

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université des Frères Mentouri Constantine



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

N° d'ordre: 66/D5/2017  
N° de Série: 07/Eco/2017

## Thèse Présentée en Vue de l'Obtention de Diplôme de Doctorat en Sciences

Option : Biotechnologie Végétale

### Thème

**Sélection *in vitro* pour la tolérance au stress hydrique  
chez le blé dur (*Triticum durum* Desf):  
approche protéomique, transcriptomique  
et génétique.**

Présentée par

**KACEM Nadia Sandra**

Soutenu le

Devant le jury

Président	Pr. YKHLEF Nadia	Université des Frères Mentouri Constantine
Directeur de thèse	Pr. DJEKOUN Abdelhamid	Université des Frères Mentouri Constantine
Co-directeur de thèse	Dr. MUHOVSKI Yordan	Centre Wallon de Recherche Agronomique Gembloux
Examinateur	Pr. KHELIFI Douadi	Université des Frères Mentouri Constantine
Examinateur	MCA. BENDERRADJI Laid	Université Mohamed Boudiaf M'Sila
Examinateur	MCA. GAOUAR S.B Suheil	Université Abou Bekr Bêlkaid Tlemcen

*Année universitaire 2016-2017*

# *Remerciements*

Louanges à Dieu le tout puissant et le miséricordieux qui a guidé mes pas vers cette issue.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Centre wallon de Recherches Agronomiques de Gembloux- Belgique (CRA-W). Au terme de ce travail, je remercie mon co-encadreur de thèse, Dr. WATILLON Bernard chef de département Science du Vivant, pour son accueil au sein de son laboratoire, pour ses conseils professionnels et encouragements qui m'ont permis d'avancer et pour avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la bonne réalisation de ce travail.

J'adresse mes vives gratitudee et respects à mon directeur de thèse Pr. DJEKOUN Abdelhamid, pour la confiance qu'il ma toujours témoigné, ses encouragements continus, ses conseils utiles et pour ses appréciations sur ce travail.

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance au Dr. MUHOVSKI Yordan pour son co-encadrement, sa grande disponibilité et ses qualités scientifiques qu'il a su partager avec joie et bonne humeur, merci d'avoir été à mes côtés aux moments les plus durs ainsi qu'aux plus beaux. Je te serai reconnaissante toute ma vie.

J'adresse mes vifs remerciements à tous les autres membres du jury, notamment Pr. YKHLEF Nadia qui me fait l'honneur de présider ce jury. Merci au Pr. KHELIFI Douadi, Dr. GAOUR Souheil et Dr. BENDERADJI Laid, examinateurs de cette thèse. Qu'ils soient ici remerciés pour avoir accepté d'évaluer ce travail et de me faire l'honneur de faire partie de ce jury.

Un immense merci au Dr. MAURO Sergio qui a su me faire bénéficier de son expérience et pour m'avoir initié à la protéomique. Je le remercie pour ses précieux conseils, son humour et toutes les discussions constructives partagées. Je tiens à l'assurer de ma profonde gratitude.

Je remercie Dr. DELPORTE Fabienne pour son aide très précieuse, pour toutes les discussions scientifiques que nous avons partagées, et pour tout le temps qu'elle m'a consacré. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

J'aimerais également remercier Dr. RENAUT Jenny, de l'institut des sciences et technologie du Luxembourg, pour l'identification des protéines et pour sa sympathie. Merci également à Dr. MINGEOT Dominique pour m'avoir fourni les amorces SSR qui ont servi dans cette étude.

J'adresse un chaleureux remerciement à Mr. ABID Ghassen, Docteur au centre de Biotechnologie de Borj Cedria, pour son aide, son savoir et surtout pour son soutien moral.

Merci à l'ensemble des membres du Centre de Recherche Agronomique de Gembloux (CRA-W), ainsi qu'à tous ceux que j'ai eu la chance de connaître lors de mon séjour en Belgique; Elen, Jean-Pierre, Philippe, Cathy, Carine, Viviane, Ameny, Rajae, Abdallah, Abdeghani, Hanene, Chahra,... merci pour tous les merveilleux moments partagés.

Mes vifs remerciements sont adressés à toute l'équipe du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales (LGBBV) ainsi qu'à tous mes amis et collègues de l'Université Mentouri Constantine.

Enfin, un hommage particulier est à rendre à mes parents et à mon cher fils Amine d'avoir été patients, de m'avoir encouragée et soutenue lors des moments difficiles et surtout d'avoir cru en moi.

# *Dédicace*

A mes parents

A mon fils Amine

A mes frères et sœur

A toute ma famille

A tous ceux qui me sont chers

## Sélection *in vitro* pour la tolérance au stress hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf): approche protéomique, transcriptomique et génétique.

### RESUME

L'évaluation de l'aptitude de trois génotypes de blé dur (Djenah Khetifa, Oued Zenati et Waha) à la tolérance au stress hydrique simulé *in vitro* par différentes concentrations de PEG 6000 a indiqué des différences significatives entre les génotypes, les niveaux de stress PEG et leurs interactions pour tous les caractères étudiés, indiquant une variabilité génétique en réponse au stress hydrique. Les concentrations de PEG entravent négativement tous les paramètres étudiés. En revanche, la survie de quelques lignées cellulaires après un stress osmotique élevé démontre la sélection de cals tolérants au stress hydrique. Le criblage *in vitro* pour la tolérance au stress isole la variété Djenah Khetifa comme la plus tolérante et Waha comme la plus sensible. Les paramètres étudiés peuvent constituer des critères de sélection appropriés pour le criblage de génotypes tolérants à la sécheresse. Trois locus (*gwm331*, *gwm335* et *gwm427*) amplifiables et reproductibles ont été retenus. Ces loci ont fourni au total 78 loci monomorphes dont 69 ont été détectés chez les somaclones. Cinq variants somaclonaux ont été obtenus (DKR<sub>1</sub>-S1, DKR<sub>1</sub>-S2, OZR<sub>1</sub>-S2, WR<sub>1</sub>-C3 et WR<sub>1</sub>-S1) avec deux marqueurs SSR seulement. Le taux de variation génétique s'élève à 21.74%. La présence de la forte pression osmotique dans le milieu de culture peut être à l'origine de ces variations génétiques. Les marqueurs étudiés pourraient servir pour l'étude de l'uniformité de plantules issues de culture de tissus et l'identification des variétés chez le blé dur. La variation somaclonale ne peut pas toujours être détectée au niveau morphologique. L'analyse des protéines par une nouvelle approche nommée électrophorèse diagonale bidimensionnelle (D-2DE) puis par spectrométrie de masse MALDI-TOF a permis d'identifier six protéines différenciellement exprimées. Parmi les protéines candidates identifiées nous avons déterminé le niveau d'expression des ARNm de trois gènes (globuline, GAPDH et peroxidase) et d'un gène ubiquitaire (actine) par qRT-PCR pour chaque variété. Les quantités d'ARNm des trois gènes étaient partiellement corrélées aux quantités de protéines identifiées. L'analyse par immunoblot a confirmé l'accumulation différentielle des protéines (globuline et GAPDH) en réponse au stress hydrique. Les protéines identifiées grâce à cette technique mettent en évidence des composantes originales de la réponse de cals au stress osmotique. Notre méthode d'étude fournit une approche originale et pertinente permettant de contribuer de manière significative à une meilleure compréhension des liens possibles pouvant exister entre l'abondance de protéines spécifiques et l'acclimatation du blé dur au stress hydrique à l'échelle cellulaire.

**Mots clés :** Blé dur, électrophorèse diagonale bidimensionnelle, marqueur moléculaire, PEG 6000, sélection *in vitro*, stress hydrique, variation somaclonale, qRT-PCR, Western blot.

## الانتخاب المخبري لتحمل الإجهاد المائي عند القمح الصلب (*Triticum durum* Desf) تحت رؤية بروتيومية ترنسكريبتيومية و جينية.

### ملخص

التقييم المخبري لثلاثة أصناف القمح الصلب (Waha ، Oued Zenati ،Djenah Khetifa) على تحمل الإجهاد المائي تحت تركيزات مختلفة من البولي ايثيلين غليكول 6000PEG (0%,10%,20%) يشير إلى فروق ذات دلالة إحصائية بين الأصناف ، تركيزات الإجهاد المائي وتفاعلاتها مع جميع المقاييس المدروسة، مما يشير إلى التباين الوراثي في إجهاد الجفاف. الضغط الاسموزي أثر سلبا على جميع القياسات المدروسة. تعتبر الخلايا التي لا تزال تنمو الخلايا تحت الضغط الاسموزي العالي متحملة للإجهاد المائي. بين الانتخاب المخبري لتحمل الإجهاد المائي أن الصنف Khetifa Djenah هو الأكثر تحملا للإجهاد المائي ، أما الصنف Waha حساس للإجهاد المائي . الصنف المنتج للكالوس في مدة قصيرة يدل على قدرة كبيرة في تحمل الإجهاد المائي. تم انتقاء ثلاثة واسمات ( *gwm131* ، *gwm135* و *gwm427*) قابلة للتضخيم والتكرار. حصلت هذه الواسمات على 78 أليل أحادي التكوين من ضمنها 69 أليل تم الكشف عنها في النباتات النامية من خلايا جسمية . بلغ التنوع الوراثي نسبة % 71. تم التعرف على خمسة نباتات بها تغيرات الوراثة الجسمية (*DKR<sub>1</sub>-S1* ، *DKR<sub>1</sub>-S2*، *OZR<sub>1</sub>-S2*، *WR<sub>1</sub>-C3*، *WR<sub>1</sub>-S1*) مع اثنين فقط من الواسمات الجزئية *SSR*. من المحتمل تكون نسبة الضغط الاسموزي العالية المتواجدة في الوسط الزراعي سببا في تواجد هذه التنوعات الوراثة. يمكن استعمال الواسمات الجزئية لتحديد الأصناف و دراسة التغيرات الوراثة الجسمية عند نباتات القمح الصلب . لا يمكن الاعتماد كليا على المستوى المورفولوجي للكشف عن التغيرات الوراثة الجسمية. حدد تحليل البروتينات باستعمال تقنية جديدة (D-2DE) ومن خلال استخدام تقنية مطياف الكتلة على ستة أنواع من البروتينات ذات تعبيرية متغيرة. قمنا بدراسة التعبير عن المورثات لكل من المورثات المرشحة (*GAPDH*، *globulin*، *peroxidase*) كما تم تحديد مورث الأوبكوتين (*Actine*) عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي في الوقت الحقيقي *qRT-PCR*. تبين أن كمية *ARNm* للجينات الثلاثة مرتبطة جزئيا بكميات البروتينات التي تم تحديدها. تم التحقق من نتائج ال D-2DE عن طريق التشرب البقي بطريقة ويسترن مع استخدام الأجسام المضادة الخاصة بمضاد الجلوبيولين و مضاد ال *GAPDH*. البروتينات المتعرف عليها من خلال تقنية ال D-2DE قدمت معلومات جديدة لكيفية استجابة الكالوس إلى الضغط الاسموزي. تعتبر التقنية المستعملة في هذه الدراسة كوسيلة جديدة وفعالة مساهمة بشكل كبير في فهم الروابط المحتملة بين وفرة البروتينات المرشحة وتأقلم القمح الصلب مع الإجهاد المائي على المستوى الخلوي.

**الكلمات المفتاحية :** القمح الصلب، الاجهاد المائي، PEG 6000، الانتخاب المخبري، التغيرات الوراثة الجسيمي ، واسم جزئي، الرحل الكهربائي القطري الثنائي البعد، *qRT-PCR* ، التشرب البقي.

# ***In vitro* selection for tolerance to water stress in durum wheat (*Triticum durum* Desf): proteomics, transcriptomics and genomics approaches.**

## **SUMMARY**

The *in vitro* evaluation of three durum wheat genotypes (Djenah Khetifa, Oued Zenati and Waha) to water stress tolerance simulated *in vitro* by different concentrations of PEG 6000 indicated significant differences among genotypes, PEG concentrations and their interactions for all the studied characters, indicating genetic variability in PEG-simulated drought stress. The osmotic pressure has negatively affected all parameters studied. However, cells that continue to grow under severe osmotic stress are considered as tolerant to water stress. *In vitro* screening for stress tolerance reveals the variety Djenah Khetifa as the most tolerant and Waha as sensitive. The studied traits can be recommended as suitable selection criteria for screening drought-tolerant genotypes. Three amplified and reproducible locus (*gwm331*, *gwm335* and *gwm427*) were retained. These loci provided in total 78 monomorphic loci of which 69 were detected in somaclones. Five somaclonal variants (DKR<sub>1</sub>-S1, DKR<sub>1</sub>-S2, OZR<sub>1</sub>-S2, WR<sub>1</sub>-C3 and WR<sub>1</sub>-S1) were identified by only two SSR markers. Genetic variation rate was 21.74%. The presence of selective agent in the medium could explain the observed genetic variations. Somaclonal variation cannot always be detected at the gross morphological level. The selected SSR markers could be used to study the uniformity of plants obtained from tissue culture and varietal identification. Analysis of the proteins by a new two-dimensional diagonal electrophoresis approach named (D-2DE) followed by MALDI-TOF mass spectrometry has identified six differentially expressed proteins. For each variety, the level of mRNA expression of three candidate genes (globulin, GAPDH and peroxidase) and a ubiquitous (Actine) gene was determined by qRT-PCR. The amounts of mRNA of the three genes are partially correlated with the amounts of proteins. These genes were slightly up-regulated over the control. The D-2DE results were validated using Western blot analysis with specific anti-globulin and anti-glyceraldehyde in the embryogenic calli of wheat, in response to water stress. The proteins identified through this technique provide new insights as to how calli respond to osmotic stress. Our method of study provides an original and relevant approach that could contribute significantly to a better understanding of possible linkages between the abundance of specific proteins and the acclimation of durum wheat to water stress at the cellular level.

**Keywords:** Durum wheat, water stress, PEG 6000, *in vitro* selection, somaclonal variation, molecular marker, diagonal two-dimensional electrophoresis, qRT-PCR, Western blot.

## Liste des abréviations

<b>1D</b>	Monodimensionnelle
<b>2,4-D</b>	2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid
<b>2D</b>	Bidimensionnelle
<b>2D-DIGE</b>	2D Différential Gel Electrophoresis.
<b>ABA</b>	Acide Abscissique
<b>ACP</b>	Analyse en composantes principales
<b>ADNc /cDNA</b>	ADN complémentaire
<b>AIA</b>	Acide Indole Acétique
<b>ANA</b>	<i>Acide 1-Naphthalène Acétique</i>
<b>ANOVA</b>	Analyse de la Variance
<b>APS</b>	Ammonium persulfate
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>BAP</b>	6-Benzylaminopurine
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>BSA</b>	Albumine Sérique Bovine
<b>BN-PAGE</b>	Blue native PAGE
<b>Ct</b>	Cycle Threshold
<b>CTAB</b>	Hexadecyltriméthylammonium Bromide
<b>Da</b>	Dalton
<b>DAGE</b>	Dialysis-Assisted Gel Electrophoresis
<b>DEPC</b>	Diéthyl-Pyro-Carbonate
<b>DIGE</b>	Difference Gel Electrophoresis
<b>dNTP</b>	Désoxyribonucléotides-Tri-Phosphates
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Ethylène Diamine Tétra Acétique
<b>ESI</b>	ElectroSpray Ionization
<b>EST</b>	Expressed Sequence Tag
<b>GAPH</b>	Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
<b>IPG</b>	Gradient de pH Immobilisé
<b>ITGC</b>	Institut Technique des Grandes Cultures
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>m<sup>2</sup></b>	Mètre au carrée
<b>LC-ESI-MS/MS</b>	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
<b>MALDI</b>	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
<b>MPa</b>	Mégapascal
<b>MS</b>	Murashige et Skoog
<b>MS/MS</b>	Spectrométrie de Masse en Tandem
<b>NCBI</b>	National Center for Biothechnology Information
<b>PEG</b>	Polyéthylène Glycol
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>Ppm</b>	partie par millions
<b>qRT-PCR</b>	real-time reverse transcription-PCR
<b>SDS</b>	Sodium Dodécyl Sulfate
<b>SSR</b>	Séquences Simples Répétées ou Microsallites
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylenediamine
<b>Tm</b>	Température de fusion
<b>TBE</b>	Tris Borate EDTA
<b>TOF</b>	Temps de Vol (Time of Flight)
<b>TCA</b>	Trichloroacetic Acid
<b>Tris</b>	Tris-(Hydroxyméthyl)-Aminoéthane



## Liste des figures

<b>Figure 1</b>	Origine génétique du blé dur ( <i>Triticum durum</i> Desf) (Croston et Williams 1981).	<b>5</b>
<b>Figure 2</b>	Variations phénotypiques observées au niveau des vitroplants de blé dur pendant la culture <i>in vitro</i> (Bouiamrine et Diouri 2012).	<b>13</b>
<b>Figure 3</b>	Exemple de gel 2D (IEF/SDS-PAGE) des protéines totales de blé dur (cals de la variété Djenah Khetifa). Gel coloré au nitrate d'argent.	<b>21</b>
<b>Figure 4</b>	Représentation schématique du principe de la technique d'électrophorèse bidimensionnelle différentielle 2D-DIGE (Diez et al. 2010)	<b>24</b>
<b>Figure 5</b>	Transfert des vitroplants dans des pastilles de tourbe (Système Jiffy).	<b>28</b>
<b>Figure 6</b>	Mesure de la surface des cals par le logiciel Image Pro Plus (Delporte et al. 2001, Kacem et al. 2016).	<b>29</b>
<b>Figure 7</b>	Cinétique de croissance des cals (mm <sup>2</sup> ) des géotypes de blé. Les surfaces des cals sont mesurées aux 7 <sup>ème</sup> , 15 <sup>ème</sup> et 30 <sup>ème</sup> sous différentes concentrations de PEG.	<b>35</b>
<b>Figure 8</b>	Régénérations de plante à partir de cals embryogènes et acclimatation en serre.	<b>41</b>
<b>Figure 9</b>	Représentation graphique des valeurs propres en fonctions des rangs des axes principaux.	<b>44</b>
<b>Figure 10</b>	Cercle des corrélations entre les différentes variables étudiées dans le plan 1 et 2.	<b>47</b>
<b>Figure 11</b>	Projection des individus sur le plan factoriel 1-2.	<b>48</b>
<b>Figure 12</b>	Superposition des variables et des individus du plan factoriel 1-2	<b>49</b>
<b>Figure 13</b>	Dendrogramme du regroupement des 3 géotypes de blé dur en présence et en absence de stress hydrique.	<b>51</b>
<b>Figure 14</b>	Plantes de la génération R <sub>0</sub> en phase épillaison.	<b>55</b>
<b>Figure 15</b>	Test des amorces <i>gwm 131</i> , <i>gwm135</i> , <i>gwm427</i> , <i>gwm088</i> , <i>gwm186</i> par PCR classique sur ADN génomique de blé dur.	<b>57</b>
<b>Figure 16</b>	Séquenceur d'ADN- LI-COR global édition IR <sup>2</sup> DNA sequencer (Westburg).	<b>59</b>

- Figure 17** Fragments microsatellites, la taille varie de 139 pb à 225 pb. L'ADN a été amplifié par PCR et migré sur LI-COR séquenceur d'ADN. **61**
- Figure 18** Electrophoretic pattern of soluble proteins from callus cultures collected 30 days after culture induction, either without or under osmotic stress (20%PEG). S: stressed, C: control, MW: molecular weight markers in Kilo Daltons. **76**
- Figure 19** Diagonal two-dimensional electrophoresis (D-2DE) of total proteins of callus expressing new proteins (S, stressed) compared with the control (C). **81**
- Figure 20** Western blot analysis. **84**
- Figure 21** Alignments of the amino acid sequences of TaGlob3A and TuGlob1S (a), TaGlob3A, TuGlob1S and rice REG960 (b), and TaGlob3A, TuGlob1S and REG100 proteins (c). **85**
- Figure 22** Fold changes in the accumulation of GAPDH, globulin and peroxidase gene transcripts in the calli of DK, OZ and W under drought stress, obtained using qRT-PCR. **88**

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	Exemples de quelques variations somaclonales obtenues chez différentes espèces.	<b>14</b>
<b>Tableau 2</b>	Etude protéomique chez le blé et de l'orge en réponse à la sécheresse (Kosová et al. 2014).	<b>18</b>
<b>Tableau 3</b>	Temps moyen (jours) de l'induction des cals à partir d'embryons matures de blé dur soumis à différentes concentrations de PEG.	<b>31</b>
<b>Tableau 4</b>	Taux moyen de l'efficacité de la callogenèse de trois variétés de blé dur soumises à différentes concentrations de PEG.	<b>32</b>
<b>Tableau 5</b>	Surfaces moyennes des cals (mm <sup>2</sup> ) des génotypes de blé dur mesurées après 30 jours de culture sur différents niveaux de stress PEG	<b>34</b>
<b>Tableau 6</b>	Tolérance relative des génotypes de blé dur mesurée après 30 jours de culture sur différents niveaux de stress PEG.	<b>36</b>
<b>Tableau 7</b>	Taux moyen de production des cals embryogènes de trois variétés de blé dur soumises à différentes concentration de PEG.	<b>37</b>
<b>Tableau 8</b>	Taux moyen de la régénération de plantes des génotypes de blé dur.	<b>39</b>
<b>Tableau 9</b>	Efficacité de la régénération des plantes des trois génotypes de blé dur.	<b>39</b>
<b>Tableau 10</b>	Coefficients de corrélation de Pearson entre les différentes variables mesurées sur trois génotypes de blé dur en présence de différentes concentrations de PEG.	<b>42</b>
<b>Tableau 11</b>	Valeur propre et pourcentages de variation totale expliquée par les deux premières composantes principales.	<b>45</b>
<b>Tableau 12</b>	Qualité de la représentation des variables sur le plan factoriel (1-2).	<b>46</b>
<b>Tableau 13</b>	Nombre et origine des somaclones R <sub>1</sub> analysés.	<b>54</b>
<b>Tableau 14</b>	Caractéristiques des marqueurs microsatellites étudiés (Röder et al. 1998)	<b>56</b>
<b>Tableau 15</b>	Caractérisation de la variation somaclonale chez des somaclones de première génération (R <sub>1</sub> ) de blé dur.	<b>62</b>
<b>Tableau 16</b>	Fréquences alléliques de chaque population étudiée.	<b>64</b>
<b>Tableau 17</b>	Distance génétique entre les trois populations de blé dur.	<b>64</b>

<b>Tableau 18</b>	Primer sequences used in the quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis to determine the transcript abundance of genes putatively involved in water stress tolerance in wheat.	<b>73</b>
<b>Tableau 19</b>	Effects of PEG concentrations on the callus surface (mm <sup>2</sup> ) in three durum wheat varieties.	<b>74</b>
<b>Tableau 20</b>	Proteins identified by MALDI-TOF/TOF from D-2DE gel electrophoresis of <i>Triticum durum</i> calli.	<b>82</b>

# Table des matières

*Liste des abréviations**Liste des figures**Liste des tableaux**Introduction générale et présentation des objectifs généraux de la thèse* 1**Chapitre I***Synthèse bibliographique*

I. Rappel bibliographique sur l'espèce utilisée	4
I.1 Historique et origine du blé dur	4
I.2 Importance de la culture de blé dur	5
II. Effet du stress hydrique sur la culture du blé dur	6
III. Sélection pour la tolérance aux stress abiotiques	6
III.1 Sélection en condition naturelle	6
III.2 Culture des tissus et sélection <i>in vitro</i> dans une stratégie d'amélioration du blé.	7
III.2.1 Embryogénèse somatique et régénération de plantes	7
III.2.2 Variation somaclonale exprimée par la culture <i>in vitro</i>	9
III.2.2.1 Méthodes de détection de la variation somaclonale	10
III.2.3 La sélection <i>in vitro</i> pour la tolérance au stress hydrique	11
IV. Effet du stress hydrique sur le transcriptome et le protéome du blé.	15
IV.1 Effet du stress hydrique sur le transcriptome	15
IV. 2 Fraction protéique du blé	15
IV.3 Effet du stress hydrique sur le protéome	16
V. Analyse protéomique	20
V.1 Gels à deux dimensions	20
V.1.1 Electrophorèse bidimensionnelle (2D)	20
V.1.2 Approche protéomique 2D-DIGE	23
V.1.3 Approche protéomique DAGE	23
V.1.4 Approche protéomique D-2DE	24

**Chapitre II***Sélection *in vitro* pour la tolérance au stress hydrique chez le blé dur**(*Triticum durum* Desf).*

I. INTRODUCTION	25
-----------------	----

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
II.1 Matériel végétal	26
II.2 Induction de la callogenèse et conditions de culture	26
II.3 Sélection au niveau cellulaire	27
II.4 Régénération des plantes et acclimatation	27
II.5 Variables mesurées	28
II.6 Analyse statistique	29
III. RÉSULTATS ET DISCUSSION	31
III.1 Effet du stress hydrique induit par le PEG sur les variables mesurées.	30
III.1.1 Effet du stress hydrique sur le temps d'initiation de cals	30
III.1.2 Effet du stress hydrique sur l'efficacité de la callogenèse	31
III.1.3 Effet du stress hydrique sur la surface de croissance des cals	33
et tolérance relative	
III.1.4 Effet du stress hydrique sur la production de cal embryogène	36
III.1.5 Effet du stress hydrique sur le potentiel de régénération	38
III.2 Analyse des corrélations entre les variables étudiées	42
III.3 Analyse en composantes principales de l'ensemble des variables étudiées	44
III.4 Classification ascendante hiérarchique	50
IV. CONCLUSION	51

### *Chapitre III*

#### *Caractérisation moléculaire de la variation somaclonale chez des somaclones de blé dur (*Triticum durum* Desf) par marqueur SSR.*

I. INTRODUCTION	53
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	54
II.1 Matériel végétal et condition de culture	54
II.2 Extraction de l'ADN génomique	55
II.3 Amorces microsatellites	55
II.4 Conditions d'amplification des marqueurs microsatellites	56
II.5 Migration des produits PCR sur gel de polyacrylamide sur le séquenceur	57
LI-COR	
II.7 Analyse statistique des données	58
III. RÉSULTATS ET DISCUSSION	60
III.1 Détection de la variation somaclonale	60

III.2 Diversité génétique	63
IV. DISCUSSION	65
V. CONCLUSION	67

### ***Chapitre IV***

***Diagonal two-dimensional electrophoresis (D-2DE): a new approach to study the effect of osmotic stress induced by polyethylene glycol in durum wheat (*Triticum durum* Desf).***

I. INTRODUCTION	68
II. MATERIALS AND METHODS	69
II.1 Plant material	69
II.2 Callus induction and <i>in vitro</i> selection procedures	69
II.3 Callus growth	69
II.4 Protein extraction and one-dimensional gel electrophoresis (1D SDS PAGE)	70
II.5 Diagonal two-dimensional electrophoresis (D-2DE)	70
II.6 Spot excision, digestion and identification of proteins	71
II.7 Immunoblot analysis	72
II.8 RNA extraction, first strand cDNA synthesis and qRT-PCR analysis	72
II.9 Statistical analysis	73
III. RESULTS AND DISCUSSION	74
III.1 Effect of osmotic stress on callus surface growth	74
III.2 One-dimensional electrophoresis	75
III.3 Two-dimensional electrophoresis	78
III.4 Protein identification	79
III.4.1 Globulins	83
III.4.2 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	86
III.4.3 Peroxidase	87
III.5 qRT-PCR analysis	88
IV CONCLUSION	89
<b><i>Discussion générale et conclusion</i></b>	91
<b><i>Références bibliographiques</i></b>	96
<b><i>Annexes</i></b>	113
<b><i>Articles et communications scientifiques</i></b>	123



# Introduction générale

Durant la dernière décennie, les épisodes récurrents de sécheresse, perçus comme une manifestation possible du changement climatique, ont amené à s'interroger sur de possibles voies d'adaptation pour un maintien de la production agricole avec une ressource en eau de plus en plus rare (Itier 2008).

De nombreux efforts ont été réalisés à ce jour pour améliorer la tolérance du blé aux différents types de stress abiotique, entre autres le stress hydrique. Cependant, cette tolérance reste un caractère très difficile à améliorer dans le cadre de programmes de sélection génétique classique.

Au-delà de la sélection classique *in situ*, différents moyens biotechnologiques, ayant pour objet d'augmenter ces potentialités de tolérance ou de résistance, sont en cours d'étude dans divers laboratoires. Ainsi en est-il de l'application brutale d'agents abiotiques pendant la culture *in vitro* de souches végétales, qui ont permis d'améliorer la tolérance à divers stress biotique ou abiotique (Jain et al. 1990, Caboni et al. 2003, Zalc et al. 2004).

L'effet de pressions sélectives sur la nature et l'ampleur de la variation somaclonale a rarement été envisagé alors qu'une telle étude présente un double intérêt : elle permettrait de mieux cerner l'utilité de la culture *in vitro* pour la sélection de variants tolérants mais aussi de fournir des informations sur les processus impliqués dans la variation somaclonale.

Les différentes contraintes environnementales induisent de profonds changements dans le protéome des plantes. Les gènes induits assurent la protection de la cellule en produisant des protéines fonctionnelles qui protègent les cellules de la déshydratation (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki 2007).

Un grand nombre de gènes induits par le stress hydrique ont été identifiés en utilisant diverses stratégies de génomique fonctionnelle (Yamaguchi-Shinozaki 2006). Cependant, la faible corrélation entre le taux d'ARN messagers et le taux de protéine a suscité un intérêt majeur pour caractériser la réponse protéomique à la sécheresse (Gygi et al. 1999).

Malgré de nombreuses études qui rapportent l'identification de quelques milliers de protéines dans des échantillons de plantes, la description complète du protéome des plantes dans un tissu donné, une phase de développement et des conditions environnementales restent encore un grand défi. En effet, la technique des gels 2D fait récemment l'objet de certaines critiques en raison de ses limitations connues telles que la faible représentation des protéines peu abondantes (Gygi et al. 2000) et de l'incapacité à résoudre la totalité des protéines présentes, d'autres difficultés découlent de l'extrême diversité des protéines en termes de dynamique d'expression et de nature chimique. Plusieurs études rapportent que la meilleure façon d'utiliser une approche à base de gel-2D est de se concentrer sur une ou quelques protéines particulières ou de réduire la complexité de l'échantillon étudié (Abdallah 2012).

L'identification de gènes induits en condition de stress constitue une approche très prometteuse en amélioration des plantes. En effet, l'isolement de gènes candidats et leur caractérisation devrait permettre à court terme leur transfert à d'autres fonds génétiques plus performants, et qui sont généralement plus sensibles aux stress abiotiques (Brini et al. 2007, Benderradji 2013).

Notre démarche globale s'est construite autour d'objectifs complémentaires :

La première partie de notre étude a été consacrée à l'étude des compétences embryogènes, des cals, les taux de régénérations sous l'effet du polyéthylène glycol (PEG 6000), simulant les conditions de stress hydrique. À l'issue de cette partie, nous décrivons une méthodologie originale de culture de tissus; nous comparons des conditions inductives, sélectives et régénératives; nous démontrons et nous évaluons l'aptitude des tissus issus d'embryons matures à la régénération (**Chapitre II**).

