ajouter 96ml Chloroforme + 4ml Alcool isoamylique

c) **Solution Lavage 1**

	Concentration finale	PM (g/mol)	1 litre	100ml	50ml
Acétate de Sodium	200 mM	82.03	16.46g	1.6g	0.8g
H2O distillée			240ml	24ml	12ml
Dissoudre l'acétate de sodium avant d'ajouter l'éthanol					
Ethanol 100 %	76%		760ml	76ml	38ml

d) **Solution Lavage 2**

	Concentration finale	PM (g/mol)	1 litre	100ml	50ml
Acétate d'ammonium	10 mM	77.08	0.8g	0.08g	0.04g
H2O distillée			240ml	24ml	12ml
Dissoudre l'acétate de sodium avant d'ajouter l'éthanol					
Ethanol 100 %	76%		760ml	76ml	38ml

Annexes

e) TE 1X (pH 8)

	Concentration finale	PM (g/mol)	1 litre	500ml	100ml
Tris de base	10 mM	121.14	1.21g	0.6g	0.12g
Na₂EDTA	1mM	372.24	0.38g	0.19g	0.04g
H₂O up			Qsp 1litre	Qsp 500ml	Qsp 100ml

f) TE 0.1X (pH 8)

	Concentration finale	1 litre	500ml	100ml
TE 1X	0.1X	100ml	50ml	10ml
H₂O up		Qsp 1litre	Qsp 500ml	Qsp 100ml