A ce travail, s'ajoute une seconde analyse de la variation somaclonale impliquant la recherche de marqueurs moléculaires neutres de type SSR (simple sequence repeat) au niveau de la première génération ( $R_1$ ) de blé dur obtenue par autofécondation des plantes ( $R_0$ ) (**Chapitre III**).

Nous avons analysé les changements dans l'expression des protéines totales des cals de blé dur face au stress hydrique induit par le PEG 6000. Une recherche de "gènes/protéines candidat(e)s" s'appuyant sur une nouvelle approche protéomique a été

mise en œuvre, laquelle à notre connaissance n'a pas encore été abordée dans des travaux antérieurs. Parallèlement, les gènes candidats potentiellement associés à la tolérance au stress hydrique sont identifiés et validés par RT-PCR quantitative. L'analyse par Western blot a été utilisée pour valider d'avantage les différences de profil d'expression (**Chapitre IV**). Une discussion générale et conclusion sont données dans la dernière partie de ce travail.

# Chapitre 1

## *Synthèse bibliographique*

## I. Rappel bibliographique sur l'espèce utilisée

### I.1 Historique et origine du blé dur

L'histoire de l'homme et celle des plantes cultivées constituent un ensemble d'interactions continues dans le temps et l'espace (Bonjean et Picard 1990). Au Néolithique le passage des premiers groupements humains de l'état de chasseurs - cueilleurs d'une civilisation de nomades à celle d'agriculteurs sédentarisées est le résultat de la domestication progressive de graminées cultivées dont la plus ancienne semble être le blé dur (Feillet 2000).

Le blé est parmi les premières espèces cueillies et cultivées par l'homme au proche Orient, il y a environ 10.000 à 15.000 ans avant J.C (Hervé 1979). Des restes de blés, diploïdes et tétraploïdes, ont été découverts sur des sites archéologiques au proche Orient d'après Harlan (1975). Le blé dur provient des territoires de la Turquie, de la Syrie, de l'Iraq et de l'Iran selon Feldman (2001). Comparativement aux blés diploïdes, leurs grands épis et leurs gros grains les rendaient beaucoup plus intéressants pour la domestication.

Le blé est une céréale autogame appartenant au groupe des angiospermes monocotylédones, de la famille des *Poaceae*, tribu des *Triticées* et genre *Triticum*. Les espèces du genre *Triticum* sont des herbacées annuelles produisant un fruit sec indéhiscent, le caryopse. Le blé dur (*Triticum durum*) est l'une des espèces les plus cultivées dans le monde et en Algérie.

Selon Mackey (1968) l'origine génétique du blé dur remonte au croisement entre deux espèces ancestrales *Triticum monococcum* et une graminée sauvage du nom *Aegilops speltoides*. Le blé dur *Triticum durum*, appelé ainsi en raison de la dureté de son grain.

D'après Feillet (2000) le croisement naturel de *Triticum monococcum* (porteur du génome A) × *Aegilops speltoides* (porteur du génome B) a permis l'apparition d'un blé dur sauvage de type AABB (*Triticum turgidum ssp.dicoccoides*) qui a ensuite progressivement évolué vers *Triticum turgidum ssp.dicoccum* puis vers *Triticum durum* (blé dur cultivé) (**Figure 1**).



## **II. Effet du stress hydrique sur la culture du blé dur**

Outre son rôle dans la photosynthèse, dans le transport et l'accumulation des éléments nutritifs ainsi que dans la division cellulaire et la régulation thermique, l'eau joue un rôle essentiel dans la croissance et le développement des plantes cultivées (Riou 1993).

Le manque d'eau ou déficit hydrique représente le stress abiotique le plus sévère auquel la culture du blé dur fait face dans les conditions de productions des zones arides et semi- arides (Chenaffi et al. 2006). Ce stress se traduit par une série de modification qui touchent les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques, à partir du moment où les besoins en eau de la plante sont supérieurs aux quantités disponibles (Mefti et al. 2000).

Un déficit hydrique précoce affecte en parallèle la croissance des racines et des parties aériennes, le développement des feuilles et des organes reproducteurs (Debaeke et al. 1996). Au stage montaison le stress hydrique se traduit par la chute du nombre d'épis produits par mètre carré suite à la régression intense des talles et la baisse du nombre de grains par épi. Ceci se répercute sur le rendement économique de la culture, qui peut baisser de plus de 80% (Chenaffi et al. 2006).

Les changements et les imprévus climatiques vont rendre la gestion de l'eau de plus en plus difficile. Une action rapide destinée à adapter le secteur au changement climatique sera beaucoup moins coûteuse que les dommages qui résulteront de ce phénomène (Nichane et Khelil 2014).

## **III. Sélection pour la tolérance aux stress abiotiques**

### **III.1 La sélection en condition naturelle**

Le principe de la sélection "classique", c'est à dire pour la valeur en lignée, consiste à effectuer des croisements puis à sélectionner des génotypes favorables parmi les milliers de descendants au cours des générations suivantes. Les descendants présentant tous les caractères recherchés sont sélectionnés grâce à l'évaluation de critères phénotypiques dans des conditions de culture favorisant les plantes tolérantes au



stress considéré. Cette sélection repose donc sur l'exploitation de la variabilité naturelle existant au sein d'une espèce et requiert un accès à des ressources génétiques aussi vastes que possibles, c'est-à-dire à la biodiversité (Virouvet 2011).

Ces méthodes conventionnelles de création variétale sont efficaces et éprouvées, mais nécessitent de longues périodes, beaucoup de matériel végétal et de grandes superficies pour réaliser les essais en champs. En outre, ces méthodes manquent également de précision surtout quand le caractère à améliorer est complexe comme la sécheresse.

### **III.2 Culture de tissus et sélection *in vitro* dans une stratégie d'amélioration du blé.**

#### **III.2.1 Embryogénèse somatique et régénération de plantes**

L'embryogenèse somatique désigne l'ensemble des événements provoqués artificiellement *in vitro* conduisant à la formation d'embryons à partir d'une cellule somatique ou germinale. Elle désigne plus généralement l'ensemble du procédé permettant de produire des clones d'embryons à partir d'un génotype et de régénérer des plantules à partir de ceux-ci. Ce procédé est une bonne illustration de la totipotence végétale.

L'importance du stade physiologique de l'explant utilisé ainsi que des conditions de sa croissance avant son prélèvement a été soulignée par de nombreux travaux de recherches. Chez le blé, les tissus provenant d'embryons zygotiques ou immatures expriment le plus souvent, d'une manière nette et reproductible, l'aptitude à l'induction de calcs embryogènes et à la régénération (Zair 2003). Quoique l'examen individuel des embryons soit fastidieux ; plusieurs travaux ont indiqué que des embryons de 100 à 200  $\mu\text{m}$  de taille sont les plus favorables pour l'induction du cal scutellaire (Ozias-Akins et Vasil 1982, Maddock et al. 1983).

Les différentes étapes de mise en culture (hormones, vitamines, sels minéraux) constituent autant de stress pouvant intervenir directement dans l'induction du processus de l'embryogenèse somatique. Les facteurs comme la blessure, le choc thermique, le changement de pH, de fortes concentrations de sel, en ions ou en métaux

lourds, ou un stress osmotique peuvent participer à l'induction de la formation d'embryons somatiques (Legrand 2006).

La culture *in vitro* chez le blé est réputée pour être difficile, ce qui est dû, en particulier, aux obstacles rencontrés lors de la régénération des plantes. Différents explants ont été utilisés chez le blé pour la formation de cals embryogènes et la régénération de plantes (Özgen et al. 1996, Özgen et al. 1998, Delporte et al. 2001, Chauhan et al. 2007). Ces tissus diffèrent dans leur capacité à régénérer des plantes entières (Delporte et al. 2001). Les tissus immatures tels que les embryons immatures sont les explants les plus privilégiés pour la transformation génétique en raison de leur capacité de régénération élevée (Chauhan et al. 2007). Cependant, l'obtention des embryons immatures au stade physiologique adéquats est laborieuse et contraignante ; en effet, les embryons immatures ne peuvent être récoltés au champ que pendant une courte période de l'année, ou les plantes donneuses doivent être cultivées en conditions contrôlées, ce qui requiert des ressources supplémentaires.

A la différence de leurs équivalents immatures, les embryons matures sont disponibles en quantités tout au long de l'année et sont facilement stockés sous la forme de graines déshydratées, ce matériel présente une moindre variabilité physiologique (Kacem 2005, Wang 2008).

Le développement d'un protocole viable de régénération de plants à partir d'explants de l'espèce étudiée, provenant d'une large gamme variétale, est un pré-requis pour de futures investigations biotechnologiques (Ward et Jordan 2001).

Mathias et Fukui (1986) ont trouvé que le chromosome 4B de la variété Cappelle-Desprez de blé tendre stimule la croissance des cals de blé, la morphogenèse et la régénération. Ces travaux ont été confirmés lors de la substitution de ce chromosome dans le noyau de Chinese Sping résultant en une amélioration de la réponse des cals de cette variété (Higgins et Mathias 1987).

### III.2.2 Variation somaclonale exprimée par la culture *in vitro*

La régénération à partir de la culture de cals s'accompagne généralement de modifications plus ou moins importantes du phénotype ou du génotype. Ces variations sont connues sous le terme de variations somaclonales (Larkin et Scowcroft 1981, Evans 1989).

Ces variations créées *in vitro* peuvent être de nature génique, transmises à la descendance, ou de nature épigénétique. Dans ce cas, les mutations reflètent des modifications dans l'expression des gènes et ont tendance à disparaître chez les plantules régénérées (Larkin et Scowcroft 1981). Les premières observations de la variation somaclonale chez le blé ont été établies par Ahloowalia (1982), Mad-dock et al. (1983), Larkin et al. (1984) et Cooper et al. (1986).

La variation somaclonale proviendrait selon plusieurs auteurs de la dérépression de certains gènes, de modifications du caryotype (aneuploïdie, polyploïdie), de mutations ponctuelles, de réarrangements chromosomiques, de phénomènes d'amplification de gènes ou d'activation d'éléments transposables (Nabors et al. 1980, Larkin et Scowcroft 1981, Sun et al. 1983, Galiba et al, 1986, Evans et al. 1989, Sato et al. 2011).

Le mouvement d'éléments transposables qui sont des fragments d'ADN se déplaçant d'un locus à un autre et dans le détachement ou l'insertion se traduirait dans l'expression génétique, peuvent être à l'origine des variations somaclonales (Larkin et al. 1984, Sato et al. 2011).

Selon plusieurs auteurs, les facteurs pouvant influencer la variation somaclonale sont le génotype, la source d'explant, la durée de la culture, la composition du milieu, la nature de certains régulateurs de croissance (Larkin 1984, Duncan 1997, Kaeppler et al. 2000).

Nabors et al. (1980) ont sélectionné des lignées cellulaires dont les tissus ont acquis des niveaux élevés de tolérance à la salinité pour plus de 10 cycles successifs. Ils

ont signalé que certaines séquences chromosomiques pouvaient être amplifiées et permettre à ces lignées de s'adapter aux conditions salines.

### III.2.2.1 Méthodes de détection de la variation somaclonale

Plusieurs méthodes ont été employées pour identifier la variation somaclonale chez les plantes régénérées telles que la description morphologique, l'analyse du caryotype, les marqueurs biochimiques (Heinze et Mee 1971, Hsissou et Bouharmont 1994, Mehta et al. 2000, Karim et al. 2011). Ces méthodes ont montré leurs avantages et leurs limites.

Il est généralement admis que les marqueurs morphologiques sont loin d'être aussi informatifs que les marqueurs moléculaires (Crespan et Milani 2001). Le polymorphisme de longueur de fragment amplifiés (AFLP) et le polymorphisme de longueur de fragment de restriction (RFLP) sont fiables pour vérifier la fidélité génétique ou la variation somaclonale chez les plantes issues de culture tissulaires, mais le coût élevé de ces techniques rend ces tests inappropriés (Kumar et al. 2011).

Dans de nombreux cas, le marqueur RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) a été utilisé pour vérifier la présence de variation somaclonale chez les plantes régénérées *in vitro* (Kumar et al. 2011). Cette technique est simple, rapide et ne nécessite ni un marquage radioactif ni une connaissance préalable de la séquence nucléotidique. Néanmoins, l'inconvénient majeur de ce marqueur est son manque de fiabilité et de reproductibilité (Nookaraju et Agrawal 2012).

Parmi les marqueurs moléculaires les plus fréquemment utilisés on retrouve également les microsatellites ou SSR, lesquels sont devenus des marqueurs de choix pour l'analyse de la variation somaclonale chez plusieurs espèces grâce à leurs multiples caractéristiques aussi bien biologiques que techniques (Rahman et Rajora 2001, Jin et al. 2008, Zhang et al. 2010, Nookaraju et Agrawal 2012, Khan et al. 2013). Ces marqueurs sont constitués de séquences de di-, tri- ou tétra-nucléotides répétés en tandem sur une longueur inférieure à 100 paires de bases (Tautz 1989). Le polymorphisme de ce marqueur repose sur la variation du nombre d'unités de répétition constituant le microsatellite.

Les microsatellites sont des marqueurs codominants, extrêmement polymorphes, faciles à manipuler et permettant le multiplexage. Ils requièrent très peu d'ADN (quelques nanogrammes) et sont bien répartis dans le génome. Ces marqueurs sont très reproductibles et moins lourds d'utilisation que les RFLP ou AFLP avec une bonne résolution analytique. Un inconvénient reste cependant que leur développement nécessite un travail considérable dont les principales étapes sont (1) le criblage d'une banque d'ADN génomique avec une sonde correspondant au motif répété recherché, (2) le séquençage des clones positifs pour caractériser la séquence des régions bordant chaque microsatellite et (3) le développement d'amorces spécifiques pour chaque microsatellite.

### **III.2.3 La sélection *in vitro* pour la tolérance au stress hydrique**

Différentes voies biotechnologiques peuvent être utilisées pour augmenter la diversité et les capacités des plantes à tolérer les stress, sachant que dans une population naturelle c'est la plante entière qui fait face aux pressions sélectives où le criblage est effectué à un niveau global. Par contre, *in vitro*, c'est la cellule, libérée des contraintes rencontrées dans la plante entière, qui constitue la cible des pressions sélectives afin d'arriver à une gamme de variants qui diffèrent de ceux issus de la sélection classique (Sibi 1996 cité par Benderradji 2013).

La sélection *in vitro* pour la tolérance aux stress abiotiques, telle que la sécheresse, revient à exposer les tissus des plantes dont la résistance est recherchée à ces stress. Un des avantages de la sélection au niveau tissulaire est que, en principe, seules les cellules qui sont capables de résister à ces pressions de sélection seront isolées (Buiatti 1989).

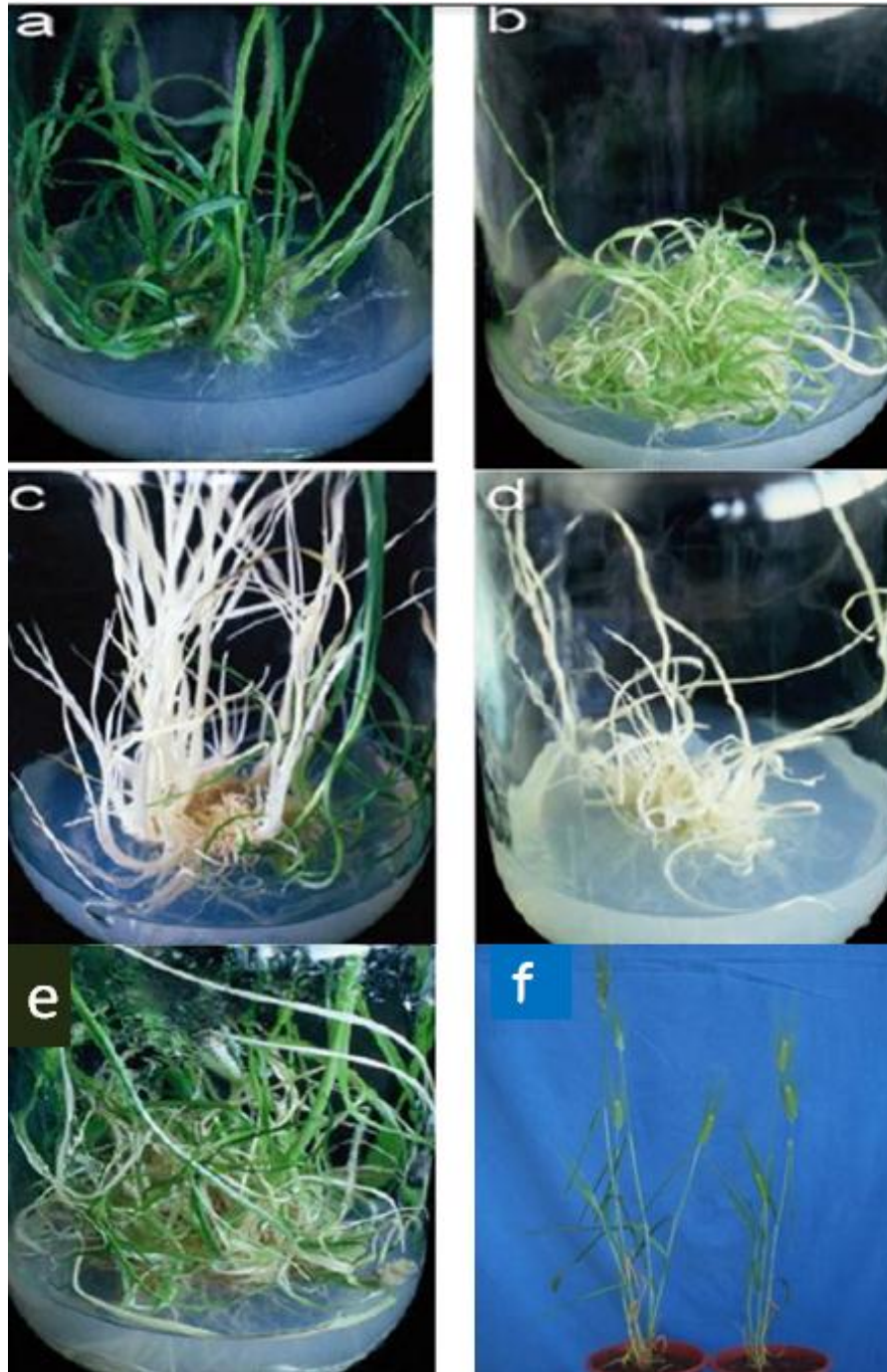
Ces cellules permettent ainsi l'obtention précoce de variants somaclonaux présentant les caractéristiques recherchées et susceptibles de régénérer des plantes tolérantes à ces pressions (Jain 2001). Cette approche permet de cribler un grand nombre de génotypes dans un espace et un temps réduits avec des coûts relativement faibles.

Il arrive parfois que la mutation qui confère la tolérance ou la résistance peut entraîner des effets négatifs au niveau de la croissance, de la vitalité et de la fécondité, par accumulation d'un trop grand nombre de modifications génotypiques (**Figure 2**) (Bouiamrine et al. 2012).

Le polyéthylène glycol, le saccharose, le mannitol ou le sorbitol ont été utilisés dans plusieurs travaux comme des agents osmotiques pour la sélection *in vitro*. Cependant, l'une des approches les plus populaires pour l'induction d'un stress hydrique *in vitro*, est l'utilisation du polyéthylène glycol (Gulati et Jaiwal 1994). Le PEG de grand poids moléculaire a été longtemps employé pour simuler l'effet du stress hydrique sur les plantes, et notamment chez le blé (Hsissou et Bouharmont 1994, Ranjbarfordoei et al. 2001), il est utilisé comme un agent osmotique abaissant le potentiel de l'eau d'une manière semblable au séchage du sol (Ranjbarfordoei et al. 2001, Matheka et al. 2008, Meng et al. 2016).

Deux types de méthodes de sélection ont été suggérés, le traitement par étapes à long terme, dont les cultures sont exposées au stress d'une manière progressive, et le traitement choc à court terme pendant lequel les cultures sont directement soumises aux fortes concentrations de l'agent sélectif, et dans ce cas seules les cellules qui tolèrent ces niveaux élevés de stress vont survivre (Lutts et al. 1996).

A travers de nombreux exemples, il est actuellement bien établi, que les techniques de cultures de tissus peuvent être utilisées pour sélectionner des lignées cellulaires intéressantes. En effet, cette approche a montré son efficacité pour la sélection d'une large proportion de transformations somaclonales stables chez le blé ainsi que chez différentes autres espèces (**Tableau 1**).



**Figure 2 :** Variations phénotypiques observées au niveau des vitroplants de blé dur pendant la culture *in vitro* (Bouiamrine et al. 2012). (a) plantules vertes phénotypiquement normales; (b) Cal régénérant des plantules présentant des feuilles anormales; (c) cal régénérant des plantules vertes et albinos; (d) Cal régénérant des plantules totalement albinos; (e) Cal régénérant des plantules vertes et chimériques; (f) Plantes montrant des variations dans la hauteur et le nombre de talle.

**Tableau 1.** Exemples de quelques variations somaclonales obtenues chez différentes espèces.

<b>Espèces</b>	<b>Caractéristiques des somaclones</b>	<b>Références</b>
Banane ( <i>Musa acuminata</i> L.)	Semi-nain et résistant à la fusariose	Tang et al. (2000)
Blé dur ( <i>Triticum durum</i> Desf.)	Tolérance à la sécheresse	Hsissou et Bouharmont (1994)
Blé tendre ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	Tolérance au borate de sodium	Karim et al. (2011)
Blé tendre ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	Amélioration des caractères agronomiques	Kasem et Abdelkareem (2005)
Blé tendre ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	Amélioration des caractères agronomiques	Gao et al. (1994)
Carrote ( <i>Daucus carota</i> L.)	Resistance à la sécheresse	Rabiei et al. (2011)
Fraisier (cv. <i>Pajaro</i> )	Résistance au mildiou, rendement en fruits, taille, forme et couleur des fruits.	Faedi et al. (1993)
Fraisier ( <i>Fragaria X ananassa</i> ).	Couleur des fruits, rendement en fruits, capacité de production de stolons, vigueur de la plante.	Popescu et al. (1997)
Pomme de terre ( <i>Solanum tuberosum</i> )	Tolérance à la salinité	Queiros et al. (2007)
Riz ( <i>Oryza sativa</i> )	Tolérance à la sécheresse	Adkins et al. (1995)
Riz ( <i>Oryza sativa</i> )	Tolérance à l'aluminium	Roy et Mandal (2005)
Soja ( <i>Glycine max</i> L.)	Tolérance à la sécheresse	Widoretno et Sudarsono (2003)
Soja ( <i>Glycine max</i> L.)	Tolérance à la sécheresse	Sunaryo et al. (2016)
Sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> L.)	Tolérance à la sécheresse	Smith et al. (1985)
Tabac ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	Tolérance à la salinité	Nabors et al. (1980)



## **IV. Effet du stress hydrique sur le transcriptome et le protéome du blé.**

### **IV.1 Effet du stress hydrique sur le transcriptome**

Le déficit hydrique déclenche de nombreuses modifications dans l'expression des gènes contrôlant la mise en place de réponses adaptatives des plantes. Un grand nombre de gènes induits par le stress hydrique ont été identifiés en utilisant diverses stratégies de génomique fonctionnelle (Yamaguchi-Shinozaki 2006).

Dans une cellule, les informations fournies par l'analyse du génome, des transcrits ou par l'analyse des protéines sont complémentaires. Alors que les approches génomiques et transcriptomiques présentent de nombreux avantages (Ergen et Budak 2009, Kantar et al. 2011), l'expression des gènes et le décryptage du génome ne permettent pas de prédire le taux d'expression des protéines en raison des mécanismes moléculaires de régulation de la transcription et de la traduction. En effet, diverses études du transcriptome ont montré qu'il n'existe pas réellement de corrélation entre le taux d'ARN messagers et le taux de protéine (Gygi et al. 1999, Zhang et al. 2010, Gao et al. 2011, Abdalla et al. 2012).

### **IV. 2 Fraction protéique du blé**

Les protéines du grain de blé sont classiquement réparties en quatre groupes en fonction de leur solubilité (Osborne 1907) les gliadines solubles dans l'eau ou l'éthanol, les gluténines partiellement solubles dans les solutions dilués d'acide et dans certains agents détergents, les albumines solubles dans l'eau, les globulines solubles dans une solution saline.

Les albumines et les globulines (15 à 20% des protéines de la farine) sont souvent regroupées sous le terme de protéines solubles, de protéines cytoplasmiques ou métaboliques. On les retrouve principalement dans les couches superficielles du grain de blé et à une plus faible concentration dans l'endosperme (Goesaert et al. 2005). Ce groupe de protéines est constitué d'un grand nombre de protéines se différenciant par leurs propriétés physico-chimiques (masse moléculaire comprise entre 5 et 90kDa, point isoélectrique, acides aminés) et fonctionnelles (activités enzymatiques : alpha et beta-

amylase, protéases, oxydoréductases ; inhibiteurs enzymatiques, pouvoir émulsifiant et moussant) (Vensel et al. 2005).

Contrairement aux protéines de réserves, les albumines et les globulines sont relativement riches en lysine, cette famille de protéines a une composition d'acides aminés qui correspond aux besoins alimentaires des humains et des animaux monogastriques. Malheureusement, pour ces groupes de protéines, il existe plusieurs protéines connues comme allergènes. En effet, un large panel d'allergènes compris entre 12 et 70 kDa appartenant à la fraction albumines/globulines a été identifié dans l'allergie au blé (Mittag et al. 2004). Cependant, plusieurs autres protéines métaboliques ont des fonctions inconnues et ne sont pas bien caractérisées. Certaines de ces protéines, en particulier ceux qui appartiennent à la famille de trypsine et les inhibiteurs  $\alpha$ -amylase, sont impliquées dans la défense des plantes (Carbonero et al. 1993, Shewry et Lucas, 1997).

#### **IV.3 Effet du stress hydrique sur le protéome**

Le « protéome » terme défini par Wilkins et al. (1995) désigne l'ensemble des protéines exprimées dans un organisme, un tissu ou une cellule à un moment donné et dans un environnement donné. Le protéome possède la particularité de changer en permanence au cours de la vie d'une cellule et varie énormément en fonction des changements environnementaux ou des stress que subissent les organismes.

Pour permettre à la plante de survivre et de s'adapter dans des conditions de stress, une des stratégies mises en place au niveau cellulaire semble être la synthèse de protéines spécifiques. De ce fait, de nombreux chercheurs abordent la tolérance au stress par l'isolement et l'étude de ces molécules (Lamaze et al. 1994).

Les gènes impliqués dans la réponse à la contrainte abiotique, qu'ils soient induits ou réprimés, codent pour une large gamme de protéines assurant diverses fonctions. Schulze et al. (2005) rapportent qu'une partie des protéines induites ont une fonction directe dans l'augmentation de la tolérance au stress (protéines fonctionnelles), d'autres ont une fonction dans la chaîne de transduction (protéines régulatrices) qui aboutiront à la production de protéines fonctionnelles. La plupart des protéines

à fonction directe sont des aquaporines et des enzymes catalysant la biosynthèse d'osmolytes (carbohydrates et acides aminés).

L'une des premières études portant sur la réponse des plantes au déficit hydrique concernait les variations induites par la sécheresse sur les profils protéiques de feuilles et de racines de deux mutants d'*A. thaliana* (Leymarie et al. 1996). Les auteurs ont détecté près de 30 spots concernés directement par la sécheresse et/ou les mutations. Le développement des techniques de micro-séquençage d'Edman puis de la spectrométrie de masse a permis par la suite d'établir les premières listes de protéines (Costa et al. 1998, Riccardi et al. 1998) offrant ainsi de nouvelles perspectives pour la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse des plantes au déficit hydrique.

Différentes études protéomiques menées sur la réponse aux stress abiotiques ont été effectuées chez le blé (**Tableau 2**). Ces études ont indiqué que le stress hydrique modifie l'abondance des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et glucidique, la détoxification cellulaire, la régulation de l'expression des gènes induits directement dans la réponse au stress, la régulation du signal de transduction et le renforcement de la paroi cellulaire.

**Tableau 2.** Etude protéomique chez le blé et de l'orge en réponse à la sécheresse.

<b>Sécheresse</b>			
<b>Matériel végétal</b>	<b>Traite-ment</b>	<b>Méthode</b>	<b>Majeures protéines différentiellement exprimées</b>
<b>Blé dur</b> ( <i>Triticum dicoccoides</i> ) (Feuilles)	9 jours sans arrosage	2DE nano LC-ESI-MS/MS.	75 protéines identifiées 11 candidats pour la tolérance à la sécheresse. Différences génotypiques: Triose-Phosphate Isomérase, ATP synthase CF1. -Protéines abondantes chez les variétés sensibles : Méthionine Synthase - Protéines abondantes chez les variétés tolérantes : $\beta$ -1,3-glucanase, $\beta$ -1,4-glucanase, Xyloglucan Endo-Transglycosylase.
<b>Blé dur</b> ( <i>Triticum durum</i> ) (Feuilles)	7 jours sans arrosage	175mM Tris-HCl, pH 8.8, TCA-acetone; 2DE MALDI-TOF	36 protéines identifiées Protéines régulées à la hausse: Anhydrase carbonique, RubisCO LSU Protéines régulées à la baisse: RubisCO SSU, enzymes du cycle de Calvin (ALDO, PRK) ; ATP synthase CF1 $\alpha$
<b>Orge</b> ( <i>Hordeum vulgare</i> ) (Feuilles et racines)	7 jours sans arrosage	10mM PBS, TCA-acétone; 2D-DIGE MALDI-TOF	69 protéines identifiées (24/feuilles, 45/racines) Protéines régulées à la hausse: Protéine Myb-like, Protéine 14-3-3 Protéines régulées à la baisse: glutathion S-transférase, glutathion peroxydase.

<b>Stress osmotique PEG 6000</b>			
<b>Blé tendre</b> <i>(Triticum aestivum)</i> <b>(Feuilles)</b>	Solution de Hoagland 15% de PEG-6000 pendant 3 jours; Prétraitement 0.5mM d'acide salicylique (3days)	TCA/acetone; 2DE MALDI-TOF/TOF	82 protéines (76 protéines identifiées), dont 35 protéines sensibles à l'acide salicylique -Protéines régulées à la hausse: Protéine 14-3-3, Ascorbate-péroxydases, Glutathion S-Transférase, Protéine disulfure isomérase ; ATP synthase CF1 $\alpha$ , $\beta$
<b>Blé tendre</b> <i>(Triticum aestivum)</i> <b>(Feuilles)</b>	PEG-6000 (-1MPa) pendant 72 h	TCA/acetone; 2DE MALDI-TOF/TOF	35 protéines identifiées Protéines régulées à la hausse: GAPDH B; 26S protéasome, V-ATPase Protéines régulées à la baisse: RubisCO LSU et SSU, GAPDH, triose-phosphate isomérase, ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase)
<b>Blé tendre</b> <i>(Triticum aestivum)</i> <b>(grains – feuilles)</b>	Solution de Hoagland, 20% PEG-6000 (-0.75MPa) pendant 48h	TCA/acetone/phenol, LC-MS/MS	173 (T : génotype tolérant) et 251 (génotype moins tolérant que T) Phosphoprotéines identifiées: SnRK2 kinase, protéine phosphatase 2C, Protéine kinase Ca <sup>++</sup> - calmoduline dépendante -Protéines de transport : Aquaporines, H <sup>+</sup> -ATPase. -Protéines LEA: WCOR719, WCOR825, WRAB17.

Source : Kosová et al. (2014)

## V. Analyse protéomique

La protéomique s'intéresse à l'étude du protéome et vise à établir l'identité, la quantité et la fonction des protéines, et à en déterminer l'expression en fonction des conditions environnementales (Patterson et Aebersold 2003).

Bien que connaître la totalité des protéines produites dans une cellule donnée a une vraie valeur intrinsèque, c'est le plus souvent les différences entre deux types cellulaires ou même entre le même type cellulaire mais dans des conditions différentes qui sont le plus souvent riches en information. Une telle étude comparative permet de déterminer toutes les protéines impliquées dans ces différences cellulaires en vue d'études ultérieures limitées à ces seuls candidats.

La démarche la plus fréquemment utilisée, pour l'analyse du protéome, consiste en l'exécution d'un gel en deux dimensions, suivi d'excision de spots d'intérêts après visualisation, de digestion (trypsique le plus souvent), d'analyse par spectrométrie de masse suivi de comparaison des résultats avec les banques de données.

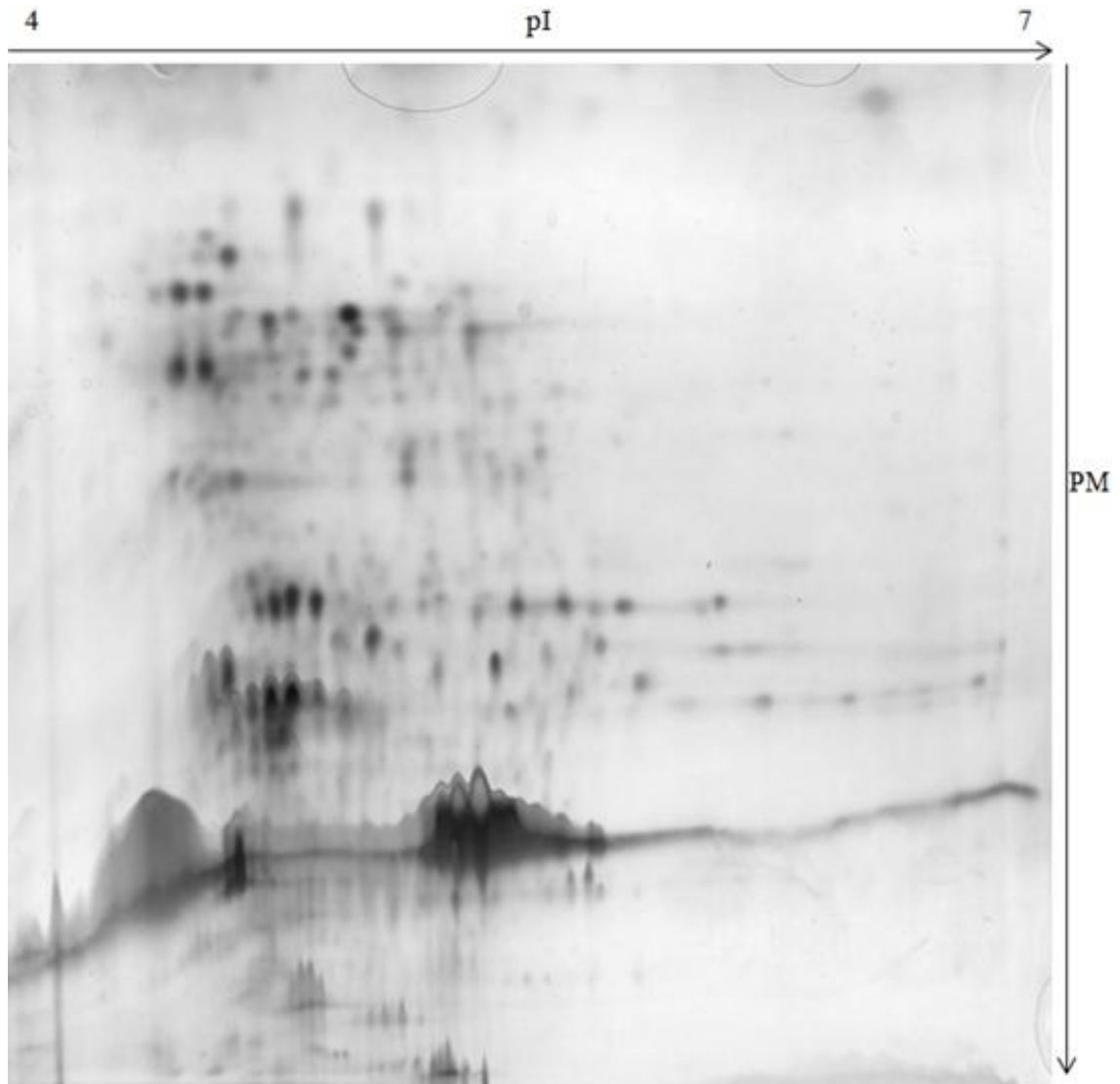
### V.1 Gels à deux dimensions

#### V.1.1 Electrophorèse bidimensionnelle (2D)

L'électrophorèse bidimensionnelle telle qu'elle est utilisée aujourd'hui, a été décrite pour la première fois en 1975 (O'Farrell 1975, Klose 1975). Elle permet la séparation des protéines selon deux propriétés physicochimiques: le point isoélectrique (pI) et la masse moléculaire des protéines, combinant ainsi deux principes de séparation électrophorétiques (**Figure 3**). L'IEF peut être réalisé en gel de polyacrylamide ou d'agarose, gel natif (BN-PAGE) ou avec dénaturation à l'urée.

La préparation de l'échantillon en vue d'une analyse protéomique est un travail délicat. L'extraction de protéines à partir d'un mélange complexe est réalisée à l'aide de tampons appropriés et dépend de la nature des protéines qui font l'objet de l'étude (protéines cytosoliques, membranaires, nucléaires...). L'objectif étant de maintenir les protéines extraites en solution en préalable à leur séparation. Les tampons d'extraction sont ainsi constitués, sur une base saline (Tris, Hepes), de mélanges d'agents réducteurs (DTT, TBP...), chaotropes (Urée, Thiouré), de détergents (SDS,

CHAPS, Triton X-100 ...), et ceci dans des proportions variables. Ils sont généralement supplémentés d'inhibiteurs de protéases et leur pH est ajusté de manière appropriée.



**Figure 3.** Exemple de gel 2D (IEF/SDS-PAGE) coloré au nitrate d'argent. L'IEF a été réalisée sur une bandelette (IPG-strip de 11cm, pH 4-7) de gel de polyacrylamide. (D'après nos travaux en collaboration avec Dr. Mauro. S, concernant l'étude des protéines totales extraites des cals de la variété Djenah Khetifa de blé dur en condition normale).

Le choix du colorant permettant de révéler les protéines sur le gel conditionne la sensibilité de la technique. Parmi les colorants les plus fréquemment utilisés, pour la visualisation des gels 2D-PAGE, sont le bleu de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue *G-250* et *R-250*) et le nitrate d'argent (**Figure 3**). La coloration organique au bleu de Coomassie présente une bonne linéarité et est compatible avec la spectrométrie de

masse mais souffre d'une sensibilité limitée. La coloration au nitrate d'argent est plus sensible mais n'est pas linéaire et pose des problèmes de compatibilité avec la spectrométrie de masse.

Des agents fluorescents sont également utilisés comme le couple Cys3/Cys5 et le ruthénium (SYPRO Ruby) (Rabilloud et al. 2001) dont les sensibilités respectives sont de 0.125 ng et 1 ng. Les techniques de coloration en fluorescence présentent une bonne linéarité et une bonne compatibilité avec la spectrométrie de masse. Cependant, cette technique est beaucoup plus onéreuse. Une autre limitation est le côté chronophage de la mise au point de cette stratégie selon les échantillons à traiter, particulièrement pour l'étape de préparation d'échantillon.

D'autres techniques de détection, moins classiques, ont aussi été développées, parmi lesquelles, les colorations négatives par précipitation de métaux lourds, qui sont sensibles, douces mais non linéaires, la plus connue étant la coloration au Zinc-Imidazole (Ortiz 1992).

L'analyse des résultats est hautement facilitée par l'utilisation de logiciels d'analyse d'image (Image Master Platinum (GeneBio/GE Healthcare-Amersham Biosciences), PD-Quest (Bio-Rad), Phoretix et Progenesis (NonLinear Dynamics) et Z3 (Compugen) et actuellement par l'identification des protéines par spectrométrie de masse après protéolyse, ce qui nécessite l'interrogation de banques de données spécialisées.

La technique d'électrophorèse bidimensionnelle (2D) présente une bonne résolution mais elle est peu, voire mal adaptée à la séparation des protéines de haut poids moléculaire, des petits peptides, des protéines hydrophobes ou basiques, le plus souvent les spots colorés ne correspondent pas à une seule protéine (Santoni et al. 2000, Rabilloud 2001).

Depuis sa mise au point en 1975, la technique 2D a connu des apports non négligeables. L'un d'entre eux a été l'utilisation de gel d'isoélectrofocalisation à gradient de pH immobilisé (IPG) (Görg et al. 1988), qui permet d'une part, de stabiliser le gradient pH et donc d'augmenter la reproductibilité des gels et, d'autre part d'augmenter la capacité de chargement des gels.



### V.1.2 Approche protéomique 2D-DIGE

Une autre variante de l'électrophorèse bidimensionnelle ; l'électrophorèse bidimensionnelle différentielle (DIGE), ce système améliore la reproductibilité de l'analyse en comparant deux profils électrophorétiques 2D sur un même gel au moyen d'un marquage spécifique des lysines par fluorescence (Unlu et al. 1997).

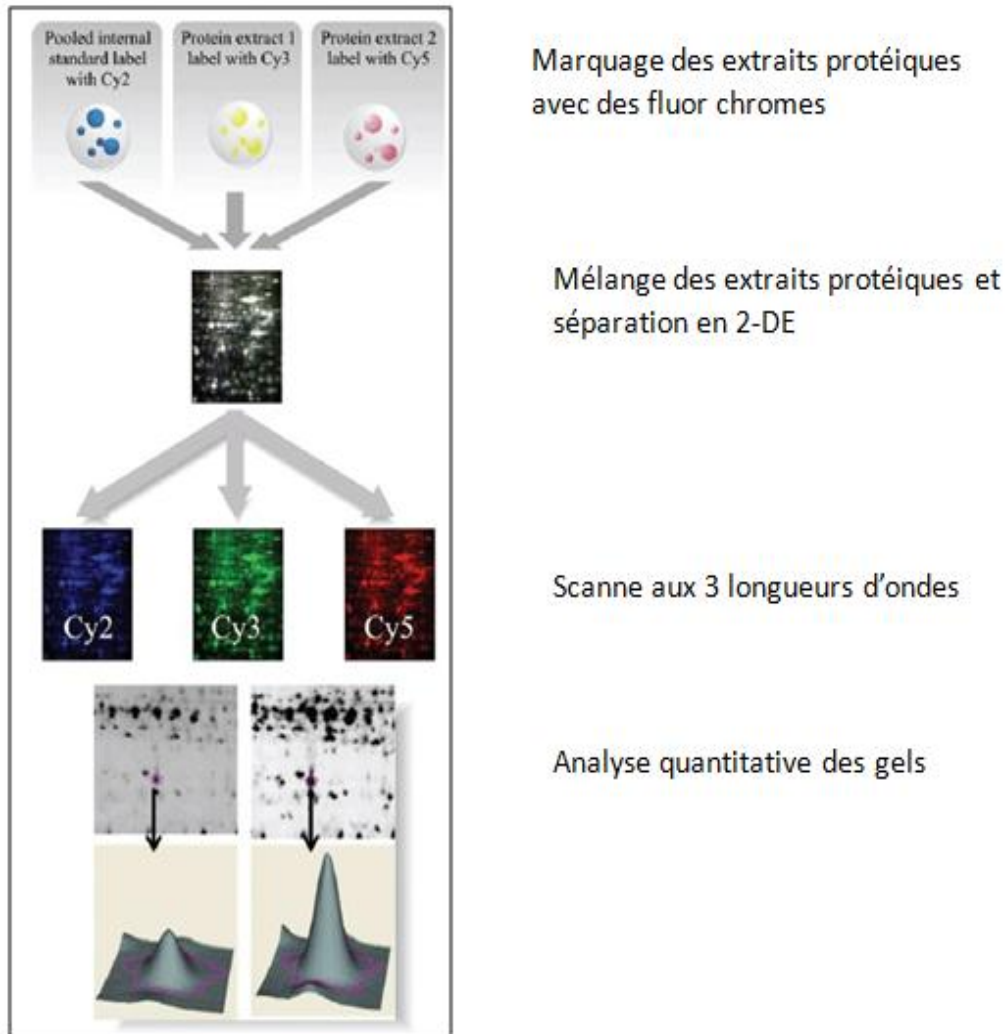
La méthode repose sur le marquage d'échantillons à l'aide de trois dérivés de la cyanines (CyDyes -2, -3 et -5), qui ont la particularité d'avoir des spectres de fluorescences distincts (Mujumdar et al. 1993). Les cyanines permettent ainsi de faire migrer plusieurs échantillons dans le même gel, l'un marqué avec Cy2, le deuxième avec Cy3, voire un troisième avec Cy5 (**Figure 4**).

Les échantillons à comparer sont ensuite mélangés en quantités égales et co-séparés sur un seul et unique gel d'électrophorèse bidimensionnelle haute résolution. Ce gel est ensuite analysé sur un scanner moléculaire (Typhoon 9410) grâce au logiciel eCyder™ dans le but d'identifier et de quantifier l'expression des protéines différenciellement exprimées entre les échantillons d'intérêt.

Les protéines peuvent être directement identifiées par spectrométrie de masse à partir du gel fluorescent ou à partir d'un gel similaire coloré par une technique conventionnelle (Unlu et al. 1997).

### V.1.3 Approche protéomique DAGE

La technique DAGE (Dialysis-Assisted Gel Electrophoresis) : électrophorèse en gel assistée par dialyse a été proposée par Danos et Svinartchouk (2006) afin de palier certaines limites de la 2D classique. Elle a pour objectif d'améliorer la reproductibilité en éliminant les différences locales de forces ioniques et pH se produisant au cours de la séparation, notamment au cours de la première dimension. L'IEF est réalisée sur 2 strips IPG (Immobiline pH Gradient) séparés par une membrane de dialyse. L'inconvénient de cette innovation est que l'amélioration de la reproductibilité n'a lieu qu'au cours de l'IEF.



**Figure 4** Représentation schématique du principe de la technique d'électrophorèse bidimensionnelle différentielle 2D-DIGE (Diez et al. 2010).

#### V.1.4 Approche protéomique D-2DE

Dans notre travail, nous présentons une nouvelle stratégie d'analyse protéomique, s'affranchissant partiellement de certaines des limitations technologiques de la 2D classique, la stratégie retenue consiste en l'exécution d'un gel en deux dimensions (Tris tricine SDS-PAGE/ Tris glycine SDS-PAGE), résultant en une nouvelle méthode d'analyse que nous avons nommée « électrophorèse diagonale bidimensionnelle (D-2DE) », la technique sera présentée plus en détail dans les sections qui suivent.

## Chapitre 11

Sélection *in vitro* pour la tolérance au stress hydrique  
chez le blé dur (*Triticum durum* Desf).

## I. INTRODUCTION

La céréaliculture est une composante importante de l'économie agricole et alimentaire en Algérie. Toutefois, la production moyenne actuelle du blé dur en Algérie demeure nettement en deçà des potentialités et des besoins du pays. Cette faiblesse de production était toujours liée aux effets du stress hydrique qui se fait ressentir de manière très importante depuis la dernière décennie (Attab et Brinis 2012).

L'amélioration génétique du blé dur des zones sèches reste basée sur la recherche d'une meilleure tolérance aux stress abiotiques, pour adapter la plante à la variabilité du milieu de production (Amkrane 2001). La sélection pour la tolérance à la sécheresse sous des conditions naturelles requiert des ressources considérables et nécessite également des conditions environnementales favorables pour une expression phénotypique efficacement reproductible de la tolérance à la sécheresse attribuée au génotype. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire d'opter pour des méthodes de sélection précoces, simples, rapides et efficaces (Kim et al. 2001).

La maîtrise de la culture *in vitro* rend aisé le screening sous des conditions plus contrôlées, vu que plusieurs études montrent que l'application d'agents sélectifs à des cultures cellulaires apporte des informations intéressantes relatives quant à la tolérance à divers stress aussi bien biotiques que abiotiques (Bertin et al. 1995, Baraket et Abdelattif 1996, Jain 1997, Zalc et al. 2004). D'autre part, les similitudes de l'effet du stress hydrique induit en conditions *in vitro* ou *in vivo* suggèrent que l'approche *in vitro* peut être utilisée comme solution alternative pour l'étude de l'effet général du stress hydrique sur la croissance et le développement des plantes (Diouri 2013).

La présente étude a pour objectif d'évaluer la capacité des embryons matures de trois génotypes de blé dur à la callogenèse, l'embryogène somatique et à la régénération de plantules entières sous l'effet du polyéthylène glycol simulant les conditions de stress hydrique.

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### II.1 Matériel végétal

Les trois variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) utilisées dans la présente étude nous ont été fournies gracieusement par l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) de Constantine. Leurs principales caractéristiques sont les suivantes :

- La variété Djenah Khetifa, variété population sélectionnée depuis les premiers botanistes, résiste à différentes maladies et présente une bonne tolérance à la sécheresse. Elle présente une bonne productivité avec une bonne qualité semoulière.
- La variété Oued Zenati provient de la station de Guelma 1936.H, variété tardive avec une bonne qualité semoulière, elle est assez bonne tolérance à la sécheresse.
- La variété Waha provient du Centre Internationale d'Amélioration du maïs et du blé du Mexique (CIMMYT). Elle a été introduite en Algérie au niveau de l'Institut Technique de Grandes Cultures (ITGC) de Sétif par l'intermédiaire du Centre Internationale de la Recherche Agricole en Zones Arides (ICARDA). Waha est une variété précoce, sensible à la sécheresse et aux gelées printanières.

### II.2 Induction de la callogenèse et conditions de culture

La désinfection est une étape clé pour réussir les cultures *in vitro*. Les grains sont désinfectés par passage 60 secondes dans l'éthanol 70° et 20 minutes dans l'hypochlorite de calcium 7 %, puis débarrassés de l'hypochlorite par 5 rinçages successifs à l'eau distillée stérile.

Les cals sont initiés à partir d'embryons matures et cultivés sur milieu MS (Murashig et Skoog 1962), additionné à 2 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D, 30g de saccharose et 2,5 g l<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma-Aldrich). Le pH du milieu a été ajusté à 5,7 avant autoclavage à 110 ° C pendant 30 min. Les cultures sont incubées à 25 ± 1°C pendant 30 jours avec une photopériode de 16 h.

### II.3 Sélection au niveau cellulaire

Les polyéthylènes glycols, avec la formule générale  $\text{HCH}_2(\text{OCH})_n\text{OH}$ , sont des polymères neutres, stables, non toxiques et hydrosolubles. Ils sont disponibles dans une large gamme de poids moléculaires et sont utilisés pour simuler un stress hydrique d'une manière semblable au séchage du sol. Ils rendent ainsi l'eau peu accessible à la cellule (Heyser et Nabors 1981, Ranjbarfordoei et al. 2001, Matheka et al. 2008, Meng et al. 2016).

Dans notre expérience, nous avons appliqué deux niveaux de stress induits par le PEG 6000 (Merck, Germany); 10% (SI) et 20% (SII) générant des niveaux de stress osmotique respectifs de l'ordre de  $-0,49\text{MPa}$  et  $-1,2\text{MPa}$ . Le stress osmotique est appliqué en phase d'initiation des cals.

Les pressions osmotiques ont été déterminées à l'aide d'un osmomètre à pression de vapeur (Fiske® osmometer).

La soumission graduelle des cellules végétales à un stress est inefficace dans la sélection des variants tolérants (Lutts et al. 1996). Ceci parce que les cellules non tolérantes peuvent entreprendre une adaptation par épigénie au gradient du stress imposé (Lutts et al. 1996). Par conséquent cette adaptation voile la sélection des génotypes porteurs de la tolérance d'origine génétique (Lutts et al. 1996) ; c'est la raison pour laquelle notre choix s'est porté sur l'application brutale du stress hydrique.

### II.4 Régénération des plantes et acclimatation

Les cals embryogènes survivants sur les milieux contenant 0%, 10% et 20% de PEG 6000 ont été transférés dans des tubes à essai contenant le milieu de base MS (Murashig et Skoog 1962) additionné à  $1.0\text{ mg l}^{-1}$  de BAP,  $0.5\text{ mg l}^{-1}$  d'AIA,  $30\text{ g l}^{-1}$  de saccharose et  $2\text{ g l}^{-1}$  de Phytigel. Les cultures ont été maintenues sous une photopériode de 16 heures, à température de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Les vitroplants fortement enracinés sont débarrassés soigneusement du milieu de culture, puis transférés dans des pastilles de tourbe (système Jiffy) contenant un

mélange de terre et de sable (2: 1) puis placés à l'intérieur de dessiccateurs (**Figure 5**) pendant une à deux semaines avant d'être acclimatés en serre.



**Figure 5** : Transfert des vitroplants dans des pastilles de tourbe (Système Jiffy).

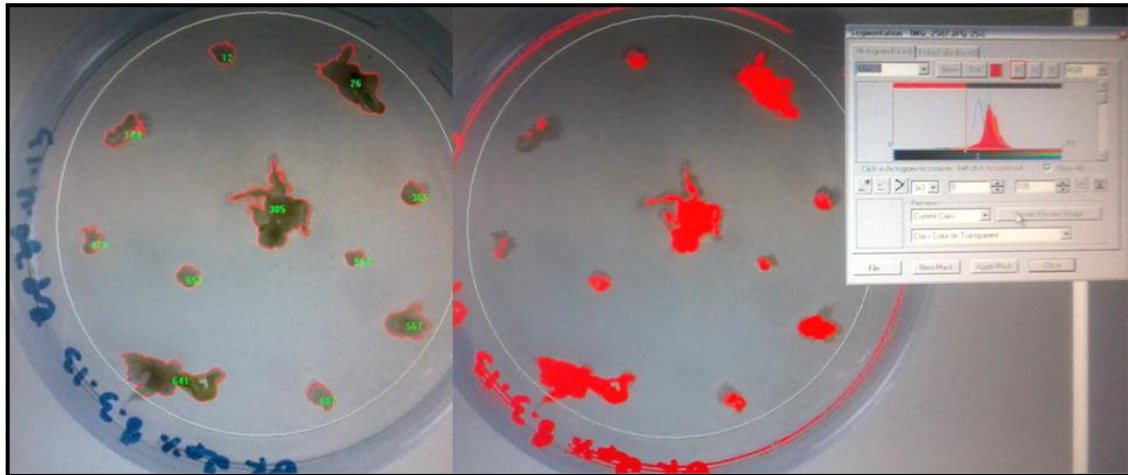
## II.5 Variables mesurées

Un test efficace pour identifier les géniteurs tolérants au stress hydrique est indispensable pour le succès de tout programme visant ce type d'amélioration. Plusieurs critères sont donc considérés afin de mettre en évidence l'effet du stress hydrique sur l'induction et le déroulement du processus de la callogenèse et de la régénération.

**-Temps d'initiation de cals (TIC):** Ce paramètre consiste à mesurer la durée nécessaire (jours) entre l'inoculation et l'apparition du premier cal, l'observation est faite sous binoculaire.

**-Efficacité de la callogenèse (EC):** La réactivité des embryons représente le nombre total d'embryons matures produisant des cals par rapport au nombre total d'embryons matures inoculés. La mesure est effectuée après 30 jours de culture.

**-Surface de croissance des cals (SCC):** La prolifération des cals a été estimée par mesure de la surface moyenne ( $\text{mm}^2$ ) qui représente la somme totale des surfaces de cals mesurées au 7<sup>ème</sup>, 15<sup>ème</sup> et 30<sup>ème</sup> jours par le logiciel Image Pro Plus (Delporte et al. 2001, Kacem et al. 2016) (**Figure 6**).



**Figure 6 :** Mesure de la surface des cals par le logiciel Image Pro Plus (Delporte et al. 2001, Kacem et al. 2016).

**-Tolérance relative (TR):** Ce paramètre est mesuré selon la formule suivante: (Surface de croissance des cals cultivés sous stress hydrique / Surface de croissance des cals en absence de stress hydrique) x 100 (Abdelsamad et al 2007).

**-Production de cals embryogènes (PCE):** Ce paramètre est mesuré selon la formule suivante : (Nombre de cals embryogènes / Nombre total de cals cultivés) x 100

**-Régénération de Plantes (RP):** Ce paramètre est mesuré selon la formule suivante : (Nombre de plantes régénérées / Nombre totales de cals embryogènes) x 100

**-Efficacité de la régénération (ER):** Ce paramètre est mesuré selon la formule suivante : (Nombre de plantules obtenues / Nombre totale d'embryons matures cultivés) x 100.

## II.6 Analyse statistique

Les données ont été standardisées à cinq répétitions, à raison d'une boîte de Pétri par répétition et 20 embryons par boîte.



Les données quantitatives ont été traitées par les logiciels MINITAB17, SPSS20 et XLSTAT2015. Les tests statistiques ont été évalués à partir du test de Fisher noté F et du seuil de probabilité qui lui est associé, noté p. Les moyennes des variables mesurées ont été groupées par le test de NEWMAN-KEULS au seuil de 0.1 %, 1% et 5%. La classification hiérarchique (Cluster) a été réalisée en utilisant la méthode de Ward et la distance euclidienne (Morey et al. 1983, Vachon et al. 2005).

### **III. RÉSULTATS ET DISCUSSION**

#### **III. 1. Effet du stress hydrique induit par le PEG sur les variables mesurées.**

Des différences significatives ont été observées entre les génotypes, les niveaux de stress hydrique (0%, 10% et 20%) et leurs interactions pour toutes les variables mesurées, indiquant une grande variabilité génétique en réponse au stress hydrique simulé par le PEG (**Annexe 1**).

##### **III.1.1 Effet du stress hydrique sur le temps d'initiation de cals**

Les scutellums des embryons matures mis en culture commencent par se gonfler légèrement dès les premières 24 heures d'incubation. Les embryons matures laissent apparaître un début de callogenèse représenté par un amas de cellules indifférenciées, de couleur blanchâtre tirant vers le jaune pâle.

Sur les milieux de contrôles, les variétés Djenah Khetifa et Oued Zenati commencent à initier le cal les premières (2 jours en moyenne), puis la variété Waha qui met un peu plus de temps (5 jours en moyenne) (**Tableau 3**).

Nos résultats correspondent aux travaux de Bi et Wang (2008) réalisés sur des embryons matures de blé dur et cultivés sur le milieu MS additionné à 2 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D où l'initiation des cals a eu lieu au bout de 2 jours en moyenne.

Özgen et al. (1998) rapportent 2 à 3 jours avant l'apparition du premier cal sur des embryons matures de blé tendre. Yu et Wei (2008) rapporte 3 à 4 jours avant l'apparition de cals sur des embryons matures de blé tendre. Cependant, pour Özgen

et al. (1996) l'initiation de la callogenèse a eu lieu au bout de 10 à 11 jours sur des embryons matures de blé dur cultivés sur 8 mg l<sup>-1</sup> de 2.4-D.

**Tableau 3.** Temps moyen (jours) de l'induction des cals à partir d'embryons matures de blé dur soumis à différentes concentrations de PEG.

Variété	Concentration PEG			Moyenne
	0%	10%	20%	
Djenah Khetifa	2.0±0.0f	3.0±0.2e	5±1c	3.3±1.3
Oued Zenati	2.0±0.14f	4.0±0.5d	5.0±0.2c	3.6±1.3
Waha	5.0±0.5c	7.0±0.5b	9.0±0.5a	6.8±1.7
Moyenne	2.9±1.4	4.5±1.7	6.2±1.9	-

Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas statistiquement différentes au seuil de 5%.

L'augmentation de la concentration du PEG s'accompagne d'un prolongement statistiquement significatif de la durée d'induction de cals et plus particulièrement pour la variété Waha. La variété Djenah Khetifa ainsi que la variété Oued Zenati semblent les moins affectées par les niveaux de stress PEG. La séparation des groupes homogènes révèle que ces deux dernières variétés présentent des comportements assez proches dans toutes les conditions de culture.

En générale, les premières manifestations de la callogenèse sont perceptibles au bout de 4 à 6 jours en moyennes sur milieux contenant 10% et 20% de PEG, respectivement.

Il semble que l'aptitude à la callogenèse diffère selon le génotype mais aussi selon le niveau de stress impliqué.

### III.1.2 Effet du stress hydrique sur l'efficacité de la callogenèse

Les cals sont des amas cellulaires indifférenciés, qui peuvent être utilisés comme une source de matériel pour des études biochimiques et moléculaires, ainsi pour la production de suspensions cellulaires, de protoplastes, de l'organogenèse, de l'embryogenèse somatique et de métabolites secondaires (Hall 1991).

En absence de stress, le milieu MS contenant  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2,4-D a favorisé l'optimisation de l'induction de callogenèse chez la totalité des embryons matures cultivés (**Tableau 4**). Ces résultats mettent en évidence l'efficacité du milieu employé pour callogenèse, ainsi que la grande aptitude des embryons matures de blé dur à la callogenèse. Nos observations sont en accord avec les travaux de Alikina et al. (2016). Ces auteurs rapportent des taux élevés de callogenèse à partir d'embryons matures et / ou immatures de blé dur.

**Tableau 4.** Taux moyen de l'efficacité de la callogenèse de trois variétés de blé dur soumises à différentes concentrations de PEG.

Variété	Concentration PEG			Moyenne
	0%	10%	20%	
<b>Djenah Khetifa</b>	100±0 a	84.0±1b	80±1.0d	88.0±8.9
<b>Oued Zenati</b>	100±0a	82.56±1.2c	79.4±0.5d	87.3±9.4
<b>Waha</b>	100±0a	77.4±2e	57.0±1f	78.13±18.2
<b>Moyenne</b>	100±0	81.32±3.2	72.13±11.1	-

Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas statistiquement différentes au seuil de 5%.

D'autre part, les résultats illustrés en tableau 4 montrent que le taux d'induction de cals diminue progressivement et significativement avec l'augmentation de la concentration en PEG pour les trois variétés. La variété Waha présente une moindre sensibilité de réponse à la callogenèse sous stress hydrique comparativement à Djenah Khetifa et à Oued Zenati qui se montrent plus réactives.

Des travaux similaires ont été menés par Nawaz et al. (2013), ces auteurs ont utilisés plusieurs concentrations de PEG 6000 allant de 5% à 20% pour l'évaluation de l'effet du stress hydrique *in vitro* sur une variété de blé tendre. Les résultats obtenus ont indiqués que l'efficacité de la callogenèse est significativement réduite avec l'augmentation de la concentration de PEG.

Mahmood et al. (2012), rapportent que l'incubation de cals de blé provenant d'embryons immatures pendant quatre semaines sur milieu de sélection contenant du PEG 6000, induisant un stress osmotique de -0,9 MPa, semble sub-létale pour les

cellules non tolérantes et permet la survie que des cellules tolérantes (taux de survie 26,62%) avec un potentiel de régénération raisonnable.

Elyasi et al. (2012), rapportent qu'une diminution dans le taux de callogenèse est une réponse typique des explants de diverses céréales lorsque celles-ci sont soumises au stress hydrique simulé par le PEG. Cependant, si une variété ne présente qu'un faible taux de callogenèse, cela implique qu'un nombre élevé doit être mis en culture pour un résultat incertain. De tels génotypes se prêtent donc assez mal à la sélection *in vitro*.

### **III.1.3 Effet du stress hydrique sur la surface de croissance des cals et tolérance relative**

Les images numériques des cals ont été analysées par le logiciel Image Pro Plus. Cette évaluation non invasive a déjà prouvé son efficacité et son utilité en permettant de suivre l'évolution de la croissance des cals jusqu'au stade régénération sans interféré avec son environnement ou son développement (Delporte et al. 2001, Kacem et al. 2016).

L'exposition à des concentrations croissantes du PEG 6000 a induit une réduction très significative de la surface des cals (**Tableau 5**). En effet, cette réduction est d'autant plus importante que la concentration en PEG 6000 augmente dans le milieu. Ces résultats montrent que le PEG 6000 peut être utilisé pour créer un stress hydrique *in vitro* (Gulati et Jaiwal 1994, Hsissou et Bouharmont 1994, Ranjbarfordoei et al. 2001, Matheka et al. 2008, Meng et al. 2016)

Sur le milieu contenant 10% de PEG, le taux de réduction atteint 24.45% pour la variété Djenah Khetifa, 32.16% pour la variété Oued Zenati et 42.62 % pour la variété Waha. La réduction est d'autant plus marquée lorsque le niveau de stress PEG est plus élevé, particulièrement pour cette dernière qui enregistre un taux de réduction de 77.93%. Chez la variété Oued Zenati le taux de réduction est de l'ordre de 47.49%. Cependant, le taux de réduction le moins élevé est enregistré chez la variété Djenah Khetifa avec 37.05% (**Tableau 5**).

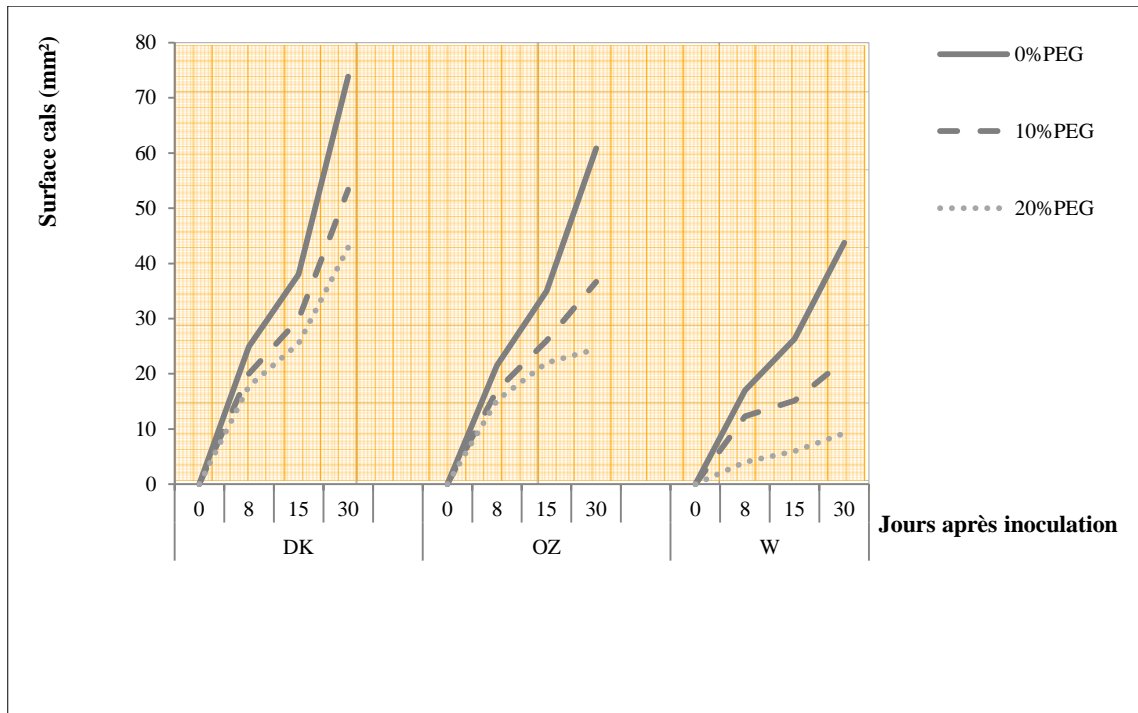
La diminution de la croissance des cals est probablement due à la réduction du volume cytosoliques et vacuolaires. Un potentiel osmotique externe réduit est un facteur limitant de la croissance vu que les cellules deviennent incapables d'absorber l'eau et les éléments nutritifs, ce qui provoque l'inhibition de la croissance (Bartels and Sunkar, 2005).

**Tableau 5.** Surfaces moyennes des cals (mm<sup>2</sup>) des génotypes de blé dur mesurées après 30 jours de culture sur différents niveaux de stress PEG.

Variété	Concentration PEG			Moyenne
	0%	10%	20%	
<b>Djenah Khetifa</b>	45.56±3.1a	34.42±2.45c	28.68±1.2d	36.22±7.57
<b>Oued Zenati</b>	39.12±3.2b	26.54±3.2d	20.54±2.1e	28.74±8.44
<b>Waha</b>	29.00±1.4d	16.64±0.7f	6.40±0.6g	17.35±9.61
<b>Moyenne</b>	37.89±7.48	25.87±7.84	18.54±9.6	-

Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas statistiquement différentes au seuil de 5%.

La dynamique de croissance des cals mesurée au 7<sup>ème</sup>, 15<sup>ème</sup> et 30<sup>ème</sup> jours donne une vue générale de l'effet du PEG sur la croissance des cals en fonction du temps (**Figure 7**). Cette dynamique se traduit par une réduction de la vitesse de division cellulaire dès la première semaine culture pour les trois génotypes étudiés. Cependant, il est intéressant de noter que certains cals continuent à croître sous conditions de stress hydrique, et particulièrement sous le niveau de stress élevé. Ces cals sont considérés comme tolérants au stress hydrique.



**Figure 7** Cinétique de croissance des cals (mm<sup>2</sup>) des génotypes de blé. Les surfaces des cals sont mesurées aux 7<sup>ème</sup>, 15<sup>ème</sup> et 30<sup>ème</sup> jours sous différentes concentrations de PEG.

Les données des surfaces moyennes des cals ont également servi pour le calcul de la tolérance relative afin de fournir une valeur propre permettant d'établir des comparaisons entre les génotypes en éliminant ainsi les différences inhérentes associées au taux de croissance de chaque génotype en réponse au stress hydrique (Abdelsamad et al. 2007).

D'après le tableau 6, nous constatons que la variété Djenah Khetifa présente une meilleure adaptation au stress hydrique puisqu'elle enregistre les valeurs les plus élevées, tandis que la variété Waha a enregistré les plus faibles valeurs, la variété Oued Zenati enregistre des valeurs intermédiaires.

Nos résultats montrent que les variétés Djenah Khetifa et Oued Zenati sont les mieux adaptées au stress hydrique que Waha, ce qui indique la supériorité de ces génotypes pour la tolérance au stress hydrique *in vitro*. D'autre part, la présence du PEG dans le milieu de croissance peut améliorer la tolérance au stress hydrique en permettant la prolifération cellulaire Bressan et al. (1981).

**Tableau 6.** Tolérance relative des génotypes de blé dur mesurée après 30 jours de culture sur différents niveaux de stress PEG.

Variété	Concentration PEG		Moyenne
	10%	20%	
Djenah Khetifa	75.77±6.8a	63.13±4.1bc	69.45±8.52
Oued Zenati	68.25±9.6ab	52.76±6.5d	60.51±11.25
Waha	57.54±4.6cd	22.18±3.1e	39.86±19.01
Moyenne	67.18±10.3	46.02±18.53	-

Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas statistiquement différentes au seuil de 5%.

Une croissance réduite en présence de PEG dans le milieu a été observée chez plusieurs espèces, parmi lesquelles on cite le blé dur (Hsissou 1994, Bouiamrine et al. 2012) le riz (Biswas et al. 2003) et la tomate (Begum et al. 2011). Comme la croissance de la plante est le résultat de division et de prolifération cellulaire, le stress hydrique peut restreindre directement la croissance en ralentissant les deux processus (Levitt 1980). Selon Farooq et al. (2006), le processus le plus sensible pouvant être affecté par le déficit hydrique est la croissance cellulaire.

### III.1.4 Effet du stress hydrique sur la production de cal embryogène

Les cals embryogènes et non embryogènes se distinguent selon leur aspect morphologique; les cals embryogènes sont de structure nodulaire, de couleur crème blanchâtre (**Figure 8.A**), tandis que les cals non embryogènes sont translucides et d'un aspect hyperhydrique, spongieux et duveteux (**Figure 8.B**) (Delporte 2001, Gandonou 2005).

Dans notre étude, le brunissement des cals suite à l'effet du PEG montre que cette réponse au niveau cellulaire est une réaction de sensibilité commune aux génotypes étudiés (**Figure 8.C**). Cette modification témoigne donc de la sensibilité des cals face au stress hydrique (Sharma et al. 2016), et ne peut constituer un critère de criblage. Cependant, les structures embryogéniques observées sont les plus intéressantes vues leur capacité à régénérer des plantes.

D'après le tableau 7, on constate qu'en moyenne les taux les plus élevés de cals embryogènes ont été obtenus avec les milieux contenant 10% de PEG et les milieux de contrôle. En effet, sur ce dernier, les trois génotypes ont enregistré des taux élevés de cals embryogènes, avec un taux moyen de 73,7%. Les variétés Waha et Djenah Khetifa forment le plus de cals embryogènes, enregistrant des taux respectifs de 81% et 79%. Cependant, la variété Oued Zenati paraît comme la moins embryogène et enregistre un taux moyen de 61% (**Tableau 7**).

**Tableau 7.** Taux moyen de production des cals embryogènes de trois variétés de blé dur soumises à différentes concentrations de PEG.

Variété	Concentration PEG			Moyenne
	0%	10%	20%	
<b>Djenah Khetifa</b>	79.2 ± 3.9b	83.0 ± 2.7ab	56.0 ± 4.2d	72.73 ± 12.8
<b>Oued Zenati</b>	61.0 ± 4.2c	58.0 ± 2.7cd	29.0 ± 2.2e	49.33 ± 15.2
<b>Waha</b>	81.0 ± 4.2ab	84.0 ± 2.2a	23.0 ± 2.7f	62.67 ± 29.21
<b>Moyenne</b>	73.7 ± 10.1	75 ± 12.7	36 ± 15.14	-

Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas statistiquement différentes au seuil de 5%.

Nous avons noté une légère stimulation de l'embryogenèse pour la concentration de 10% en PEG (**Tableau 7**). Les cals présentaient toutes les apparences typiques caractéristiques d'un cal embryogène (**Figure 8.A**) (Delporte et al. 200, Gandonou 2005).

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Heringer et al. (2013) qui rapportent que le traitement au PEG améliore la maturation des embryons somatiques et leur conversion en plantules de manière semblables à celles des embryons issus de grains.

L'effet bénéfique du PEG a été évoqué pour la première fois chez l'épinette blanche (Attree et al. 1991). Il a été démontré que les différents génotypes réagissent de différentes manières. Moon et Park (2008) ont rapporté une augmentation significative de l'embryogenèse. En effet, le taux moyen d'embryons somatiques avait doublé, en doublant la concentration de PEG dans le milieu. D'autre part, Stasolla et al. (2003) ont



reporté que l'addition d'une concentration de PEG supérieur à 10% dans le milieu de maturation peut améliorer le nombre et la qualité des embryons produits.

Toutes les variétés réagissent ensuite à l'augmentation de la concentration en PEG (20%) dans le milieu de culture, par une diminution progressive et hautement significative des capacités embryogènes. Cependant, malgré les conditions sévères du milieu, les variétés Djenah Khetifa et Oued Zenati maintiennent des potentialités embryogènes supérieures enregistrant des taux réduction de l'ordre de 23% et 32%, respectivement. Alors que la variété Waha devient la moins embryogène (58%), puisque plus de la moitié des calcs formés sont non embryogènes.

Ce résultat confirme que le niveau de stress appliqué affecte le développement d'embryons somatiques et que le pouvoir embryogène est dépendant du génotype initial (Özgen et al. 1998, Biswas et al. 2002).

### **III.1.5 Effets du stress hydrique sur le potentiel de régénération**

Le maintien à long terme de la capacité de régénération des plantules est indispensable dans une optique d'amélioration variétale. Le choix de génotypes qui pourraient être ultérieurement améliorés dépendra donc principalement de leur aptitude à régénérer des plantes après plusieurs mois de culture. C'est en effet durant cette période que la variation somaclonale produira surtout ses effets.

Après 4 semaines de sélection sur milieux contenant différentes concentrations de PEG, les calcs embryogènes ont été repiqués sur milieu de régénération. Ces calcs montrent des structures verdâtres (**Figure 8.E**) et développent de petites pousses et racines simultanément à leur surface (**Figure 8.F**). Après une période minimale de 60 jours de culture sur milieu de régénération, des plantes entières ont été développées (**Figure 8.G**).

Les taux de régénération ont été estimés pour différentes concentrations de PEG, les résultats sont illustrés dans le tableau 8. Le cal embryogénique s'est régénéré à une fréquence très élevée sur le milieu de contrôle, particulièrement pour les deux variétés Djenah Khetifa (60.7%) et Waha (58.10%) qui semblent avoir des compétences assez

semblable en absence de stress. La variété Oued Zenati a enregistré un taux moyen d'environ 50%. Cependant, sous l'effet du PEG 10% et 20% la variété Waha perd une plus grande partie de son pouvoir de régénération et semble plus proche de la variété Oued Zenati. On remarque clairement que la concentration de 20% de PEG provoque une chute importante chez Waha principalement en donnant le moins de régénérants (**Tableau 8**).

**Tableau 8.** Taux moyen de la régénération de plantes des génotypes de blé dur.

Variété	Concentration PEG			Moyenne
	0%	10%	20%	
Djenah Khetifa	60.7±5a	46.7±6.2c	34.2 ±12.7d	47.25±13.8
Oued Zenati	49.2±5.4bc	32.7±10.7d	17.3±1.5 <sup>e</sup>	33.10±16.23
Waha	58.1±3.6ab	34.5±3.0d	8.0±10.9 <sup>e</sup>	33.55±22.13
Moyenne	56.04±6.73	38.01±9.38	19.86±15.73	-

Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas statistiquement différentes au seuil de 5%.

La mesure de l'efficacité de régénération (**Tableau 9**) donne une estimation globale de l'aptitude d'un génotype à régénérer des plantules à partir des embryons matures. D'une manière générale, on note une réduction significative du potentiel de régénération des cals issus de milieux contenant le PEG à 10% et 20% des trois variétés. Cependant, les cals sélectionnés ont permis la régénération et l'acclimatation de plantes entières (**Figure 8.H**) avec des proportions variables (**Tableau 8 et 9**). La variété Djenah Khetifa maintient les potentialités régénératives les plus élevées dans toutes les conditions de cultures.

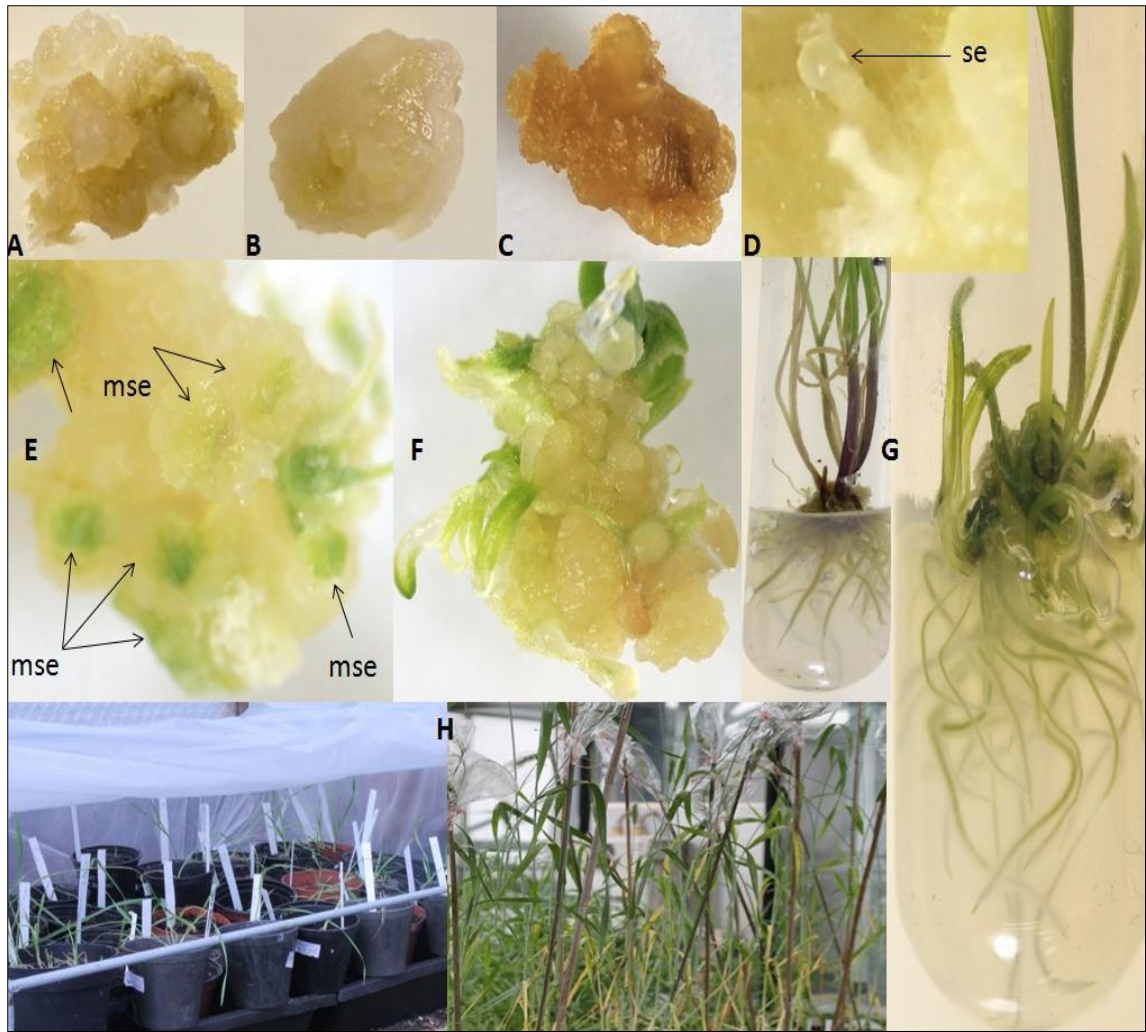
**Tableau 9.** Efficacité de la régénération des plantes des trois génotypes de blé dur.

Variété	Concentration PEG			Moyenne
	0%	10%	20%	
Djenah Khetifa	48.0±4.5a	41.0±8.9b	19.0±6.5d	36±14.3
Oued Zenati	30.0±3.5c	19.0±6.5d	5.0±3.5e	18±11.46
Waha	46.0±2.2ab	29.0±2.2c	2.0±2.7e	25.7±18.9
Moyenne	41.33±8.9	29.67±11.1	8.7±8.7	-

Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas statistiquement différentes au seuil de 5%.

Les taux d'efficacité de la régénération enregistrés dans notre étude sont assez satisfaisant comparativement à d'autres travaux comme ceux de Abdelsamad et al. (2007). Ces auteurs rapportent des taux respectifs de 37.2%, 26.1% et de 14.8% en présence de 0%, 10% et 20% de PEG. Les résultats obtenus démontrent l'efficacité du milieu de régénération utilisé, ainsi que le pouvoir régénératif des trois génotypes de blé dur étudiés. Les plantes obtenues pourraient fournir un matériel végétal présentant les caractéristiques de tolérance souhaitée.

L'ajout de PEG 6000 aux milieux de culture réduit le potentiel hydrique du milieu qui affecte la division cellulaire, conduisant à une diminution de la croissance du cal, ce qui affecte la capacité de régénération. D'autre part, la diminution dans la fréquence de régénération sur des milieux contenant un niveau de stress élevé peut être due à une altération de l'expression génique contrôlant ce caractère. Les causes de la perte du potentiel de régénération ne sont pas clairement expliqués et peuvent être la conséquence d'un dysfonctionnement ou d'une perte de substances favorisant la régénération des tissus, de changement épigénétique ou de variation somaclonale (George 1993).



**Figure 8.** Régénérations de plante à partir de calcs embryogènes et acclimatation en serre. **(A)** Cal embryogène âgé de 18 jours obtenu à partir d'embryon mature et cultivé sur milieu MS+10%PEG. **(B)** Cal non embryogène âgé de 18 jours obtenu à partir d'embryon mature et cultivé sur milieu MS en absence de PEG. **(C)** Cal non-embryogène obtenu à partir d'embryon mature et cultivé sur milieu MS en présence de 20% PEG. **(D)** Embryon somatique âgé de 20 jours. **(E)** Maturation d'embryons somatiques formés après 45 jours après la mise en culture sur milieu de régénération. **(F)** Germination des embryons somatiques. **(G)** Continuation de la régénération, formation de racines sur milieu de régénération 60 jours après la mise en culture. **(H)** Plantes matures dérivées de calcs embryogènes et acclimatation en serre. **mse**: embryon somatique mature; **se**: embryon somatique.

### III.2. Analyse des corrélations entre les variables étudiées

L'analyse des corrélations détermine les relations entre les variables prises deux à deux. Le tableau 10 répertorie toutes les valeurs des coefficients de corrélations entre les sept variables mesurées. Les coefficients significatifs (positifs ou négatifs) sont exprimés en gras.

Des corrélations significatives et positives sont obtenues entre la tolérance relative et la majorité des variables EC, SCC, PCE, RP et ER les coefficients de corrélations sont, respectivement, de 0.990, 0.897, 0.697, 0.955 et de 0.850 (**Tableau 10**).

**Tableau 10** Coefficients de corrélation de Pearson entre les différentes variables mesurées sur trois génotypes de blé dur en présence de différentes concentrations de PEG.

	EC	TIC	SCC	PCE	RP	TR	ER
EC	<b>1</b>	<b>-0.833**</b>	<b>0.878**</b>	0.638	<b>0.915**</b>	<b>0.990**</b>	<b>0.795*</b>
TIC		<b>1</b>	<b>-0.958**</b>	-0.471	<b>-0.746*</b>	<b>-0.836**</b>	-0.616
SCC			<b>1</b>	0.584	<b>0.863**</b>	<b>0.897**</b>	<b>0.752*</b>
PCE				<b>1</b>	<b>0.844**</b>	<b>0.697*</b>	<b>0.917**</b>
RP					<b>1</b>	<b>0.955**</b>	<b>0.962**</b>
TR						<b>1</b>	<b>0.850**</b>
ER							<b>1</b>

**TIC**: temps d'induction de cals, **EC**: Efficacité de la callogenèse, **SCC**: surface de croissance de cals, **PCE**: Production de cals embryogène, **TR**: Tolérance Relative, **RP**: Régénération de Plantes, **ER**: Efficacité de la régénération. \* et \*\*: significatif au seuil de 5% et 1%, respectivement. Les valeurs qui ne sont pas en gras sont non significatives.

Ces résultats suggèrent que ces caractères sont reliés. Ces caractères pourraient être utilisés comme marqueurs dans programmes d'amélioration pour la tolérance au stress hydrique chez le blé dur. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Farshadfar et al. (2015), réalisés sur le blé tendre. Ces auteurs rapportent des corrélations significatives entre la plupart des caractères et suggèrent que le paramètre de la tolérance relative pourrait être recommandé comme un indice de sélection adéquat pour le criblage de génotypes tolérants au stress hydrique.

Farshadfar et al. (2014) rapportent que les génotypes qui possèdent de bonne capacité d'induction de cals sont des génotypes qui tolèrent assez bien le stress hydrique au stade cal.

De hautes corrélations positives sont également obtenues pour la régénération des plantes et le reste des caractères; EC, SCC, PEC, TR et ER. Les coefficients de corrélations sont respectivement de 0.915, 0.863, 0.844, 0.955 et de 0.962 (**Tableau 10**) ; ceci nous conduit à suggérer que ces caractères sont contrôlés par les mêmes mécanismes.

Viertel et al. (1998) ont observé de forte corrélation entre la production de cals embryogènes et la régénération de plantes et rapportent que la capacité à produire des cals embryogènes constitue un bon indice du potentiel de régénération des plantules.

Nos résultats sont également en accord avec les travaux de Gandonou et al. (2005). Ces auteurs ont observé des différences significatives entre neuf génotypes de canne à sucre pour la capacité d'induction de cals, l'embryogenèse somatique et la régénération de plantes et indiquent que ces caractères sont dépendent du génotype.

De hautes corrélations significatives et négatives ont été notées entre TIC et les variables EC, SCC, PR, TR, les coefficients de corrélation sont respectivement de; -0.833, -0.958, -0.746 et de -0.836. Ce caractère très peu étudié, pourrait représenter un bon indicateur de tolérance au stress hydrique, le pouvoir callogène et régénératif à des stades précoces de culture *in vitro*.

L'absence de corrélation entre TIC et PCE suggère que ces variables ne sont pas liées, il semblerait qu'une variété nécessitant du temps pour induire des cals n'est pas obligatoirement une variété qui a un faible pouvoir embryogène, c'est le cas ; par exemple de la variété Waha qui nécessite plus de temps pour induire des cals mais produit le plus de cals embryogènes.

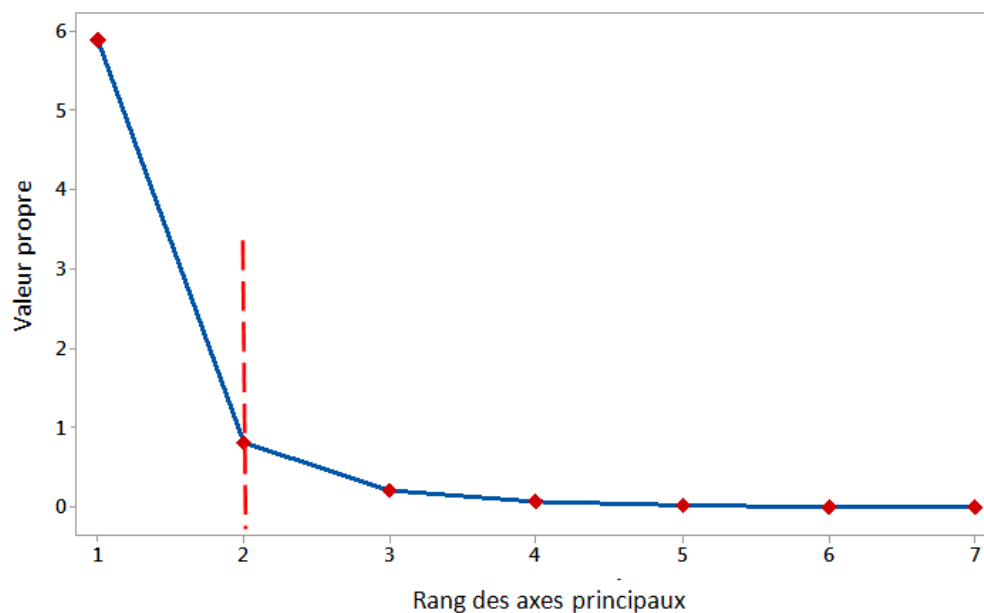
Le coefficient de faible déterminisme entre EC et PCE suggère que le processus de callogenèse et d'embryogenèse sont indépendants. L'indépendance de ces deux

caractères a été déjà signalée par Moon et al. (2008) qui ont constaté que sur 90% de cals formés, 2.5% seulement ont produit des cals embryogènes.

### III.3. Analyse en composante principale de l'ensemble des variables étudiées

Une analyse en composantes principales est tentée sur la base de la matrice des coefficients de corrélation pour mieux visualiser les relations liant les différents paramètres mesurant la tolérance et ainsi typer les différents génotypes évalués.

Le graphique des valeurs propres présente bien l'allure d'un éboulis au pied d'un escarpement, montrant l'existence d'un coude, c'est-à-dire une réduction brutale de la pente du graphique permettant ainsi de négliger toutes les composantes correspondant aux valeurs propres situées après ce coude. Ainsi, l'interprétation peut être limitée aux deux premiers axes à grand pouvoir discriminant (**Figure 9**).



**Figure 9.** Représentation graphique des valeurs propres en fonctions des rangs des axes principaux.

Le tableau 11 représente les valeurs propres en fonction des deux premiers axes, nous remarquons que le pourcentage de la variabilité obtenu est de 95.56%, ceci indique une forte variabilité.

**Tableau 11.** Valeur propre et pourcentages de variation totale expliquée par les deux premières composantes principales.

<b>Paramètres statistiques</b>	<b>CP1</b>	<b>CP2</b>
Valeur propre	5,88	0,80
Variabilité (%)	84,02	11,53
Cumulé (%)	84,02	95,56

### III.3.1 Analyse du nuage de points variables: cercle de corrélations

Les cercles de corrélations sont des graphiques visant à représenter géométriquement les variables initiales dans le nouveau système des coordonnées. Ainsi, la représentation des sept variables initiales dans l'espace des composantes principales choisie (plan factoriel) est utile, compte tenu de l'importance de ces deux axes dans la reconstitution des variables initiales.

Avant d'analyser le cercle de corrélation, il est important de vérifier si les variables sont bien représentées sur le graphique. La qualité de représentation d'une variable sur un axe se mesure en évaluant au carré le coefficient de corrélation entre l'axe et la variable. Pour obtenir la part d'information d'une variable expliquée par les deux axes, on fait la somme des carrés des coefficients de corrélation des 2 axes (**Tableau 12**).

L'examen du tableau 12 nous indique que l'axe 1, qui explique 84.02% de l'information apportée par l'ensemble des variables initiales, est constitué essentiellement par les variables; efficacité de la callogenèse, temps d'induction de cals surface de croissance des cals, taux de régénération, tolérance relative et efficacité de la régénération (EC, TIC, SCC, RP, TR et ER). La proportion de la variance prise en



considération par l'axe 1 pour chacune des six variables initiales est d'une façon générale supérieure à 72 %. Le deuxième axe, expliquant 11.54% de la variation, est corrélé positivement avec la variable production de cals embryogènes (PCE).

**Tableau 12** Qualité de la représentation des variables sur le plan factoriel (1-2).

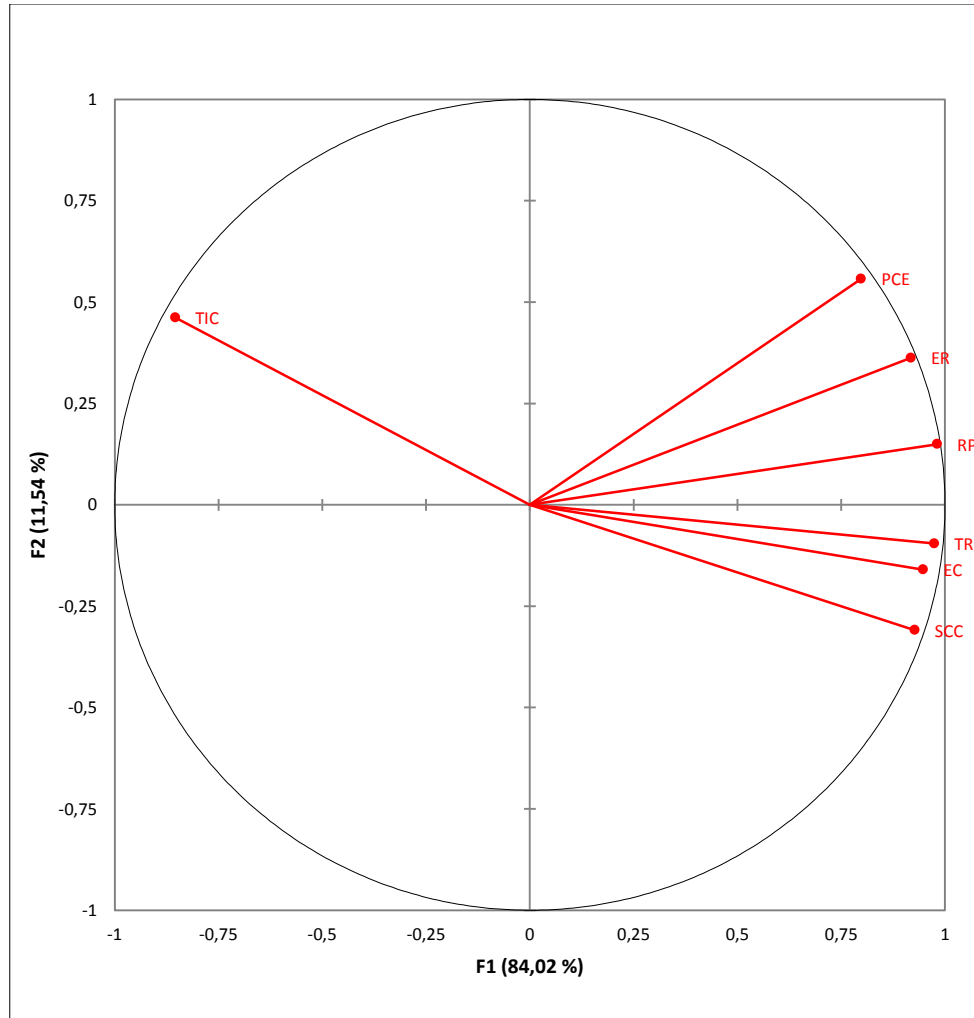
Variables	Principaux axes				Plan factoriel 1-2
	CP1		CP2		
	Corrélation	Corrélation au carré (%)	Corrélation	Corrélation au carré (%)	Corrélation au carré (%)
EC	0,948	89,83	-0,160	2,55	92,38
TCI	-0,854	72,86	0,461	21,29	94,15
SCC	0,927	86,01	-0,309	9,55	95,56
PCE	0,798	63,75	0,558	31,09	94,83
RP	0,982	96,38	0,149	2,23	98,61
TR	0,975	94,99	-0,095	0,91	95,90
ER	0,918	84,33	0,363	13,14	97,47

La représentation graphique en ACP (**Figure 10**) nous donne une très bonne représentativité des variables pour les deux axes principaux, puisque leur part d'information dans le plan principal choisie est supérieur à 92%.

Nous pouvons dégager les groupes de variables liées entre elles et celles opposées. Pour le premier axe nous distinguons deux groupes :

- Le premier groupe est formé par les variables : régénération de plante (RP), efficacité de régénération (ER) et production de cals embryogènes (PEC). Ces variables sont reliées par des corrélations positives et hautement significatives.
- Le deuxième groupe, du côté opposé, comprend les variables; tolérance relative (TR), efficacité de la callogenèse (EC), surface de croissance des cals (SCC), et qui sont corrélés négativement avec le deuxième axe.

Pour le deuxième axe nous distinguons un seul groupe qui est le temps d'induction de calcs (TIC), ce dernier est corrélé négativement au reste des variables cela signifie que lorsque une variable augmente l'autre diminue et inversement.



**Figure 10.** Cercle des corrélations entre les différentes variables étudiées dans le plan 1 et 2.

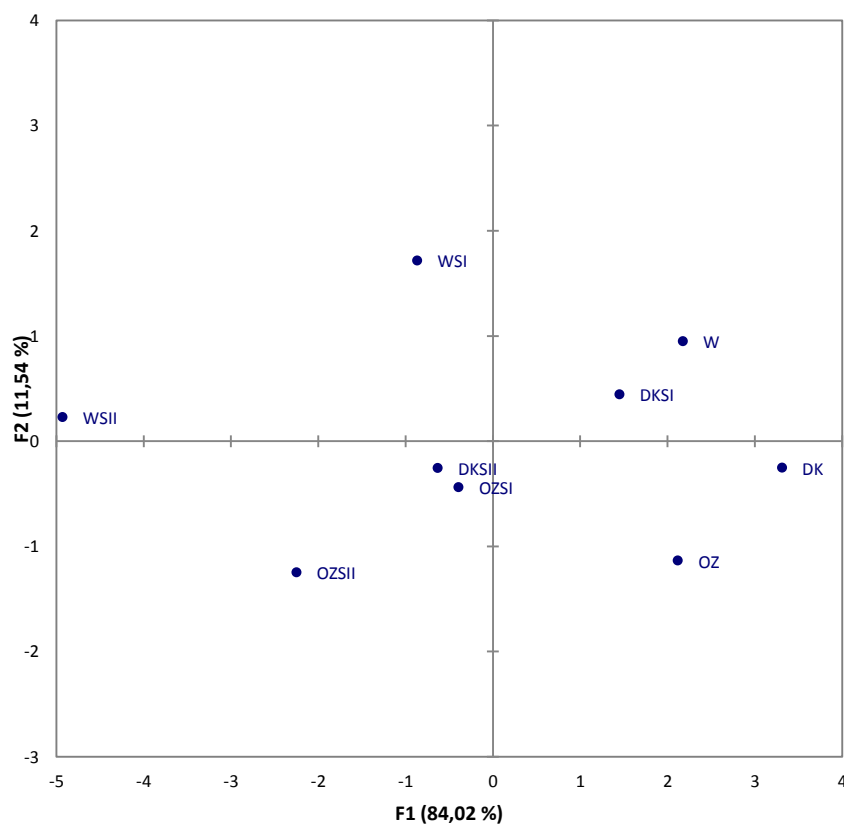
### III.3.2 Analyse du nuage de points-variétés: graphique des individus

Nous représentons graphiquement les individus sur le premier plan factoriel 1-2 étant donné que ce plan explique un pourcentage de 95.56% de l'inertie totale.

Selon Duby et Robin (2010), pour qu'un individu soit bien représenté sur un plan, il faut calculer le cosinus carré, s'il est proche de 1 on peut dire qu'il est bien

représenté par sa projection sur l'axe. D'autre part, si deux individus sont bien représentés en projection sur un axe et proches on pourra, alors dire qu'ils sont proches dans l'espace.

Palm (1998) rapporte que la qualité de la représentation d'un point dans le plan peut être obtenue en additionnant les cosinus carrés relatifs aux deux axes qui donnent un pourcentage de la représentation du point sur le sous-espace défini par ces axes (**Figure 11**).

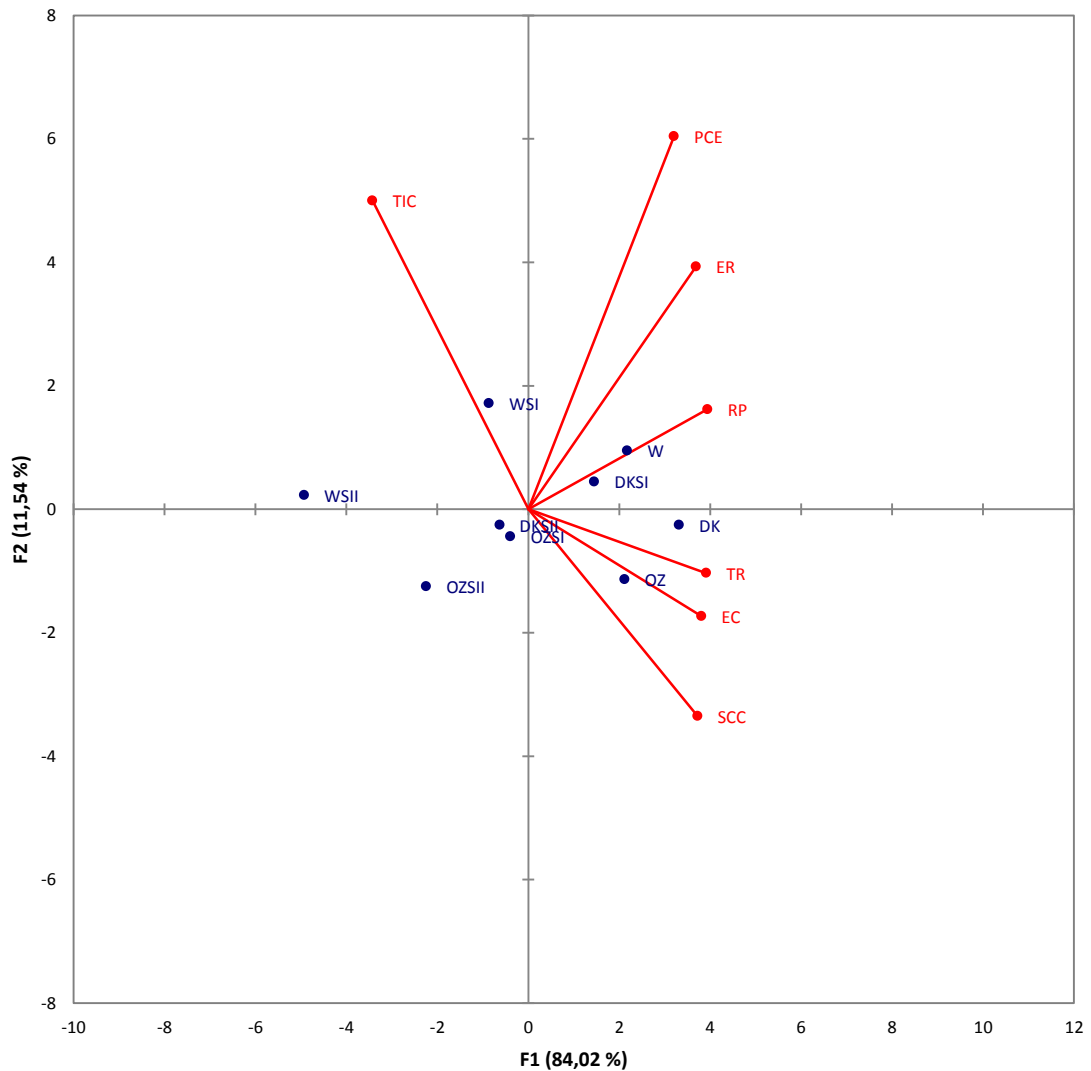


**Figure 11.** Projection des individus sur le plan factoriel 1-2.

### III.3.3 Projection des variables et des individus sur le plan factoriel 1-2.

Afin de connaître quelles sont les variables qui ont un rôle dans la constitution des composantes principales et celles qui expliquent la représentation des individus, on

rapporte simultanément les individus et les variables dans un même plan appelé Biplot (Figure 12).



**Figure 12.** Superposition des variables et des individus du plan factoriel 1-2

Les différents traitements (génotypes X concentrations PEG) sont répartis régulièrement le long de l'axe 1 suggérant un effet du stress hydrique. En effet, les contrôles des trois génotypes étudiés (DK, OZ, W) se caractérisent par des valeurs élevées pour les variables qui sont positivement corrélées avec l'axe 1 (RP, ER, TR, EC et SCC) et associées à de faibles valeurs pour la variable TIC qui est négativement corrélée au même axe.

Le traitement PEG 10% sur les trois géotypes prend une position intermédiaire sur le plan formé par les axes 1 et 2. Ceci suggère une réduction proportionnelle des valeurs prises par les variables positivement liées à cet axe et une augmentation proportionnelle des variables qui lui sont négativement corrélées (**Figure 12**).

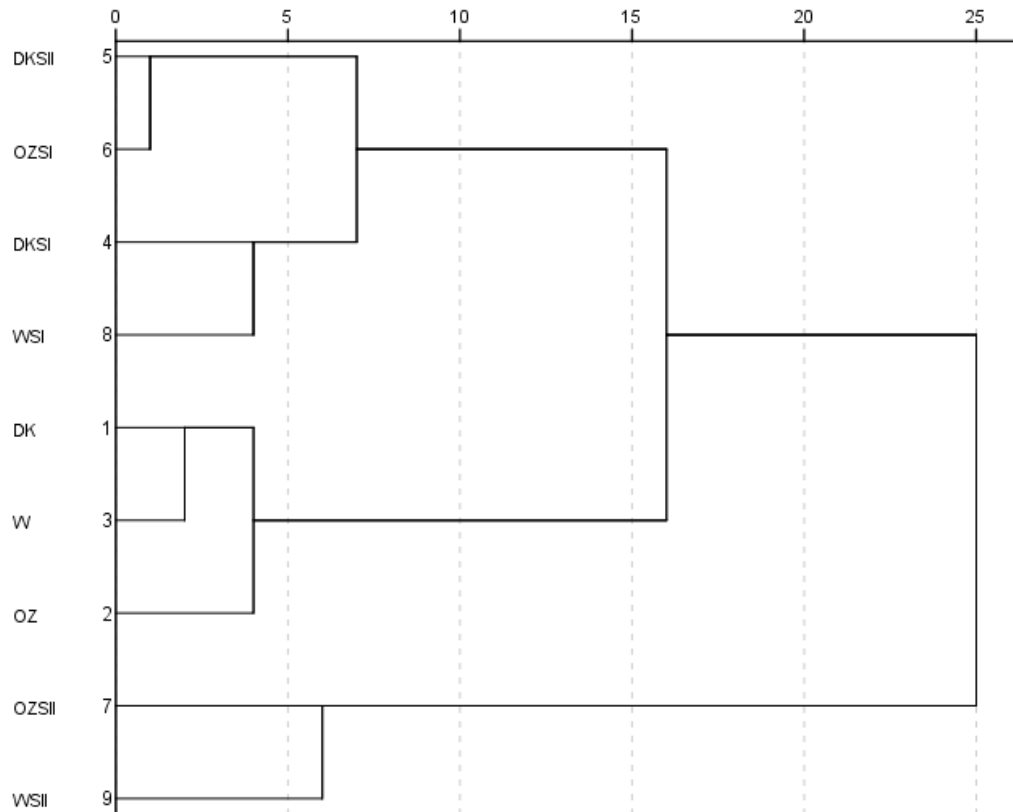
Le traitement PEG 20% sur les trois géotypes étudiés se situe à l'opposé du traitement témoin, suggérant que les géotypes évalués prennent des valeurs extrêmes pour les variables liées à l'axe1 : faibles valeurs pour les variables positivement liées et des valeurs élevées pour celles qui sont négativement liées à cet axe (**Figure 12**).

### **III.4 Classification ascendante hiérarchique**

La classification hiérarchique vient compléter les analyses précédentes. Le dendrogramme résultant est donné par la figure 13 son interprétation révèle la présence de cinq groupes distincts ;

- Groupe 1 : Djenah Khetifa, Oued Zenati et Waha en absence de stress.
- Groupe 2 : Djenah Khetifa SI et Waha SI
- Groupe 3 : Djenah Khetifa SII et Oued Zenati SI
- Groupe 4 : Oued Zenati SII
- Groupe 5 : Waha SII

Cette classification montre l'effet direct du PEG sur les géotypes étudiés et confirme l'ensemble des résultats précédents.



**Figure 13.** Dendrogramme du regroupement des trois génotypes de blé dur sous 0%, 10% (SI) et 20% (SII) de PEG.

#### IV CONCLUSION

Le PEG affecte négativement l'ensemble des paramètres étudiés. Dès le début de la culture, on assiste à un prolongement de la durée nécessaire pour l'initiation des cals, à une diminution dans la prolifération cellulaire et de la tolérance relative, ainsi qu'à une réduction des compétences callogènes, embryogènes et régénératifs. Ces compétences dépendent à la fois du génotype et du niveau de stress hydrique induit par le PEG. Ce comportement s'explique par le ralentissement de tous les processus physiologiques cellulaires qui affectent la croissance, la multiplication et donc la morphogenèse.

Au dépend de tous les paramètres étudiés, la variété Djenah Khetifa a été sélectionnée comme le génotype le plus tolérant au stress hydrique, suivi de la variété Oued Zenati. La variété Waha sort comme la plus sensible au stress hydrique.

Cependant cette dernière possède un pouvoir embryogène et régénératif supérieur en absence de stress hydrique. La variété réputée tolérante au stress hydrique présente une capacité de maintenir une certaine activité physiologique malgré une baisse du potentiel hydrique de ses tissus. La technique d'évaluation basée sur la physiologie des cellules est potentiellement intéressante. La confirmation des résultats c'est-à-dire la performance de croissance des plantules régénérées dans le champ devrait être envisagée.

La présence de l'agent sélectif PEG 10% dans le milieu améliore la maturation des embryons somatiques. La concentration de 20% PEG a réduit plus de la moitié des valeurs enregistrées de l'ensemble des paramètres étudiés, cette concentration est retenue comme pression de sélection pour les expériences qui suivent. La survie de des cals confirme la sélection de lignées cellulaires tolérantes au stress hydrique. Par ailleurs, il est probable que des variations somaclonales puissent se produire au cours des cultures. Dans la section qui suit nous analyserons par le biais de marqueurs moléculaires de type SSR la présence de variation somaclonale au niveau des descendants de la première génération des trois génotypes de blé dur régénérés.

## Chapitre III

Caractérisation moléculaire de la variation somaclonale chez  
des somaclones de blé dur (*Triticum durum* Desf)  
par marqueur SSR.



## I.INTRODUCTION

La création de nouvelles variétés est une source de progrès agronomiques en particulier sous les contraintes et les conditions climatiques futures. Larkin et Scowcroft ont proposé, en 1981, le terme de "variation somaclonale" pour définir la variabilité observée parmi les plantes régénérées à partir de culture de cellules ou de tissus somatiques cultivés *in vitro*. En effet, une rediversification fondamentale des bases biologiques et génétiques peut apparaître après régénération *in vitro* de cals provenant de tissus végétaux tant somatiques que gamétophytiques. Il en résulte une "vitrovariation" ou "variation somaclonale", expression de la malléabilité des cellules cultivées *in vitro* (Mansouri et al. 2005). Une partie de la variabilité peut s'avérer utile à l'amélioration génétique des plantes vis-à-vis des stress biotiques ou abiotiques. En effet, la présence d'un agent sélectif offre, en plus, la possibilité de régénérer des plantes ayant des caractéristiques recherchées en permettant la survie et la croissance préférentielle des phénotypes souhaités (Rai et al. 2010).

La variation somaclonale proviendrait selon plusieurs auteurs de la dérégulation de certains gènes, de modifications du caryotype (aneuploïdie, polyploïdie), de mutations ponctuelles, de réarrangements chromosomiques, de phénomènes d'amplification de gènes, ou d'activation d'éléments transposables (Nabors et al. 1980, Larkin et Scowcroft 1981, Sun et al. 1983, Galiba et al. 1986, Evans et al. 1989, Sato et al. 2011).

Pour identifier la variation somaclonale, ont été employées plusieurs méthodes telles que la description morphologique, l'analyse du caryotype, les marqueurs biochimiques (Heinze et Mee 1971, Hsissou et Bouharmont 1994, Mehta et al. 2000, Karim et al. 2011). Certaines de ces méthodes ont montré leurs limites. Parmi les nombreux marqueurs moléculaires existants, les microsatellites ou répétitions de séquences simples qui ont pris une importance considérable dans l'évaluation de la fidélité génétique ou la diversité génétique chez plusieurs espèces grâce à leurs multiples caractéristiques aussi bien biologiques que techniques (Rahman et Rajora 2001, Jin et al. 2008, Zhang et al. 2010, Nookaraju et Agrawal 2012, Khan et al. 2013). Peu de travaux de recherche ont porté sur la détection de la variation somaclonale chez le blé dur au moyen de microsatellites. Dans ce travail, nous avons analysé des

somaclones de première génération ( $R_1$ ) de blé dur par marqueurs SSR dans l'objectif de détecter la variation somaclonale.

## II MATERIEL ET METHODES

### II. 1 Matériel végétal et condition de culture

Le matériel végétal utilisé pour cette étude est constitué des vitroplants ( $R_0$ ) des trois variétés de blé dur (Djenah Khetifa, Oued Zenati et Waha) décrites dans le chapitre précédent.

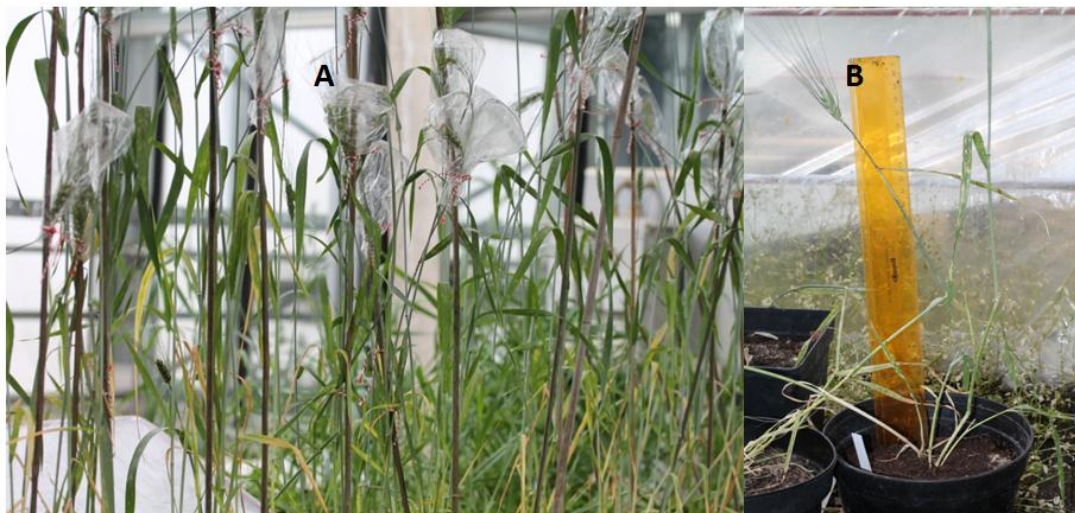
Rappelons que nous avons retenu la concentration de 20% PEG comme pression de sélection car cette concentration avait réduit plus de la moitié des valeurs enregistrées de tous les caractères étudiés.

Les épis formés des vitroplants ( $R_0$ ) ont été laissés en autofécondation et couverts par des sacs en plastique dont l'extrémité inférieure est fermée à l'aide d'un fin ruban pour assurer le maintien d'un maximum d'humidité et éviter la pollinisation accidentelle. Les grains de la génération  $R_0$  ont été mis en germination sur papier filtre imbibé d'eau distillée stérile. Les jeunes plantules sont ensuite acclimatées en serre pour obtenir la première génération de plantes (**Figure 14**). Du point de vue morphologique, les somaclones  $R_1$  sont identiques aux plantes mères à l'exception d'un seul somaclone issu de cal stressé de la variété Oued Zenati. (**Figure 14.B**).

Pour des raisons de temps, nous avons restreint notre analyse à quelques somaclones de la première génération. Le nombre de plantes analysées ainsi que leurs origines sont présentés dans le tableau 13.

**Tableau 13.** Nombre et origine des somaclones  $R_1$  analysés.

Géotypes	Origine des plantes de la première génération	
	Cals contrôle (0% PEG)	Cals stressé (20% PEG)
Djenah Khetifa	6	5
Oued Zenati	6	2
Waha	3	1



**Figure 14.** Plantes de la génération R<sub>0</sub> en phase épilaison. **A.** plantes issues de cals non stressés **B.** Plante issue de cals stressé (20 % PEG).

## II. 2 Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique des plantes de la première génération a été extrait à partir de cinquante milligrammes de feuilles récoltées. Pour l'ADN génomique des plantes mères nous avons utilisé 25 embryons matures pour chaque génotype. Le protocole d'extraction d'ADN utilisé est celui décrit par Doyle et Doyle (1990) (**Annexe 2**). 2µl de ARNase sont ajoutés, pour l'élimination de toute trace d'ARN.

La qualité des échantillons d'ADN extraits a été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8%. La quantification des acides nucléiques a été effectuée par un nano spectrophotomètre (Nanodrop) (IMPLEN, Germany) pour deux longueurs d'ondes (280nm et 260nm). Plus le rapport DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub> tant vers 2.0, plus l'extrait d'ADN est qualifié de meilleur ou pur et son utilisation dans plusieurs techniques d'amplification est vouée au succès.

## II. 3 Amorces microsatellites

Nous avons utilisés cinq marqueurs microsatellites, *gwm088*, *gwm131*, *gwm135*, *gwm186* et *gwm427*, développés initialement pour le blé tendre (Röder et al. 1998). Ces marqueurs ont été sélectionnés selon leur disponibilité au laboratoire tout en considérant leurs caractéristiques techniques (bonne aptitude à l'amplification et interprétation aisée des typages) et génétiques (nombre d'allèles, localisation et répartition dans le génome)

Chaque amorce sens (Forward) est marquée avec un fluorochrome (IRD800), grâce auquel les échantillons sont détectés lors de leur migration sur le séquenceur. Les caractéristiques principales des marqueurs microsatellites sélectionnés sont présentées sur le tableau 14.

**Tableau 14** Caractéristiques des marqueurs microsatellites étudiés (Röder et al. 1998).

Locus	Chromosome	Séquence amorce (5'-3')	F/R	Motif de répétition	Tm
<i>gwm131</i>	1B-3B	AAT CCC CAC CGA TTC TTC TC	F	(CT) <sub>22</sub>	60°C
<i>gwm131</i>		AGT TCG TGG GTC TCT GAT GG	R		
<i>gwm135</i>	1A	TGT CAA CAT CGT TTT GAA AAG G	F	(GA) <sub>20</sub>	60°C
<i>gwm135</i>		ACA CTG TCA ACC TGG CAA TG	R		
<i>gwm427</i>	6A	AAA CTT AGA ACT GTA ATT TCA GA	F	(CA) <sub>31</sub> (CA) <sub>22</sub>	50°C
<i>gwm427</i>		AGT GTG TTC ATT TGA CAG TT	R		
<i>gwm088</i>	6B	CACTACA ACTATGCGCTCGC	F	(GT) <sub>18</sub> TT (GA) <sub>4</sub>	60°C
<i>gwm088</i>		TCCATTGGCTTCTCTCTCAA	R		
<i>gwm186</i>	5A	CACTACA ACTATGCGCTCGC	F	(GT) <sub>18</sub> TT (GA) <sub>4</sub>	60°C
<i>gwm186</i>		TCCATTGGCTTCTCTCTCAA	R		

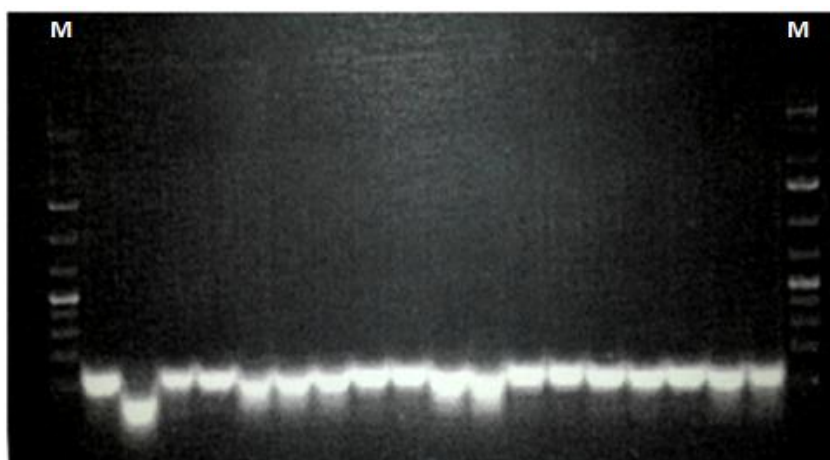
#### II.4 Conditions d'amplification des marqueurs microsatellites

Le volume réactionnel utilisé pour chaque échantillon est de 20 µl contenant 20ng d'ADN matrice, tampon 1X, 0.2 mM de chaque dNTP, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1µl/µl BSA, 0.25 µM de chaque amorces et 0.5U de Taq DNA polymerase (Fermentas).

Le programme d'amplification se compose des étapes suivantes : 4 minutes à 94°C pour une dénaturation initiale suivie de 30 cycles successifs, chaque cycle comprend une succession de trois phases, une dénaturation à 94°C pendant 1 minute, une phase d'hybridation pendant 1 minute à la température d'hybridation spécifique de chaque paire d'amorces (**Tableau 14**) et une extension de 2 minutes à 72 °C. Enfin, une dernière étape d'élongation à 72 °C pendant 10 minutes est programmée suivie d'une

phase de refroidissement à 4 °C. Les réactions de PCR sont réalisées dans un thermocycleur (Bio-Rad iCycler).

L'analyse des produits d'amplification est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.2 % dans du tampon TBE 0,5X à un voltage constant (de 100 V). Le gel contient le Roti-GelStain (ROTH) agent, non mutagène, intercalant des acides nucléiques qui fluoresce sous un rayonnement ultraviolet à une longueur d'onde de 520 nm. Le gel est photographié dans une chambre noire sur la table UV à l'aide du dispositif Quantum ST4-1100 (Vilber Lourmat, France) (**Figure 15**).



**Figure 15.** Test des amorces *gwm131*, *gwm135*, *gwm427*, *gwm088* et *gwm186* sur ADN génomique des géotypes de blé dur par PCR classique. M : marqueur de taille moléculaire (1kb DNA Ladder- Invitrogen).

## II.5 Migration des produits PCR sur gel de polyacrylamide sur le séquenceur LI-COR.

Les échantillons contenus dans la plaque de réarrangement sont d'abord dénaturés dans le thermocycleur à 95°C pendant 2 minutes. Le réarrangement des plaques consiste à faire du multiplexage, c'est-à-dire à mélanger les microsatellites qui ont été amplifiés par PCR permettant la migration simultanée des marqueurs étudiés (**Annexe 3**). La plaque est immédiatement placée sur glace afin d'éviter toute renaturation éventuelle de l'ADN.

Les fragments d'ADN sont ensuite chargés (0.8µl) sur un gel de polyacrylamide (25cm de longueur et 0.25mm d'épaisseur ; 20 ml d'acrylamide à 6,5%, 15 µl de TEMED sigma, 150 µl d'APS 10%) à un haut voltage (1500V) pendant 1h25. La migration et l'acquisition de l'image du gel se font grâce au LI-COR global edition IR<sup>2</sup> DNA sequencer (Westburg).

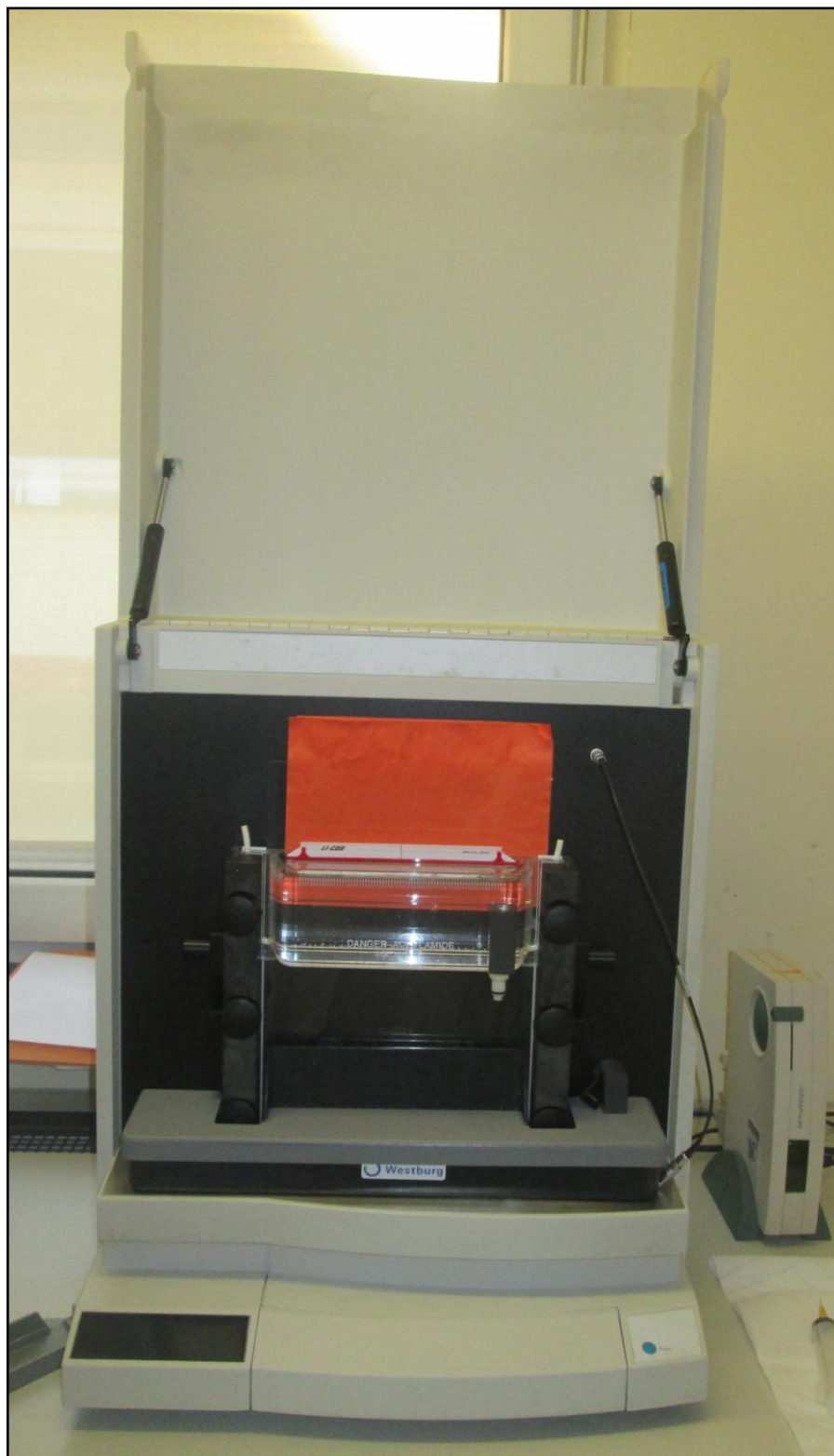
Le principe de la technique consiste à détecter les produits PCR fluorescents par des lasers qui transmettent l'image des bandes au serveur. La visualisation de la migration est possible sur un ordinateur connecté au séquenceur.

Toutes les manipulations de la PCR jusqu'au dépôt des produits d'amplification sur le gel d'acrylamide sont réalisées à l'abri de la lumière.

## **II.6 Analyse statistique des données**

L'image brute des gels est exportée sur un logiciel d'analyse Gene ImagIR, v 4.03 (Westburg) afin d'obtenir l'assignation de taille des allèles sur la base d'une comparaison avec un marqueur de taille (350pb) (Fermentas).

Le nombre moyen d'allèle par locus, la diversité génétique totale (*H<sub>t</sub>*), la diversité génétique intrapopulation (*H<sub>s</sub>*), ont été étudiés à l'aide du logiciel GENETIX (Belkhir et al. 2004). Les distances génétiques entre paires de populations ont été calculées selon l'approche classique basée sur les fréquences alléliques dans chaque population en retenant la distance de Nei (1978) par le logiciel GENETIX v.4.02 (Belkhir et al. 2004).



**Figure 16.** Séquenceur d'ADN- LI-COR global édition IR<sup>2</sup> DNA sequencer (Westburg) (Photographie du CRA-W).

### III RESULTATS

#### III.1 Détection de la variation somaclonale

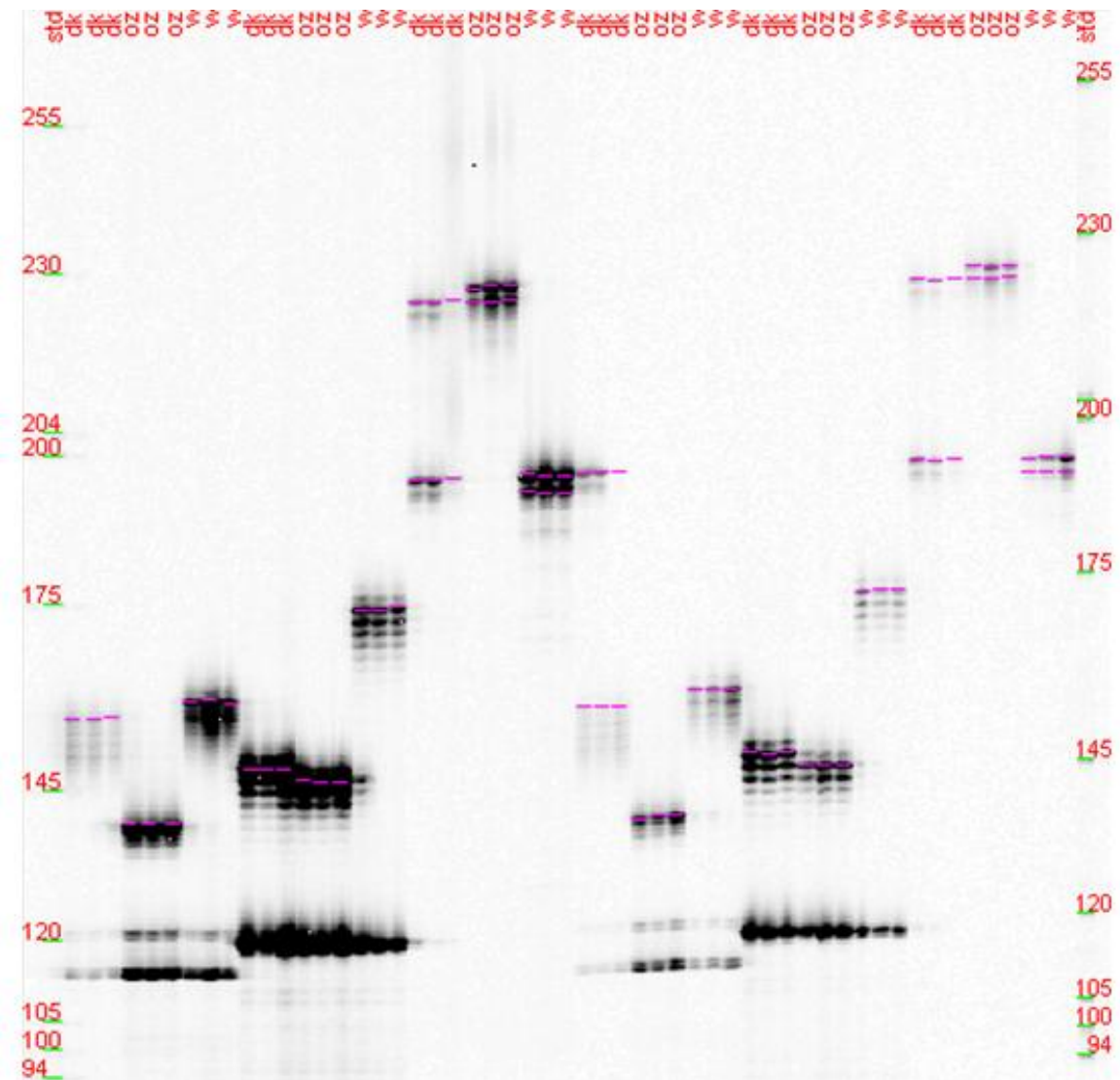
Après les tests effectués sur l'ensemble des individus avec les 5 paires d'amorces microsatellites décrites par Röder et al. (1998), nous avons décidé d'écarter les données des marqueurs *gwm088* et *gwm186* pour la suite des analyses, étant donné la mauvaise séparation et la difficulté de lecture des tailles des allèles. Nous avons ainsi retenu les trois amorces : *gwm331*, *gwm335* et *gwm427* ; ces marqueurs sont amplifiables et reproductibles.

Nous avons commencé notre étude en vérifiant les profils obtenus par les microsatellites *gwm131*, *gwm135* et *gwm427* sur les plantes mères (**Figure 17**). Au totale 9 fragments monomorphes et reproductibles ont été produits chez les trois génotypes de blé dur étudiés. La taille des fragments varie de 139 pb à 225 pb (**Tableau 15**). Ce résultat montre qu'il n'y a pas de mélange dans les variétés.

Avec les 23 somaclones analysés, nous avons obtenus un total de 69 fragments reproductibles et monomorphes. La taille des fragments varient de 136 pb à 225pb. La comparaison entre les profils des plantes mères et des somaclones indique la présence de nouveaux allèles et l'absence de certains d'autres. Avec le marqueur *gwm131* on assiste à deux délétions de 4 et 16 pb chez deux somaclones de la variété Djenah Khetifa DKR<sub>1</sub>-S1 et DKR<sub>1</sub>-S2, respectivement. Avec le même marqueur, on enregistre un autre cas de délétion d'une seule paire de base chez le somaclonale WR<sub>1</sub>-S1 de la variété Waha. Un autre cas de délétion, de trois paires de bases, chez le somaclonale OZR<sub>1</sub>-S2 de la variété Oued Zenati, ce somaclone est d'un aspect morphologique très différent des plantes mères (**Figure 14.B, Tableau 15**).

Le microsatellite *gwm 427* révèle la présence d'un nouvel allèle d'une taille 222 paire de base avec le somaclone WR<sub>1</sub>-C3 de la variété Waha. En revanche, aucune variation génétique n'a été observée chez les somaclones R<sub>1</sub> avec le microsatellite *gwm 135*.





**Figure 17.** Photo de gel obtenu après lecture par le séquenceur LI-COR IR<sup>2</sup> pour les locus *gwm131*, *gwm135* et *gwm427*. DK (Djenah Khetifa), OZ (Oued Zenati), W(Waha). Le premier et le dernier puits correspondent au marqueur de taille standard (350pb).

Le taux de variations détecté par le biais des trois amorces: *gwm131*, *gwm135* et *gwm427* s'élève à 21.74% ; le taux de variation le plus élevé est enregistré avec le locus *gwm131* (17.39%) suivie de *gwm427* (4.35%). Cependant, le locus *gwm135* n'a révélé aucune variation génétique. 80% de la variation totale a été enregistrée sur des plantes qui ont pour origine des cals stressés (PEG 20%) alors que 20% de la variation été observée chez les plantes issues de cals non stressés (PEG 0%). Aucune variation n'a été observée avec les somaclones issus de cals contrôles des deux variétés ; Djenah Khetifa et Oued Zenati.

**Tableau 15** Caractérisation de la variation somaclonale chez des somaclones de première génération (R<sub>1</sub>) de blé dur.

Individus	Code des plantes	Origine des plantes	Tailles (pb)		
			<i>gwm131</i>	<i>gwm135</i>	<i>gwm427</i>
Djenah Khetifa	DK	Cal contrôle <i>in vivo</i>	155	148	223
Djenah Khetifa	DKR <sub>1</sub> -C1	Cal contrôle <i>in vitro</i>	155	148	223
Djenah Khetifa	DKR <sub>1</sub> -C2	Cal contrôle <i>in vitro</i>	155	148	223
Djenah Khetifa	DKR <sub>1</sub> -C3	Cal contrôle <i>in vitro</i>	155	148	223
Djenah Khetifa	DKR <sub>1</sub> -C4	Cal contrôle <i>in vitro</i>	155	148	223
Djenah Khetifa	DKR <sub>1</sub> -C5	Cal contrôle <i>in vitro</i>	155	148	223
Djenah Khetifa	DKR <sub>1</sub> -C6	Cal contrôle <i>in vitro</i>	155	148	223
Djenah Khetifa	DKR <sub>1</sub> -S1	Cal stressé <i>in vitro</i>	<b>151</b>	148	223
Djenah Khetifa	DKR <sub>1</sub> -S2	Cal stressé <i>in vitro</i>	<b>139</b>	148	223
Djenah Khetifa	DKR <sub>1</sub> -S3	Cal stressé <i>in vitro</i>	155	148	223
Djenah Khetifa	DKR <sub>1</sub> -S4	Cal stressé <i>in vitro</i>	155	148	223
Djenah Khetifa	DKR <sub>1</sub> -S5	Cal stressé <i>in vitro</i>	155	148	223
Oued Zenati	OZ	Cal contrôle <i>in vivo</i>	139	146	225
Oued Zenati	OZR <sub>1</sub> -C1	Cal contrôle <i>in vitro</i>	139	146	225
Oued Zenati	OZR <sub>1</sub> -C2	Cal contrôle <i>in vitro</i>	139	146	225
Oued Zenati	OZR <sub>1</sub> -C3	Cal contrôle <i>in vitro</i>	139	146	225
Oued Zenati	OZR <sub>1</sub> -C4	Cal contrôle <i>in vitro</i>	139	146	225
Oued Zenati	OZR <sub>1</sub> -C5	Cal contrôle <i>in vitro</i>	139	146	225
Oued Zenati	OZR <sub>1</sub> -C6	Cal contrôle <i>in vitro</i>	139	146	225
Oued Zenati	OZR <sub>1</sub> -S1	Cal stressé <i>in vitro</i>	139	146	225
Oued Zenati	OZR <sub>1</sub> -S2	Cal stressé <i>in vitro</i>	<b>136</b>	146	225
Waha	W	Cal contrôle <i>in vivo</i>	157	173	194
Waha	WR <sub>1</sub> -C1	Cal contrôle <i>in vitro</i>	157	173	194
Waha	WR <sub>1</sub> -C2	Cal contrôle <i>in vitro</i>	157	173	194
Waha	WR <sub>1</sub> -C3	Cal contrôle <i>in vitro</i>	157	173	<b>222</b>
Waha	WR <sub>1</sub> -S1	Cal stressé <i>in vitro</i>	<b>156</b>	173	194

### III.2 Diversité génétique

Les résultats obtenus avec le logiciel GENETIX 4.05 montrent des taux de diversité assez élevés (71%) (Polymorphisme inter-population). Le taux de polymorphisme le plus élevé est enregistré avec le locus *gwm131* (75.37%) suivi de *gwm 427* (70.76%) puis le locus *gwm135* (66.67%). Cependant, le taux de polymorphisme intra-population était moins élevé (0.14 %). Le locus *gwm131* donne le taux le plus élevé (31.06%) suivi de *gwm427* (12.28%), le taux polymorphisme intra-spécifique était nul avec le locus *gwm135*.

Le nombre d'allèle varie de 1 à 3 chez la population Djenah Khetifa et de 1 à 2 pour les deux populations Oued Zenati et Waha. Le locus *gwm131* présente 6 allèles, 4 allèles pour le locus *gwm427*, seul le locus *gwm135* présente un nombre d'allèles sensiblement plus faibles (**Tableau 16**).

Le tableau 16 présente aussi les fréquences et les tailles des allèles des différentes populations. Les fréquences alléliques calculées pour chaque locus et chaque population varient de 0 à 0,89. Au niveau du locus *gwm131*, qui compte six allèles, la dominance de l'allèle 139 est assez remarquable et sa fréquence est de 0.324 dans les trois populations. Quant au locus *gwm135*, il exhibe trois allèles au total ; un allèle pour chaque individu. Pour le locus *gwm427*, la dominance de l'allèle 194 chez Waha est assez remarquable et sa fréquence est de 0.8.

La matrice des distances génétiques estimées entre individus (**Tableau 17**) indique des valeurs élevées entre les populations prises deux à deux. Ces distances varient de 0.83 à 1.67. La matrice de distance génétique indique que les trois populations présentent une dissemblance génétique. Cependant, les variétés Djenah Khetifa et Waha semblent être plus proches génétiquement.

**Tableau 16** Fréquences alléliques de chaque population étudiée.

Locus	Allèles (pb)	Populations		
		Djenah Khetifa	Oued Zenati	Waha
<i>gwm131</i>				
	(N)	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>5</b>
	<b>136</b>	0.000	0.111	0.000
	<b>139</b>	0.083	0.889	0.000
	<b>151</b>	0.083	0.000	0.000
	<b>155</b>	0.833	0.000	0.000
	<b>156</b>	0.000	0.000	0.200
	<b>157</b>	0.000	0.000	0.800
<i>gwm135</i>				
	(N)	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>5</b>
	<b>146</b>	0.000	1.000	0.000
	<b>148</b>	1.000	0.000	0.000
	<b>173</b>	0.000	0.000	1.000
<i>gwm427</i>				
	(N)	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>5</b>
	<b>194</b>	0.000	0.000	0.800
	<b>222</b>	0.000	0.000	0.200
	<b>223</b>	1.000	0.000	0.000
	<b>225</b>	0.000	1.000	0.000

**Tableau 17** Distance génétique entre les trois populations de blé dur.

	Djenah Khetifa	Oued Zenati	Waha
<b>Djenah Khetifa</b>	0		
<b>Oued Zenati</b>	1.16	0	
<b>Waha</b>	0.83	1.67	0

## IV DISCUSSION

Les différences dans les longueurs de séquences des produits d'amplification retrouvées chez les somaclones R<sub>1</sub> sont expliquées par l'induction de variation somaclonale. Ces variations génétiques, constatées dans la première génération, suggèrent que de telles modifications ont été transmises dans la descendance des régénérants. La transmission des caractères variants de cellules à cellules par mitose ainsi que l'héritabilité cellulaire des variations est aujourd'hui bien établie (Meins 1983). Selon Meins (1983) les changements qui résultent de modifications permanentes du génome sont génétiques, ces changements sont transmissibles chez les plantes régénérées et dans leur descendance selon les règles de la ségrégation mendélienne classique.

La perte ou le gain d'une bande peut être dû à des altérations génomiques telles qu'une mutation dans le site d'amorçage ou une délétion / insertion entre les sites d'amorçage (Jin et al. 2008). Les résultats obtenus sont en accord avec les travaux de Khan et al. (2013) réalisés sur des vitroplants d'armoïse (*Artemisia amygdalina*) régénérées *in vitro*. Ces auteurs ont identifié deux nouveaux allèles de 0.15 kb et 0.2 kb par marqueurs ISSR. Nos travaux concordent également avec d'autres travaux réalisés sur différentes espèces telle que le peuplier faux-tremble (Rahman et Rajora 2001), le riz (Khai et Lang 2005) et le coton (Jin et al. 2008).

Les facteurs pouvant influencer la variation somaclonale peuvent être multiples, en l'occurrence la nature du génotype, l'âge de la culture, la composition des milieux de culture (Larkin 1984, Duncan 1997, Kaeppler et al. 2000). D'après nos résultats, il semble que la présence de l'agent sélectif PEG20% soit à l'origine des variations génotypiques identifiées puisque la majorité des variations avaient été observées sur des plantes qui ont pour origine un cal stressé. Nag et al. (2004) rapportent que le changement dans le nombre des unités de répétitions peut altérer la fonction et/ou le profil d'expression d'un gène, ceci en fonction de la position du locus SSR.

Bien que la majorité des somaclones soit phénotypiquement normale et identique aux plantes mères, des mutations de types insertion et/ou délétion ont été mises en évidence par les marqueurs *gwm 131* et *gwm 427*. L'identification

phénotypique, basée sur une description des traits morphologiques, est facilement identifiée mais certains changements induits par culture *in vitro* ne peuvent pas être facilement observés. Des constatations similaires sur des régénérants phénotypiquement normaux ont été évoquées chez d'autres espèces (Rahman et Rajora 2001, Jin et al. 2008).

La distance nulle entre deux individus suggère une similarité vis-à-vis des loci étudiés. Par contre une distance élevée traduit la diversité génétique d'un individu à un autre (Patade et al. 2006). La matrice de distance génétique indique que les trois populations étudiées présentent une dissemblance génétique.

Les fragments monomorphes obtenus confirment l'homogénéité génétique des plantes mères pour les marqueurs étudiés (Zhang et al. 2010, Manoj et al. 2012).

Les individus des trois populations montrent un polymorphisme génétique plus grand par rapport à ceux des individus de la même espèce ; on a donc une diversité interspécifique qui est très grande par rapport à la diversité intraspécifique. Ce qui traduit une isolation génétique importante entre les variétés étudiées et amplifiées par la nature même de la reproduction fermée chez le blé. Le polymorphisme intra-spécifique observé est dû, en partie, à la différence de taille des bandes obtenues avec les locus *gwm 131* et *gwm 427*. Ces résultats révèlent aussi que les marqueurs monomorphes SSR peuvent être utiles pour l'analyse génétique (Hama-Ali et Tan 2014).

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Medini et al. (2005) et ceux de Colomba et Gregorin (2011) effectués sur différentes populations de blé dur et qui ont montré l'existence d'une forte variabilité interspécifique par l'utilisation des marqueurs SSR et AFLP.

Dans une étude de référence, Hamrick et Godt (1997) montrent que la diversité génétique intrapopulation chez les espèces allogames varie entre 10.3% et 26.6% alors que la diversité génétique intrapopulation des espèces autogames varie entre 0.09% et 0.14%.

## V. CONCLUSION

Cette étude a montré que les marqueurs SSR peuvent être utilisés efficacement pour l'évaluation de la variation somaclone parmi des plantes dérivées de culture *in vitro*. La fréquence de la variation somaclonale semble être en relation avec l'agent sélectif, ce qui suggère que la simulation du stress hydrique, *in vitro*, par le PEG est capable de variation génétique. La présente étude aura également permis de mettre en évidence un niveau élevé de diversité génétique (71%) chez les trois populations de blé dur. L'existence de variation somaclonale permet d'augmenter la variabilité au sein des populations. Les variations retrouvées chez les plantes de première génération impliquent que ces modifications ont été transmises par reproduction sexuée en l'absence de stress hydrique. Néanmoins, la réalisation de test de stabilité dans les générations qui suivent et en présence de stress hydrique permettrait de vérifier la sélection ou non de variants somaclonaux tolérant au stress hydrique.

Les plantes sélectionnées pourraient être utilisées comme ressources génétiques, et leur caractérisation en condition de stress hydrique permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la tolérance au stress hydrique. Dans la section qui suit, nous aborderons une nouvelle approche d'analyse protéomique pour l'identification et la caractérisation de protéines candidates répondants au stress hydrique. Des analyses par RT-PCR quantitative et Western blot sont ensuite réalisées afin de confirmer les gènes candidats identifiés sous condition de stress hydrique.

## Chapitre IV

Diagonal two-dimensional electrophoresis (D-2DE):  
a new approach to study the effect of osmotic stress  
induced by polyethylene glycol in durum wheat  
(*Triticum durum* Desf).



## I. INTRODUCTION

Durum wheat (*Triticum durum* Desf.) is an important food crop in the Mediterranean area, not only because of the large acreage it covers, but also because of its importance in the human diet. In the semi-arid high plains of Algeria, drought is a serious wheat production problem. The general effects of drought on plant growth are well known, but the effects of water deficit at biochemical and molecular levels are not well understood. Plant species possess distinctive indicators of stress tolerance at whole plant, tissue, or cellular level, reviewed by Ahmad et al. (2014). Understanding the drought tolerance mechanisms of wheat involves isolating and characterizing drought stress-related genes and proteins (Salekdeh et al. 2002). Many genes induced by osmotic stress have been identified in plants using various functional genomics strategies (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2006). However, the loose correlation between mRNA and protein expression has greatly stimulated the application of proteomics to characterize the response to drought stress.

In our study, we started looking at the potential use of proteomic tools for identifying osmotic stress-related proteins in durum wheat calli. Although two-dimensional electrophoresis (2DE) allows thousands of individual proteins to be separated into discrete spots in one gel, it has lately come under critic because of its known limitations such as poor representation of low abundant proteins (Gygi et al. 2000), highly acidic/basic proteins, or proteins with extreme size or hydrophobicity (Ong et al. 2001), and the co-migration of multiple proteins to a single spot which makes comparative quantification rather inaccurate (Abdallah et al. 2012). Several studies have shown that the best way to use a 2D gel-based approach is either to focus on one or a few particular proteins or to reduce the complexity of the sample (Abdallah et al. 2012).

In this paper, we describe a relatively simple and reproducible method that addresses the co-migration drawbacks. It is based on a diagonal electrophoretic technique (Brown and Hartley 1966) and combines the differential electrophoretic resolution capabilities of two gel buffers systems used in series. So far as we know, no study has used this method to analyze the differential changes in relative protein

abundance under osmotic stress in wheat calli. The method provides new insights into the osmotic-responsive mechanisms at the cellular level of durum wheat.

## **II MATERIAL AND METHODS**

### **II.1 Plant material**

The experiments were carried out on three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) genotypes. Based on field trials, one genotype was classified as drought sensitive (Waha) and two as drought tolerant (Oued Zenati and Djenah Khetifa). The wheat germplasm was obtained from the Technical Institute of Field Crops (ITGC) Institut Technique des Grandes Cultures (Station El-khroub Constantine, Algeria).

### **II.2 Callus induction and *in vitro* selection procedures**

Callus cultures were initiated using mature embryos. The seeds were surface sterilized with 70 % ethanol for 15 min and 12 % sodium hypochlorite (NaClO) for 20 min, and then rinsed five times with sterile H<sub>2</sub>O. Mature embryos about 2–4 mm long were aseptically excised and then incubated with the scutellum side down on MS induction medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with 2 mg l<sup>-1</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 3 % sucrose and 2.5 g l<sup>-1</sup> phytigel (SigmaAldrich).

The pH value of the medium was adjusted to 5.7 prior to autoclaving at 110 °C for 30 min. Cultures were maintained at 25 ± 1 °C under 30 µm<sup>-2</sup> S<sup>-1</sup> light provided by cool fluorescent light for a 16 h light period and an 8 h dark period. Each treatment was performed in triplicate. Calli were maintained by subculturing every 20 days on the same MS medium with different concentrations of PEG 6000 (0, 10 and 20 %). For proteomic and transcriptomic analysis, 20 % of PEG6000 was used. The osmoticum was added to the media before autoclaving.

### **II.3 Callus growth**

Callus growth was assessed by means of the image analysis technique. Images were captured using a Canon EOS 1100D reflex numerical camera equipped with a 60

mm f/2.8 macro USM objective, and they were analyzed using Image Pro Plus 6.2 software (Media Cybernetics) (Delporte et al. 2001) The resolution of the numerical image was a 25.5 x 25.5  $\mu\text{m}$  square (equal to the size of 1 pixel). The sample consists of embryogenic callus collected 30 days after tissue culture induction. Surface area, mean diameter and ratio between the maximum and minimum diameters were determined for each callus. Analyses were performed in five repetitions for each variety and each treatment.

#### **II.4 Protein extraction and one-dimensional gel electrophoresis (1D SDS PAGE)**

The total proteins were extracted from the three durum wheat genotypes after grinding and precipitation in solution of 10 % trichloroacetic acid (TCA) in cold acetone (Damerval et al. 1986).

After centrifugation and rinsing, the vacuum-dried pellets were dissolved in 400  $\mu\text{l}$  of rehydration solution (Urea 7 M, Thiourea 2 M, CHAPS 4 %, Tris 30 mM). The supernatant was harvested after 10 min of centrifugation at 20,000g. The protein concentration was quantified using the Bradford method, with BSA as standard (Bradford 1976).

Bands were revealed with Coomassie Blue R-250 and analyzed using ImagQuant 5 and Photocapt 8 software in order to identify differentially expressed polypeptides among control and stressed calli. The proteins were initially screened by detecting those whose relative abundance had been changed by osmotic stress at the callus stage. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed in 10 % polyacrylamide using the Bio-Rad Protean II xi Cell gel size 16 x 16 cm system using the Laemmli buffer system (Laemmli 1970).

#### **II.5 Diagonal two-dimensional electrophoresis (D-2DE)**

Initially, the protein extracts were electrophoresed on 15 % PAGE in Tris-tricine gel buffer, following the Hoefer system (Shägger and Jagow 1987). The zone of interest, between 100 and 25 kDa, was excised from the one-dimensional electrophoresis gel, placed orthogonally on top of a second gel and electrophoresed

using the Laemmli buffer (Laemmli 1970). The signals are visualized by silver staining and Coomassie Blue R-250.

## II.6 Spot excision, digestion and identification of proteins

Manually excised gel fragments were washed and desalted with a 50 mM ammonium bicarbonate solution containing 50 % (v/v) methanol followed by 75 % (v/v) acetonitrile solution and dried at 37 °C. Proteins within each gel spot were digested for 6 h at 37 °C in 8 µl of trypsin Gold (5 ng/ µl trypsin in 20 mM ammonium bicarbonate) (Promega, Madison, WI, USA). The resulting peptides were dissolved in 50 % (v/v) acetonitrile containing 0.1 % (v/v) trifluoroacetic acid (TFA), dried at 53 °C and spotted on matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) plates, 0.7 µl of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid [7 mg ml<sup>-1</sup> acetonitrile 50 % (v/v) containing TFA 0.1 % (v/v)] was added to each extracted peptide mixture. Digestion and spotting were done using the Tecan freedom EVO200 (Tecan, Männedorf, CH).

For mass spectroscopy (MS) analysis, MALDI peptide mass spectra were acquired using the AB Sciex 5800 time-of-flight (TOF)/TOF (AB Sciex, Redwood City, CA, USA). For subsequent MS/MS analysis, 10 most intense peaks, excluding known contaminants, were selected and fragmented.

All spectra, MS and MS/MS, were submitted for database dependent identification using the NCBI nonredundant protein sequence database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) downloaded on June 6th, 2014 (40, 910, 947 sequences) reduced to the green plants Taxonomy (1717, 798 sequences) using an in-house MASCOT server (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>, London, UK). The parameters used for these searches were mass tolerance MS 100 ppm, mass tolerance MS/MS 0.5 Da, fixed modifications cysteine carbamidomethylation, and variable modifications methionine oxidation, simple and double oxidation of tryptophan, tryptophan to kynurenine.

Proteins were considered as identified when at least two peptides passed the MASCOT-calculated 0.05 threshold score of 30. However, when a high-scoring peptide (>2 times the 0.05 threshold) was matched and a protein p-value of <1 x 10e-5 was

obtained, the protein was also accepted. Subsequently, the MASCOT-based results were manually validated.

## **II.7 Immunoblot analysis**

The D-2DE results were validated using Western blot analysis with specific anti-globulin and anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibodies.

The samples were analyzed by 1D SDS PAGE using (Bio-Rad mini protean III system) in 10 % polyacrylamide (Laemmli buffer) gel and transferred to the nitrocellulose blotting membrane (GE Healthcare Life Science) using a Bio-Rad Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Cell at a constant current of 350 V for 1 h 15 min. After overnight incubation in blocking solution (phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4; 0.5 % Tween-20; 2 % non-fat dried milk), the membranes were incubated with either a primary rabbit anti-globulin polyclonal antibody (Beijing Protein Innovation Corporation) or a goat anti-GAPDH antibody, combined subsequently with horseradish peroxidase (GenScript) diluted 1:1000 in a 5 ml blocking solution for 1 h 30 min and then washed three times in PBS supplemented with 0.5 % Tween-20.

Immunodetection was conducted using an enhanced chemiluminescence (ECL) and Western blotting detection system (Amersham Biosciences, UK).

## **II.8 RNA extraction, first strand cDNA synthesis and qRT-PCR analysis**

Total RNA was isolated from the control and stressed calli using TRI Reagent (MPBio) as specified in the user manual. The quality and purity of the extracted RNA was determined by measuring the absorption at 260 and 280 nm, and the integrity of the preparations was verified with 1.2 % agarose gel electrophoresis.

In order to remove possible genomic DNA contamination, 5 µg of total RNA was treated with RNase-free DNase I (Promega) and then subjected to first strand cDNA using random hexamers and the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Life Technologies), following the manufacturer's instructions. The homology search for sequences of the selected clones was performed using the basic local alignment

sequence tool (BLAST)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>; <http://www.plantgdb.org/cgi-bin/blast/PlantGDBblast>).

Primer pairs were designed for three selected durum wheat genes (globulin3A, GAPDH and peroxidase) using Primer 3.0 web resource software (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Table 18 gives the selected genes and the corresponding designed primers. The transcript accumulation was analyzed using qRT-PCR with a Bio-Rad CFX96 thermocycler.

The PCR reactions were performed in triplicate using 0.3  $\mu$ M of each gene specific primer, 5  $\mu$ l GoTaq qPCR master mix (Promega) and 100 ng of corresponding cDNA in the final volume of 10  $\mu$ l.

The cycling conditions were: 2 min at 95 °C, followed by 45 cycles of 95 °C for 10 s and 60 °C for 30 s. Melting curve analysis followed each reaction in order to verify its specificity. The actin gene was used as an internal control to normalize all the data and the  $\Delta\Delta$ Ct method was used to calculate relative expression levels.

**Table 18.** Primer sequences used in the quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis to determine the transcript abundance of genes putatively involved in water stress tolerance in wheat.

Gene	Forward primers (5' to 3')	Reverse primers (5' to 3')
<b>Glo3</b>	GCCTCTCCTCGCTAGTTTGA	CTTCTCCTCCTCCTCCTTGC
<b>Actin</b>	ACCTTCAGTTGCCAGCAAT	CAGAGTCGAGCACAATACCAGTTG
<b>GAPDH</b>	CCAGTGCTGCTTGAATGATG	TGTCCATGCCATGACTGCAA
<b>Peroxidase</b>	ACTGGTTCTGGCCTTCGTTA	ACAGCACGATGCTCTCCAG

Actin transcripts were used as endogenous unregulated references.

## II.9 Statistical analysis

The data were analyzed using SPSS20 and MINITAB 17 software. The analysis was carried out using analysis of variance (ANOVA). For each parameter three experimental replicates were performed, followed by a Fisher comparison of means test

at 5 % levels. The homogeneous groups were separated using the Newman-Keuls test at 5 % levels.

### III. RESULTS AND DISCUSSION

#### III.1 Effect of osmotic stress on callus surface growth

Osmotic stress is a common consequence of several abiotic stresses such as drought, high salinity, and low temperature that causes severe cell dehydration and adversely affects plant growth and development. PEG has long been used to investigate the osmoadaptive responses after an osmotic shift or during growth at different osmotic pressures (Xiong et al. 2002).

PEG of high molecular weight is a non-penetrating inert osmoticum. This agent stimulates water stress by acting as osmotic agent which reduces the potential of the medium in where the cells are growing (Gulati and Jaiwal 1994). The response of calli growth to two PEG concentrations was assessed by means of the image analysis technique (Delporte et al. 2001). Pictures were taken at 30 days after the initiation of the embryogenic callus, digital images were analyzed by using the “Image Pro Plus” software. This non-invasive evaluation of growth allowed us to monitor the evolution of the calli until regeneration without removing them from their *in vitro* environment, thus without interfering on their development. The results given in Table 19 showed that there were highly significant differences among the wheat genotypes with distinct responses to two PEG levels (SI and SII, 10 and 20 % PEG, respectively).

**Table 19.** Effects of PEG concentrations on the callus surface (mm<sup>2</sup>) in three durum wheat varieties.

Genotypes	PEG concentrations			Value F	Value p<0.05
	C	SI	SII		
DK	73.86±7.66a	53.37±6.81c	42.88±7.76d	67.53	0.000
OZ	60.85±7.08b	36.64±8.32e	24.47±10.44f	67.63	0.000
W	43.77±6.82d	22.45±4.56f	9.21±3.79g	168.08	0.000

Means followed by the same letter are not statistically different according to the Fisher test (P<0.05). C=Control, SI=10% of PEG, SII=20% of PEG

Callus growth slowed down with the introduction of 10 % PEG in the culture medium (from 28 to almost 50 %, compared to control), and slowed further when PEG concentration was increased to 20 % (from 42 to almost 80 %, compared to control) (**Table 19**).

The decrease in growth rate varied from one genotype to another. The most severe growth slowdown was observed in the W variety, where the reduction rate of 48.70 % at the SI stress level (10 % PEG) increased significantly ( $p < 0.001$ ) with increasing stress (SII, 20 % PEG), reaching 78.95 %. The Oued Zenati variety seemed less affected by stress than Waha, with a reduction rate of 39.78 % at the SI level and 59.78 % at the SII level.

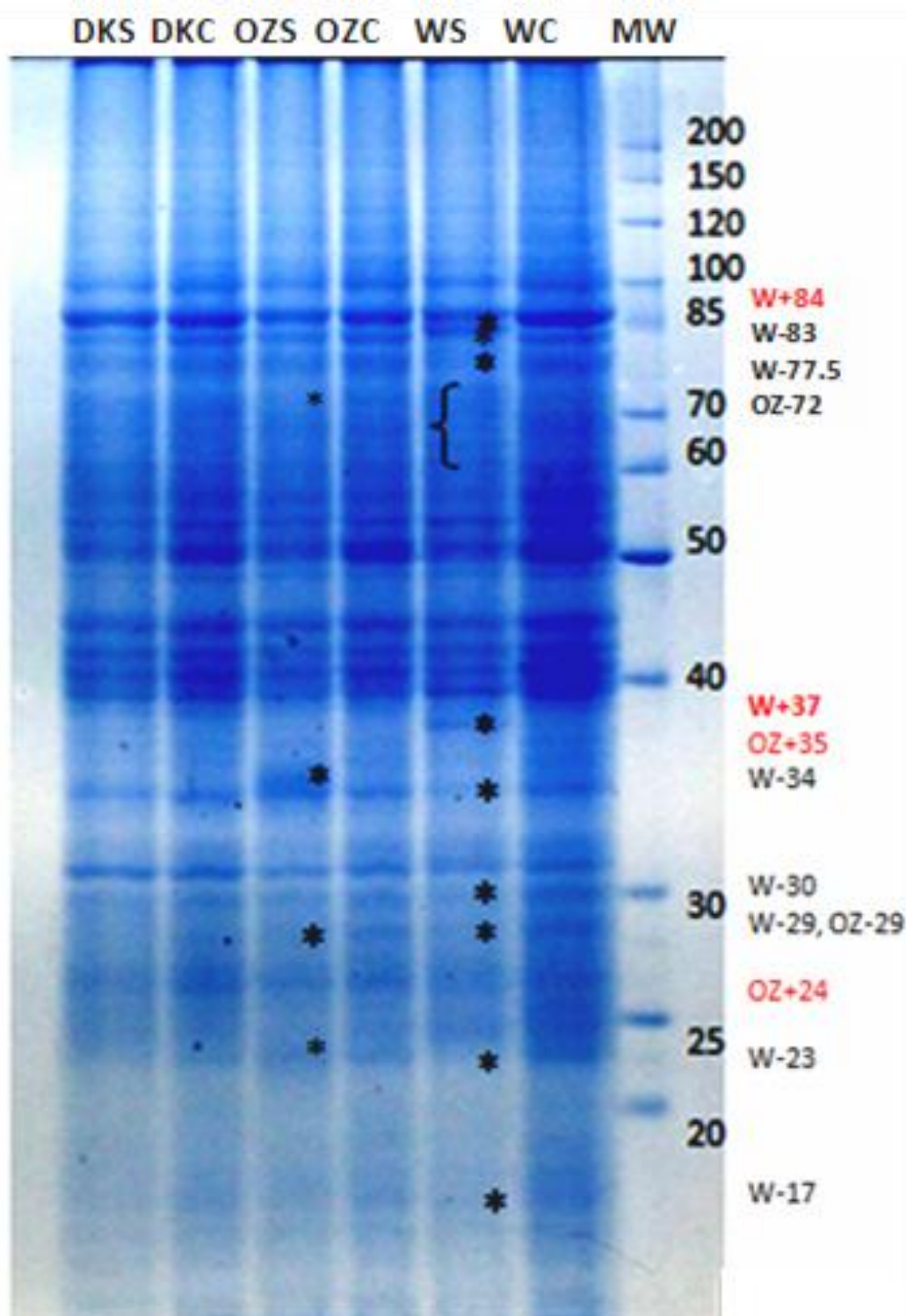
The Djenah Khetifa variety seemed to be the most tolerant, recording reduction rates of 27.74 and 41.94 % at the SI and SII levels, respectively, and also being the variety that produced the biggest embryogenic calli compared to Oued Zenati and Waha (**Table 19**). Based on the ability to growth on PEG enriched media, it appears that Djenah Khetifa is the most tolerant genotype under both moderate and high PEG levels (10 and 20 % PEG), followed by Oued Zenati, whereas Waha shows the greatest sensitivity, especially at high levels of PEG (20 %).

These observations suggest that metabolic responses to stress are not general but specific to the genotype. Similar results were obtained in durum wheat callus (Abdel-Hady and El-Naggar 2007). Our physiological study was combined with molecular approaches to identify biological factors associated with osmotic stress response in wheat calli.

### **III.2 One-dimensional electrophoresis**

1D SDS-PAGE can be a useful tool for revealing changes in proteome induced by exposure to osmotic stress induced by polyethylene glycol. Therefore, a comparative 1D SDSPAGE analysis of total protein extracts was performed on callus cultures collected 30 days after culture induction, either without or under 20 % PEG. Obvious differences were observed when comparing Oued Zenati and Waha with Djenah Khetifa (**Figure 18**).





**Figure 18.** Electrophoretic pattern of soluble proteins from callus cultures collected 30 days after culture induction, either without or under osmotic stress (20% PEG). S: stressed, C: control, MW: molecular weight markers in Kilo Daltons, Oued Zenati-OZ, Djenah Khetifa-DK and Waha-W.

1D SDS-PAGE of the water-soluble protein fraction revealed outstanding quantitative and qualitative differences between control and stressed calli in Oued Zenati, more variation in Waha, no detectable change in Djenah Khetifa. The results showed that exposing wheat callus to under 20 % PEG caused the disappearance of some bands, such as the 78, 34, 30 and 29 kDa polypeptides in Waha and the 72 and 29 kDa polypeptides in Oued Zenati. Stress also led to the observation of newly synthesized or more abundant polypeptides that were clearly detected in Waha (37 and 84 kDa) and Oued Zenati (35 and 24 kDa).

No change in the protein relative abundance profile was observed in Djenah Khetifa, the most tolerant variety to PEG 6000. In contrast, Oued Zenati and especially Waha (the most susceptible to PEG, **Figure 18**) showed the greatest changes. Together, these results indicate a positive correlation between the changes in the overall protein profile and water stress response at the cellular/tissue levels. These results are in agreement with those reported by Ashrafi et al. (2014), where the SDS-PAGE analysis showed that resistant genotypes in experimental fields had lower variation in the seed protein bands than sensitive genotypes that had the highest variation. Some experimental evidence suggests that drought-sensitive species and varieties have higher proteolytic activity than resistant ones (Hieng et al. 2004).

The presence of 20 % PEG affects callus proteins by inducing change (increase or decrease) in the protein bands pattern. Changes in protein expression, accumulation and synthesis have been observed in other species, as rice, after exposure to osmotic stress with PEG 6000 (Joshi et al. 2013). Abdel-Hady and El Neggar (2007) found that new proteins induced in response to varying PEG concentrations could be identified and could represent potential biomarkers for drought tolerance in wheat cultivars.

Plomion et al. (1999) suggested that water stress caused profound changes in cellular metabolism, as well as protein functions. They also reported that many genomic regions were involved in a complex regulation of these changes at the molecular level. It is possible that the synthesis of new proteins under stress conditions in susceptible varieties plays a role in the plant's response to water stress and could constitute a form of adaptation to stress. Stress in plants could be defined as any change in growth conditions that alters or disrupts metabolic homeostasis. This requires an adjustment of

metabolic pathways, aimed at achieving a new state of homeostasis, in a process that is usually referred to as acclimation (Shulaev et al. 2008).

Some newly synthesized proteins under stress conditions in susceptible varieties might be interpreted as potential candidates in the plant's response to water stress; i.e. the stress signaling networks and cascades that are induced in the attempt to re-establish or maintain cellular homeostasis under water deficiency. A relationship has been reported to exist between the accumulation of osmotic-induced proteins and physiological adaptations during water-deficit stress. From a practical point of view, as stated by Abdel-Hady and El-Naggar (Abdel-Hady and El-Naggar 2007), the newly induced protein bands could be used as markers for indirect selection for osmotic tolerance induced by PEG and this could support the development of drought-tolerant wheat cultivars.

### **III.3 Two-dimensional electrophoresis**

The individual proteins, which were separated by 1D SDS-PAGE, are often associated, *in vivo*, with each other, forming temporary, or stable larger protein complexes. Thus it is difficult to ascertain which proteins form a complex through IEF/SDS-PAGE alone (Zhang et al. 2014). In the present study, we describe a new electrophoretic procedure that improves the separation, identification and relative quantification of interesting proteins. We combined two successive electrophoreses within a single experiment, resulting in a method we named 'diagonal two-dimensional electrophoresis' (D-2DE), which was subsequently combined with mass spectrometry.

Like any 2D electrophoresis approach (e.g., NE, 2D-DIGE) that aims to map the proteome of a biological system given in the form of spots, this method compares the proteomes of the same biological system (Oued Zenati variety) under different conditions. We chose to analyze the gel area between 25 and 100 kDa because this was the area where most changes in protein accumulation due to water stress were observed.

1D SDS-PAGE is used to separate denatured proteins on the basis of their molecular weight. The first migration was conducted in Tris tricine SDS-PAGE.

Tricine, used as the trailing ion, allows a resolution of small proteins at lower acrylamide concentrations than in the Tris glycine-SDS-PAGE system.

1D SDS-PAGE Tris–glycine and Tris-tricine methods are widely used for separating high- and low-molecular mass proteins, respectively. The different separation characteristics of the two techniques relate directly to the strongly differing pK values of the glycine and tricine functional groups that define the electrophoretic mobilities of the trailing ions (glycine and tricine) in relation to the electrophoretic mobilities of proteins (Schägger 2006).

The results obtained showed very good reproducibility. Spots revealed with silver nitrate showed better resolution than with Coomassie Blue. We identified 16 conspicuous new spots in the cut area between 25 and 100 kDa in Oued Zenati stressed tissues, and this was compared with the control. Only the colored spots revealed with Coomassie Blue were identified by mass spectrometry (**Figure 19**). The system resolves most polypeptides and allows the rapid characterization of proteins with a wide range of molecular weights. This analysis method, that addresses the co-migration drawbacks, improved separation and gave highly reproducible gels with good spot resolution.

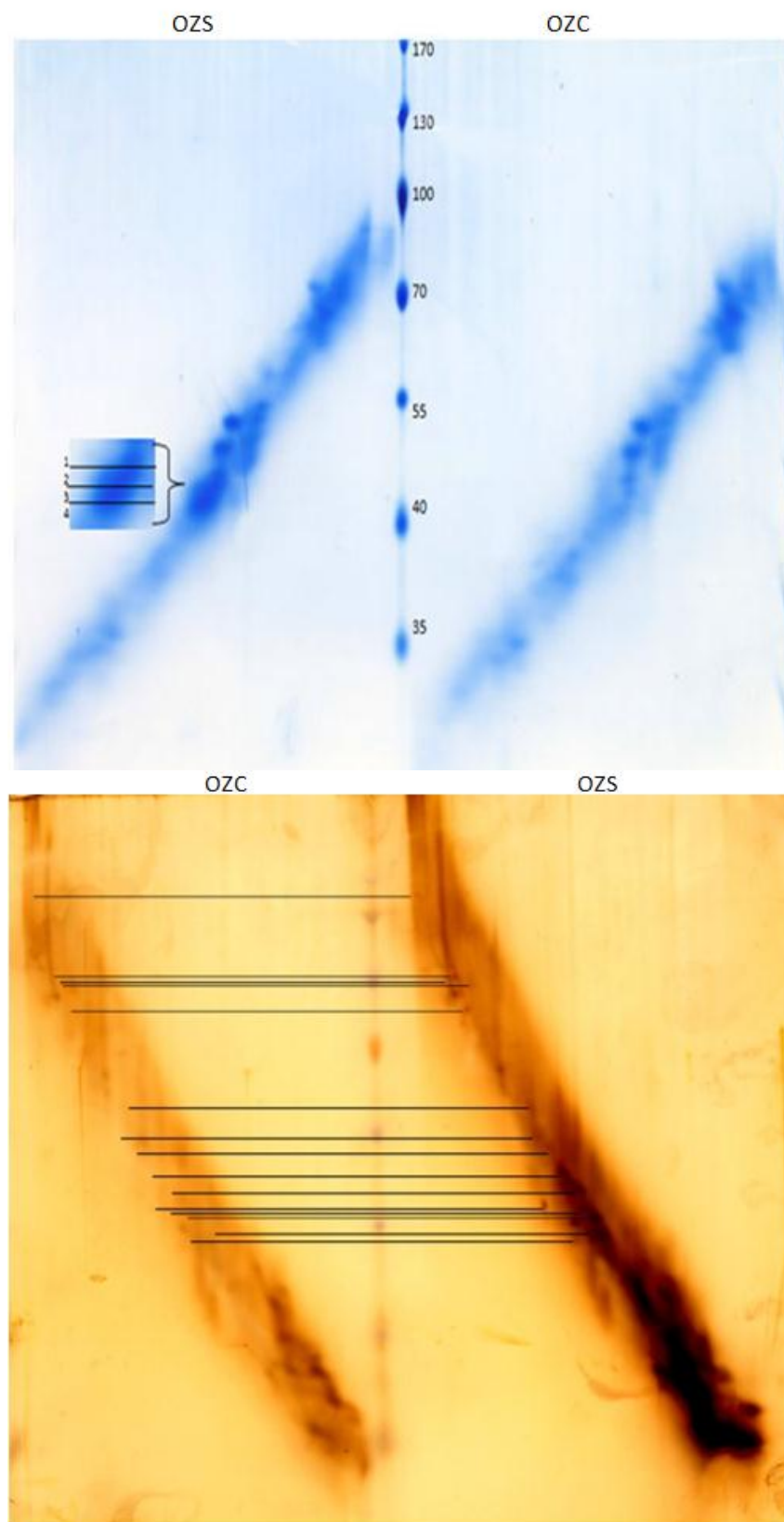
### III.4 Protein identification

Only those proteins with significant and reproducible changes were considered to be differentially accumulated. The one large spot colored with Coomassie Blue and the eight spots colored with silver nitrate (**Figure 19**) showed significant differences between the stressed and control calli. They were manually excised and analyzed using MALDI-TOF.

Although staining with silver nitrate gives a better resolution than Coomassie Blue staining, the identified proteins were obtained only from gels stained with Coomassie Blue. The amount of protein was probably too low or the staining protocol incompatible with MALDI. These identified proteins included: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Brassica juncea*) (spots 1 and 2); Triticum urartu globulin 1S allele (spots 1, 2 and 3), globulin 3-A (*Triticum aestivum*) (spots 3 and 4). Also, in spot 3 and 4 were identified predicted protein (*Hordeum vulgare*), we searched them against

Genbank and it revealed a 95 % match with peroxidase (*Triticum urartu*), *Triticum aestivum* cDNA clone H01\_1125\_plate\_3, mRNA sequence (spots 1 and 3) was identified as globulin-1S in *Setaria italica* or globulin 2 in *Zea mays*, with an 81 and 80 % homology, respectively, in spot 4 were identified as the hypothetical protein.

Functionally, the identified proteins were related to protein synthesis and carbohydrate metabolism; the hypothetical protein could be involved in drought stress but what functions they actually have requires further investigation (Ye et al. 2013). Details of these identified proteins are given in Table 20. The difference in the mobility of some spots could be attributed to post-translational modifications or allelic variations resulting from *in vitro* culture maintenance.



**Figure 19** Diagonal two-dimensional electrophoresis (D-2DE) of total proteins of callus expressing new proteins (S, stressed) compared with the control (C). Proteins were visualized using Coomassie Blue (gels up) and silver nitrate staining (gels below). Circles and a zoomed-in view show the proteins of interest identified by MALDI-time-of-flight (TOF)/TOF. The numbering corresponds to differentially expressed proteins. Gels were scanned using Typhoon 9400 (excitation wavelength of 532 nm).

**Table 20.** Proteins identified by MALDI-TOF/TOF from D-2DE gel electrophoresis of *Triticum durum* calli.

Spot ID	Protein name	gi/number	Species	Mass	Scor	Peptid
<b>B1</b>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<a href="#">gi51102306</a>	<i>Brassica juncea</i>	6719	107	K.LVSWYDNEWGYSTR.V
	Globulin 1S allele	<a href="#">gi474323981</a> <a href="#">gi414873301</a> <a href="#">gi/215398468</a>	<i>Triticum urartu</i>	55586	70	R.AFLQPSHHDAEIAFVR.E K.VLERFDHELLR.G K.EGEGVIVLLR.G K.ALRPFDEVSR.L
	cDNA clone H01_1125_plate_3, mRNA sequence	<a href="#">AL818841</a>	<i>Triticum aestivum</i>	14447	113	R.AFLQPSHYDAEIAFVR.E
<b>B2</b>	Globulin 1S	<a href="#">gi474323981</a> <a href="#">gi414873301</a>	<i>Triticum urartu</i>	55586	93	R.AFLQPSHHDAEIAFVR.E K.EGEGVIVLLR.G
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<a href="#">gi51102306</a>	<i>Brassica juncea</i>	6719	72	K.LVSWYDNEWGYSTR.V
<b>B3</b>	Globulin 3-A	<a href="#">gi390979705</a>	<i>Triticum aestivum</i>	66627	213	K.ALRPFDEVSR.L R.SFHALAQHDVR.V R.DTFNLLEQRPK.I
	Globulin 1S	<a href="#">gi474323981</a>	<i>Triticum urartu</i>	55586	60	K.VLERFDHELLR.G
	Predicted protein	<a href="#">gi326521510</a> <a href="#">gi474004599</a>	<i>Hordum vulgare</i>	37339	156	K.DAFFGQFAR.S R.AFLQPSHYDAEIAFVR.E
	cDNA clone H01_1125_plate_3, mRNA sequence	<a href="#">AL818841</a>	<i>Triticum aestivum</i>	14447	94	R.AFLQPSHYDAEIAFVR.E
<b>B4</b>	Globulin 3	<a href="#">215398470</a>	<i>Triticum aestivum</i>	66652	154	K.ALRPFDEVSR.L R.SFHALAQHDVR.V R.DTFNLLEQRPK.I
	Predicted protein	<a href="#">326521510</a>	<i>Hordeum vulgare</i>	37339	91	R.GLGDVADLVALSGAHTIG R.S
	hypothetical protein	<a href="#">307105297</a>	<i>Chlorella variabilis</i>	88357	61	R.EDGVVLALLR.D

### III.4.1 Globulins

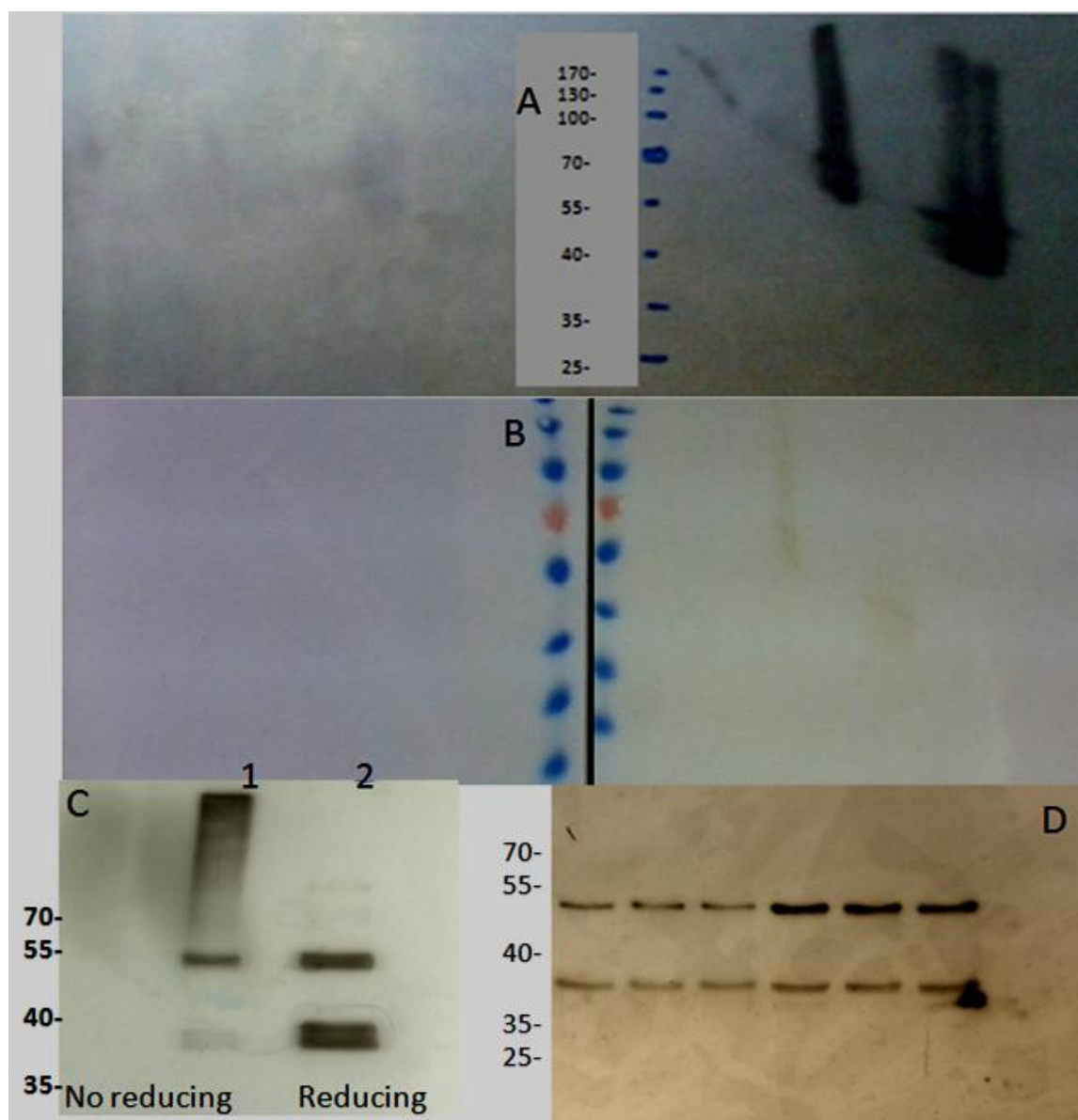
Two forms of globulins: globulin 1S (gi474323981) and globulin 3A (gi390979705) were identified under the effect of osmotic stress (**Figure 20.A**). This production could play a role in the acquisition of tolerance to dehydration. Analysis of the two sequences showed a 40.5 and 30.6 % amino acid similarity and identity, respectively (**Figure 21.A**).

The function of GLB1 is unknown; it is believed to serve as a storage protein (Kriz 1989). The best characterized monocot globulins are the maize embryo globulins (GLB) 1 and 2, each encoded by a single gene (Glb1 and Glb2) homologous to each other and to globulins of dicots (Dure 1990). The three most commonly occurring Glb1 alleles are designated L, I and S (for Large, Intermediate and Small proteins, respectively). By convention, the protein product of each allele is indicated in the upper case (e.g., Glb1-S encodes GLB1-S) (Belanger and Kriz 1989).

Immunofluorescence studies have found that Glo-3 gene products are located in the developing wheat seed embryo and aleurone layer (Loit et al. 2009). A recent study identified Globulin 3A as the first candidate wheat protein to be associated with the development of Type 1 diabetes (T1D) (MacFarlane et al. 2003).

It has been reported that the exposure of Type I callus (embryogenic callus) to abscisic acid or water stress induced the production of globulin 1 (Duncan et al. 2003). Few studies have shown an over-expression of globulins under stress, but several have reported this protein being less expressed under stress. Zhang et al. (2014) analyzed the accumulation of various storage protein classes from mature grains in wheat and found that albumin and gliadin concentrations increased significantly under drought stress, whereas globulin and glutenin did not markedly change in rice and oat, the high content of globulin storage proteins in the grains might contribute to the high nutritional value compared with other cereals, such as barley and wheat (Shewry and Halford 2002).

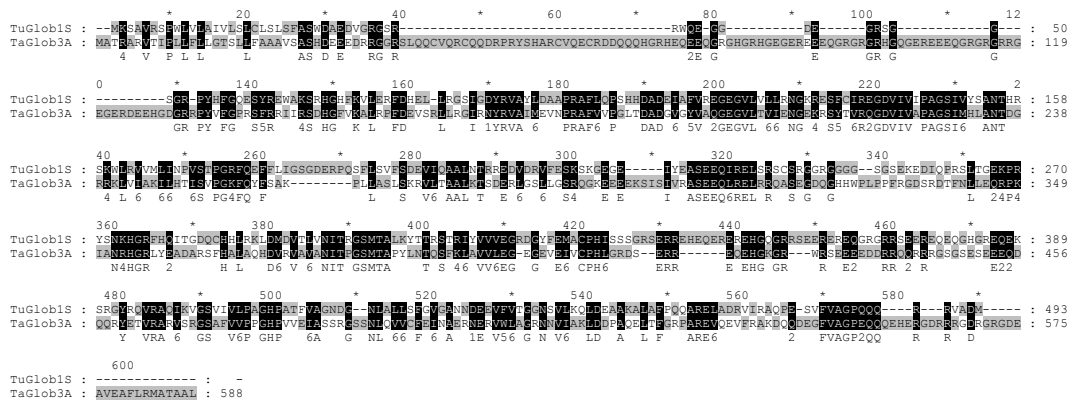




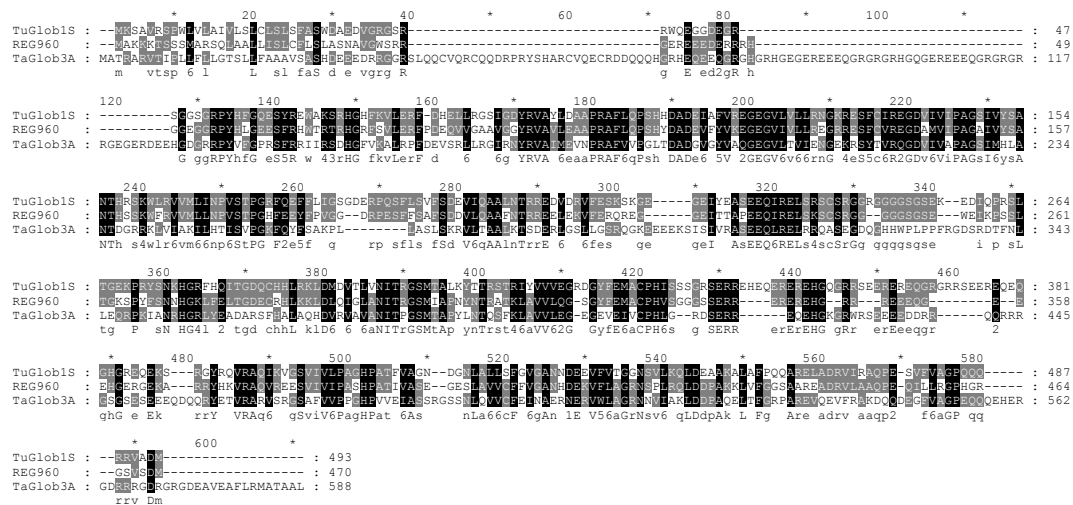
**Figure 20.** (A) Western blot analysis with REG 960 antibody on D-2DE gel electrophoresis; control (left), stressed (right). (B) Nitrocellulose membrane of the Western blot analysis in A; appearance of luminescence on stressed sample (left), but not on the control (right). The amount of luminescence detected was directly proportional to the amount of protein produced by the gene, being white under drought stress. (C) The extracts were fractionated on non reducing (1) or reducing (2) gel and immunoblotted with REG960 antibodies to show that globulins induced under drought stress were not connected by disulfide bonds. (D) Western blot analysis of GAPDH, with the upper band for stressed samples (4, 5, 6) showing more accumulation than the low band, compared with the control (1, 2, 3). Total proteins extracted from the OZ callus were fractionated using SDS-PAGE (10%), in triplicate.

Chapitre IV Diagonal two-dimensional electrophoresis (D-2DE): a new approach to study the effect of osmotic stress induced by polyethylene glycol in durum wheat (*Triticum durum* Desf).

A



B



C

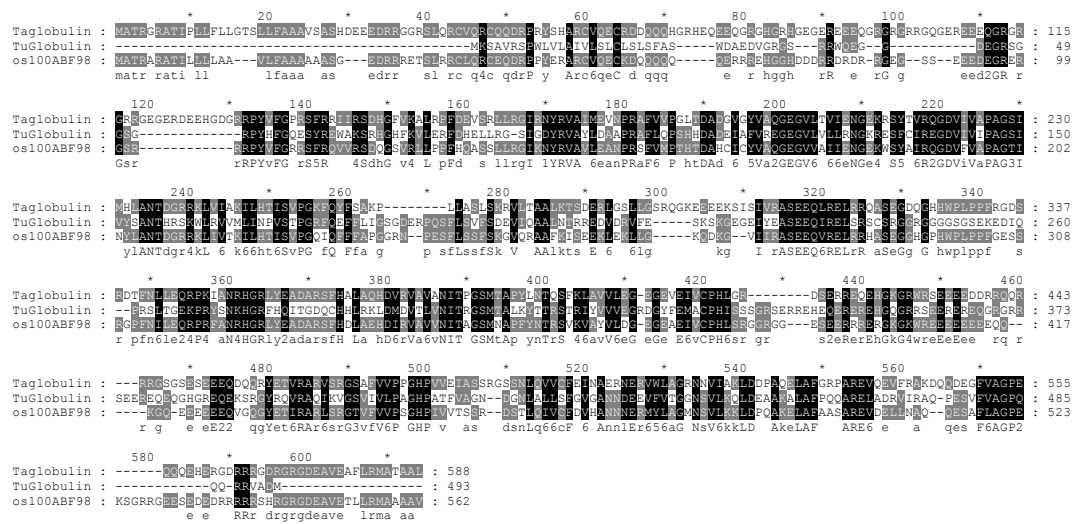


Fig. 21 Alignments of the amino acid sequences of TaGlob3A and TuGlob1S (a), TaGlob3A, TuGlob1S and rice REG960 (b), and TaGlob3A, TuGlob1S and REG100 proteins (c). Identical amino acids are shown with a black background; positive amino acids are shown with gray background.

Mushtaq et al. (2008) reported that globulin showed a 58 % decrease under osmotic drought stress conditions in rice. The globulin-2 proteins were identified in the proteomic study of a dough liquor fraction prepared from wheat flour (Salt et al. 2005). Interestingly, the levels of these proteins in the dough liquor increased when salt or salt plus ascorbate was included in the dough mixture. Salt is frequently included in commercial processes to improve breadmaking properties and has been shown to influence water absorption, dough development time, dough stability and loaf volume (Altenbach et al. 2009). Another investigation established that Globulin-2, a member of the cupin superfamily of proteins with similarity to known food allergens, was up-regulated from high temperature, reinforcing the hypothesis that there is a connection between the heat stress and the accumulation of some classes of wheat allergens (Altenbach et al. 2009).

In order to confirm these results we tested three antibodies (REG 960, REG 100 and REG 410), initially directed against the rice globulin (Zi et al. 2012). We chose to work with REG 960 because it gave the best results, showing 68.4 % positivity and 20.8 % identity with Glob S1 and Glob3A (**Figure 21.B**).

The alignment between GlobS1 and Glob3A with REG100 gave 76 and 22.5 % positivity and identity (**Figure 21.C**). With REG 410, however, the recognition rates were very low. Western blot analysis of the Oued Zenati callus revealed a significant increase in globulin under dehydration induced by osmotic stress. The results also indicated that there is a diverse group of globulins in wheat, some of which could be associated with osmotic stress tolerance.

#### **III.4.2 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase**

This enzyme was identified in spots 1 and 2 (**Table 20**) in the Oued Zenati callus in response to water stress, as well as in unstressed calli. Western blot analysis revealed the presence of two isoforms of GAPDH in the protein extracts. The enzyme accumulation was influenced by stress and, interestingly, the two isoforms that were present were regulated differently. Three isoforms of GAPDH have been identified to date: GAPA, GAPB and GAPC. In contrast to the findings in our study, these three isoforms decreased in wheat seedlings after 3 days of salt stress (Kamal et al. 2012).

For many decades, GAPDH has been regarded merely as a housekeeping glycolytic enzyme found mainly in the cytoplasm. Several recent studies, however, have suggested that it is a multifunctional protein (Sirover 1999, Chuang et al. 2005). Our results are in agreement with those reported by Laino et al. (2010) who studied the effect of high temperature on durum wheat total leaf proteins and showed that there was a GAPDH increase.

Using a proteomic approach, it was established that GAPDH activity in *Arabidopsis thaliana* was inhibited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, suggesting that GAPDH is a direct target of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and might have a role in mediating reactive oxygen species (ROS) signaling in plants (Hancock et al. 2005). A secondary function identified for GAPDH is as one of the allergens implicated in Baker's asthma (Tatham and Shewry 2008).

### III.4.3 Peroxidase

Peroxidases catalyze the hydrogen peroxide-dependent oxidation of substrates (RH<sub>2</sub>), in line with the general equation  $RH_2 + H_2O_2 \Rightarrow 2H_2O + R$ . Most studies have reported an increase in the activity of this enzyme under drought stress (Srivalli and Sharma Khanna-Chopra 2003, Jiang and Zhang 2004).

Plants increase the activity of some enzymes in removing ROS, such peroxidase, by stimulating gene expression in order to alleviate the adverse effects of oxidative stress caused by drought stress. Oxidative damage in plants caused by biotic and abiotic stresses is usually reduced by enzymatic antioxidants (superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase and catalase) and by non-enzymatic antioxidants (Zhang and Kirkham 1994). The ability of antioxidant enzymes to scavenge ROS and reduce their damaging effects might confer osmotic resistance on plants.

These results showed the effect of stress on the expression of this protein, despite the involvement of these proteins in other processes; Budak et al. (2013) performed proteomics analysis (IEF/SDS-PAGE) using two wild emmer wheat varieties TR39477 and TTD22, and one durum wheat cv. (Kızıltan). After 9 days of drought exposure, 75 differentially expressed proteins were detected with many being common

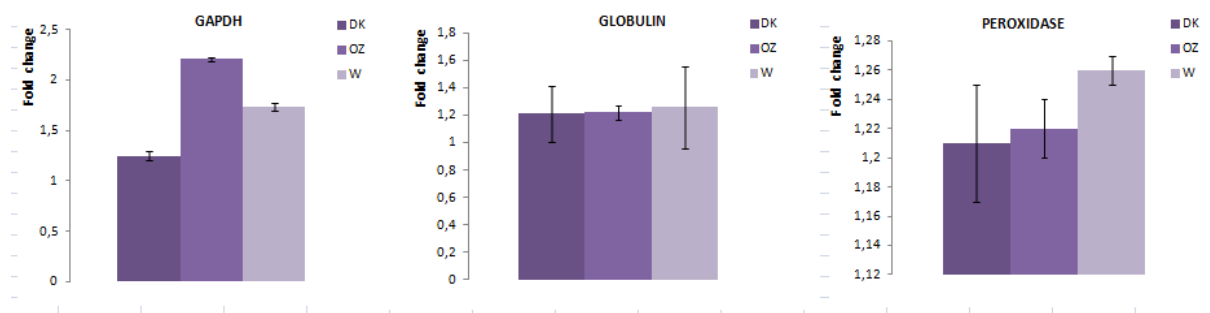
to all three wheat genotypes, e.g., manganese superoxide dismutase (MnSOD), a glutathione transferase (GST) showed increased expression in the durum wheat.

In order to better understand how plants respond and adapt to abiotic stresses, it is therefore important to pay greater attention to the cellular level.

### III.5 qRT-PCR analysis

Three proteins (GAPDH, globulin and peroxidase) identified by MALDI-TOF were examined at the mRNA expression level using qRT-PCR. Target gene expression was quantified using the comparative Ct (threshold cycle value) method of relative quantification ( $\Delta\Delta C_t$ ), as described by Livak and Schmittgen (Livak and Schmittgen 2001). Primer specificity was tested using conventional PCR, followed by electrophoretic migration through 1.2 % agarose gel.

Transcript accumulation on the three selected genes was quantified by qRT-PCR. The results showed that under osmotic stress, GAPDH, globulin and peroxidase were slightly up-regulated (no more than 1.74-fold) over the control, apart from Oued Zenati with GAPDH (**Figure 22**). The bars in the histograms indicated no differences between treatments which confirm the reproducibility of the technique.



**Figure 22** Fold changes in the accumulation of GAPDH, globulin and peroxidase gene transcripts in the calli of DK, OZ and W under drought stress, obtained using qRT-PCR. The relative quantity of the target gene transcripts was calculated using the comparative  $\Delta\Delta C_t$  method. The stressed calli were quantified relative to the controls after 30 days. Actin

was used as an endogenous control to normalize the data for input RNA differences among the samples.

Generally, the expressions of the GAPDH, globulin and peroxidase protein genes at the mRNA level were not in line with their expression at the protein level. Our results are in accord with the works of Budak et al. (2013) for example for RuBisCO; RT-qPCR revealed a marked decrease in transcript levels in all three genotypes upon drought stress. However, at the proteome level, all genotypes exhibited elevated levels in response to drought.

Similarly for Glutathione transferase; the transcript and protein levels of genotype TR39477 showed a contrasting pattern of regulation upon drought stress. Thus, GST appears to be down regulated at the transcriptome level but upregulated at the proteome level in response to drought.

Comparative transcriptomic approaches aimed at highlighting differentially expressed genes have been successfully used against both biotic and abiotic stresses (Ergen and Budak 2009, Kantar et al. 2011).

The identification of differentially expressed genes solely, however, is generally not enough to unravel the underlying molecular mechanisms of water-deficit stress because several transcripts are known to undergo transcriptional, translational and post-translational modifications. Thus, the comparative proteomics approach has emerged as a powerful and promising tool for investigating stress response in plants (Peng et al. 2009, Zhang et al. 2010, Gao et al. 2011, Abdalla and Rafudeen 2012).

#### **IV CONCLUSION**

This study described a simple procedure based on the combination of two successive electrophoreses. It is SDS compatible and provides a rapid characterization of proteins with a wide range of molecular weights, even using a very small amount of proteins. Some of the proteins that changed under dehydration induced by osmotic stress are considered to be allergens, such as globulin and GAPDH, suggesting that people sensitive to these proteins might be adversely affected by wheat products

exposed to stress factors; the over expression of globulins under osmotic stress could improve grain nutritional quality. The correlation between mRNA and protein expressions is low because of various factors, such as different half-lives and post-transcription machinery. Sometimes, proteomic analysis might be more appropriate in the study of water stress in wheat than transcriptomic analysis.

The analysis of organ-specific protein abundance provided rich information on the response mechanisms of plants to abiotic stress. Greater focus on these proteins at the cellular level (callus) could contribute to a better understanding of how plants respond and adapt to abiotic stresses and could help identify candidate genes for molecular breeding studies.

# Discussion générale et conclusion



Une embryogenèse bien maîtrisée constitue pour le sélectionneur un outil extrêmement utile. Son atout réside dans le fait qu'un stress particulier peut être imposé *in vitro* aux cellules du cal; seules les cellules tolérantes sont capables de croître pour générer la plante avec le caractère souhaité en un temps limité.

Cette étude a été conduite avec comme objectif de tester la faisabilité de la sélection *in vitro* pour la tolérance au stress hydrique (0%, 10% et 20% de PEG 6000) sur des cals de trois géotypes de blé dur (*Triticum durum* Desf) obtenus à partir d'embryons matures. Une variabilité génétique a pu être observée à chaque étape du processus morphogénique de l'embryogenèse somatique, depuis les premières étapes de la prolifération et de la formation de cals jusqu'à la formation et la maturation somatique et leur conversion en plantules.

La méthode d'évaluation, non invasive, de la croissance des cals s'est révélée efficace et utile puisqu'elle permet de suivre, avec précision, l'évolution de la croissance des cals jusqu'à la régénération et sans interférer avec leur développement ou leur environnement *in vitro*.

La présence du PEG dans le milieu de culture réduit le potentiel hydrique du milieu ce qui affecte la division cellulaire entraînant une diminution dans l'induction et la croissance du cal et par conséquent le potentiel de régénération. Le phénomène de régénération est une étape très critique car elle conditionne la réponse globale du géotype à la culture *in vitro*.

La concentration de 10% de PEG étant plus propice pour l'embryogenèse somatique et consécutivement à la régénération de plantes. Cependant, le doublement de la concentration de PEG exerce un effet dépressif sur le nombre de cals régénérateurs, ainsi que sur leur capacité régénératrice. D'autre part, nous avons enregistré une continuation de prolifération des cals en présence de PEG, et principalement en présence du niveau élevé de stress (20%), pour les trois géotypes. Les cals sélectionnés sont considérés comme tolérants au stress hydrique.

Le génotype précoce présente une plus grande tolérance aux niveaux de stress (10% et 20% PEG) et une plus grande capacité de prolifération en maintenant des potentialités callogènes et régénératifs élevées.

Il est probable que les gènes qui contrôlent la callogenèse et l'embryogenèse ne soient pas les mêmes.

L'ensemble des caractères étudiés pourraient constituer de très bons indicateurs du niveau de tolérance des génotypes étudiés, du pouvoir callogène, embryogène et régénératif, cela à des stades précoces de culture *in vitro*. Ces paramètres pourraient être adoptés comme une étape préliminaire pour un criblage rationnel consolidé par des travaux de recherche *in situ*.

Le passage par cal est une étape primordiale en sélection *in vitro* parce que ce tissu végétal est une source importante de variabilité génétique. Dans notre travail, l'orientation de la variation somaclonale au niveau des tissus callogènes a également été recherchée par l'emploi de différents niveaux de PEG. Des variations dans les profils des produits d'amplification SSR ont été constatées chez les somaclones de la première génération de blé dur. Cinq variants somaclonaux ont été identifiés avec les locus *gwm131* et *gwm427*. Ces marqueurs permettent de révéler avec plus de précision l'existence de variations du génome du matériel végétal analysé. La majorité de ces variations ont été identifiées chez des plantes qui ont pour origine des cals stressés. Ces constatations nous conduisent à suggérer que la variation somaclonale est une conséquence de la mise en culture *in vitro*, que les processus qui la déterminent peuvent être influencés par la présence de stress et sont en partie, tout au moins, de nature génétique. La réalisation de test de stabilité dans les générations qui suivent en présence de stress hydrique permettrait de confirmer la sélection ou non de variants somaclonaux tolérant au stress hydrique.

Nous avons analysé les changements dans l'expression des protéines totales extraites des cals, subissant ou non l'effet du PEG 20%, par électrophorèse monodimensionnelle classique. Le PEG20% a amené à l'inhibition de certaines protéines, la surexpression de certaines d'autres et à l'apparition de nouvelles protéines. Ces changements dans les taux d'expression ont été observés uniquement chez les cals de la variété Oued Zenati et encore plus avec la variété Waha réputée sensible.

Cependant aucune différence d'expression n'a été observée avec la variété Djenah Khetifa, considérée comme la plus tolérante des trois. Il est probable qu'un génotype tolérant présente moins de variation qu'un génotype sensible.

Les protéines séparées par SDS-PAGE sont souvent associées, *in vivo*, avec d'autres protéines formant des complexes protéiques temporaires ou stables. Il est donc difficile de s'assurer quelles protéines forment un complexe au moyen de l'IEF / SDS-PAGE seul (Zhang et al. 2014). La nouvelle méthode d'électrophorèse diagonale bidimensionnelle (D-2DE) que nous décrivons améliore la séparation, l'identification et la quantification des protéines intéressantes. En effet, le système résout la plus part des polypeptides et permet une caractérisation rapide des protéines de différentes masses moléculaires. Cette méthode d'analyse, qui soulève l'inconvénient de la co-migration, améliore la quantité de l'échantillon biologique analysé (60µg) ainsi que la qualité de la séparation et donne des gels hautement reproductibles avec une très bonne résolution des spots.

Les protéines candidates identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF sont impliquées dans divers processus comme la biosynthèse, le métabolisme glucidiques et la tolérance à la déshydratation. Certaines de ces protéines sont considérées comme allergènes, telles que la globuline et la GAPDH.

Nos travaux sont en accord avec les expériences de Zhou et al. (2016) publiées récemment sur une lignée de substitution de blé tendre (CS-1Sl (1B) Chinese Spring/*Aegilops longissima*). Les auteurs ont identifié plusieurs formes de globulines, ils ont démontré que la globuline-1 codée par le chromosome 1S<sup>1</sup> est surexprimée dans les conditions de déficit hydrique. Ils ont conclu que sa synthèse pourrait être une forme d'adaptation ou de tolérance à la sécheresse.

Les résultats d'alignement entre les deux séquences de globulines (1S/3A) révèlent des pourcentages de similarité et d'identité de 40,5 et 30,6%, respectivement. Un arbre phylogénétique, regroupant les séquences protéiques des globulines 1S/3A ainsi que les globulines appartenant à différentes familles, a été construit à l'aide du logiciel MEGA5 (Tamura et al. 2011). L'analyse révèle que la protéine globuline 1S de *Triticum urartu* et celle de la globuline 3A de *Triticum aestivum* appartiennent au même

sous-groupe ; et que la globuline de l'orge (*Hordeum vulgare*) est la plus proche des deux globulines 1S et 3A (**Annexe 4**).

L'analyse de l'abondance de protéines spécifiques au stade cal fournit de nouvelles informations sur les mécanismes de réponse des plantes face aux stress hydrique. Une plus grande attention pour ces protéines au niveau cellulaire pourrait contribuer à une meilleure compréhension de la façon dont les plantes réagissent et s'adaptent aux stress abiotiques et pourrait aider à identifier des gènes candidats pour des études de sélection moléculaire.

Les expériences de Western blot D-2DE réalisées à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines globuline et GAPDH ont montré que ces protéines ont été différenciellement exprimées sous l'effet du stress hydrique. Ces résultats ont permis de valider les résultats de l'électrophorèse diagonale bidimensionnelle et de montrer l'existence de l'impact du stress osmotique sur la synthèse de ces protéines au niveau des cals de la variété Oued Zenati.

L'immunoblot réalisé avec l'anticorps REG960, après électrophorèse en conditions natives, confirme que cette protéine n'est pas reliée avec des ponts disulfures. Cet anticorps servira pour de future caractérisation des globulines par immunoblot chez le blé dur en réponse au stress hydrique.

Pendant longtemps, la GAPDH a été considérée comme une simple enzyme glycolytique se trouvant principalement dans le cytoplasme ; elle est souvent utilisée comme gène rapporteur en immunoblot et en PCR en temps réel. Notre étude par Western blot a montré que la GAPDH est composée de deux sous-unités. Une isoforme semble être activée par le stress hydrique. Des analyses complémentaires devront être effectuées pour pouvoir identifier ces deux types d'isoformes.

Pour chaque variété nous avons mesuré le niveau d'expression des ARNm de trois gènes candidats (globuline1S, GAPDH et peroxidase) afin de comparer les résultats avec les données protéomiques. Les valeurs d'expression des gènes ont été normalisées par rapport à l'expression du gène de référence actine. La méthode comparative ( $\Delta\Delta Ct$ ) de Livak et Schmittgen (2001) a été utilisée pour calculer

l'expression relative des gènes candidats. Le rapport des concentrations gène d'intérêt/gène témoin a été la mesure représentative du niveau d'expression du gène étudié.

Pour cette étude, nous avons mis en évidence l'expression différentielle de la globuline 1S, GAPDH et peroxidase au niveau transcriptionnel. Cependant, ces gènes étaient légèrement surexprimés, ne dépassant pas 1.74 fold, mise à part le gène de la GAPDH exprimé chez la variété Oued Zenati qui enregistre un fold supérieur (2.2). D'une manière générale, il semble que les quantités d'ARNm sont partiellement corrélées aux quantités de protéines. Parfois, même si un ARNm est abondamment transcrit, la protéine correspondante peut être faiblement produite si cet ARN a une très faible durée de vie ou s'il est faiblement traduit. D'autre part, de nombreuses protéines subissent des modifications post-traductionnelles importantes qui modifient fortement leur activité. Dans ce cas, les profils d'expression ne donnent aucune idée de ce que le niveau de régulation. Il sort de cette étude que l'analyse protéomique est plus adaptée pour l'étude du stress hydrique chez le blé dur que l'analyse transcriptomique.

Cette première étude montre que l'analyse protéomique par l'approche D-2DE peut être utilisée pour mettre en évidence des gènes candidats dont l'expression est directement modifiée par le stress hydrique. Les protéines identifiées offrent de nouvelles perspectives quant à la façon dont les cals réagissent face au stress hydrique; la surexpression constitutive des protéines candidates par génie génétique peut être utilisée pour améliorer la tolérance à la sécheresse des plantes cultivées telles que le blé dur.

# Références bibliographiques

- Abdalla KO, Rafudeen MS (2012) Analysis of the nuclear proteome of the resurrection plant *Xerophyta viscosa* in response to dehydration stress using iTRAQ with 2DLC and tandem mass spectrometry. *J Proteom* 75:2361–2374
- Abdallah C, Dumas-Gaudot E, Renaut J, Sergeant K (2012) Gelbased and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance. *Int J Plant Genom* 17 18: 195-205
- Abdel-Hady MS, El-Naggar HMH (2007) Wheat genotypic variation and protein markers in relation with *in vitro* selection for drought tolerance. *J Appl Sci Res* 3: 926-934
- Abdel-Hady MS, Esmail RM Abdel-Hamid AM (2003) *In vivo* predication for salt tolerance in wheat. *Egypt. J. Agron* 25: 15-24
- Abdelsamad A, El-Sayed OE, Ibrahim F (2007) Development of drought tolerance haploid wheat using biochemical genetic markers on *in vitro* culture. *J. Appl. Sci. Res* 3: 1589-1599
- Acta Physiol Plant 33:2541–2545 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Adkins SW, Kunanuvatshidah R, Godwin ID (1995) Somaclonal variation in rice drought tolerance and other agronomic characters. *Aust. J. Bot* 43:201-209
- Ahloowalia BS (1982) Plant regeneration from callus cultures in wheat. *Crop Sci* 22: 405-410
- Ahmad P, Hameed A, AbdAllah EF, Sheikh SA, Wani MR, Rasool S, Jamsheed S, Kumar A (2014) Biochemical and molecular approaches for drought tolerance in plants. In *physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment*. Springer, New York, pp 1-29
- Ali Dib T, Monneveux P, Acevedo E, Nachit MM (1994) Evaluation of proline analysis and chlorophyll fluorescence quenching measurements as drought tolerance indicators in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). *Euphytica* 79: 65-73
- Alikina O, Chernobrovkina M, Dolgov S, Miroshnichenko D (2016) Tissue culture efficiency of wheat species with different genomic formulas. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 16: 1307-314

- Altenbach SB, Tanaka CK, Hurkman WJ, Vensel WH (2009) Expression of globulin-2, a member of the cupin superfamily of proteins with similarity to known food allergens, is increased under high temperature regimens during wheat grain development. *J Cereal Sci* 49: 47-54
- Ashrafi R, Najaphy A, Shaban M et al. (2014) Comparing protein pattern and drought tolerant indicators as screening techniques for drought tolerance in common wheat genotypes. *Int J Plant Anim Environ Sci* 4: 251-258
- Attab S, Brinis L (2012) Etude comparative de la réponse physiologique de deux variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) à l'infection par *Blumeria graminis* f.sp.tritici agent causal de l'oïdium. *Rev. Sci. Technol. Synthèse* 25: 82-87
- Attree SM, Moore D, Sawhney VK, Fowke LC (1991) Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce (*Picea glauca* [Moench.] Voss) somatic embryos: effects of a nonplasmolysing water stress and abscisic acid. *Ann. Bot* 68: 519-525
- Barakat MN, Abdel-Latif TH (1995) Somatic embryogenesis in callus from mature and immature embryo culture of wheat. *Alex. J. Agric. Res* 40:77-95
- Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24: 23-58
- Begum MK, Islam MO, Miah MAS, Hossain MA, Islam N (2011) Production of somaclone *in vitro* for drought stress tolerant plantlet selection in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *The Agriculturists* 9:18-28
- Belanger FC, Kriz AL (1989) Molecular characterization of the major maize embryo globulin encoded by the Gibi Gene1. *Plant Physiol* 91: 636–643
- Belkhir K, Borsa P, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bellatreche A, Gaouar SBS (2012) Preliminary genetic study of some varieties of durum wheat and bread wheat in the wilaya of Tlemcen and the influence of the environment on their yields. *Science and Nature* 4: 37-42
- Benderradji (2013) Sélection *in vitro* pour la tolérance aux stress salin et thermique chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.). Thèse de doctorat. Univ. Frères Mentouri. Constantine. 143p



- Bi R, Wang H (2008) Primary studies on tissue culture from mature embryos in diploid and tetraploid wheat. *Front. Agric. China* 2: 262-265
- Biswas B, Chowdhury, Bhattacharya A, Mandal B (2002) *In vitro* screening for increases drought tolerance in rice. *In Vitro Cell Development Biology of Plant* 38: 525-530
- Bouiamrine EH, Diouri M, El-Halimi R (2012) Assessment of somaclonal variation in regenerated plants from immature embryos culture of durum wheat. *Int. J. Agric. Biol* 14: 941-946
- Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Bressan RA, Hasegawa PM, Handa AK (1981) Resistance of cultured higher plant cells to polyethylene glycol induced water stress. *Plant Sci. Lett* 21: 23-30
- Brini F, Hanin M, Lumbreras V, Amara I, Khoudi H, Hassairi A, Pagès M, Masmoudi K (2007) Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 26: 2017-2026
- Brown JR, Hartley BS (1966) Location of disulphide bridges by diagonal paper electrophoresis. *Biochem J* 101: 214-228
- Budak H, Akpinar BA, Unver T, Turktas M (2013) Proteome changes in wild and modern wheat leaves upon drought stress by two-dimensional electrophoresis and nanoLC-ESI-MS/MS. *Plant Mol Biol* 83: 89-103
- Buiatti M (1989) Use of cell and tissue cultures for mutation breeding. *Vötrr Pflanzenzüchtung* 16: 179-200
- Caboni E, Anselmi S, Donato E, Manes F (2003) *In vitro* selection of *Actinidia deliciosa* clones tolerance to NaCl and their molecular and *in vivo* ecophysiological characterisation. *Acta Hort* 618: 77-83
- Carbonero P, Salcedo G, Sanchez-Monge R, Garcia-Maroto F, Royo J, Gomez L, Mena M, Medina J, Diaz I (1993) A multigene family from cereals which encodes inhibitors of trypsin and heterologous  $\alpha$ -amylases. In: Aviles FX, editor. *Innovations in proteases and their inhibitors*. Berlin: Walter de Gruyter, pp 333-348

- Chauhan H, Desai SA, Khurana P (2007) Comparative analysis of the differential regeneration response of various genotypes of *Triticum aestivum*, *Triticum durum* and *Triticum dicoccum*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 91:91-199
- Chehat F (2006) Les politiques céréalières en Algérie. In : Hervieu B. (dir). *Agri-Med : Agriculture, pêche, alimentation et développement rural durable dans la région méditerranéenne*. CIHEAM 87-116
- Chen J, Yue R, Xu H, Chen X (2006) Study on plant regeneration of wheat mature embryos under endosperm-supported culture. *Agri. Sci. China* 5:572-578
- Chuang DM, Hough C, Senatorov VV (2005) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 269-290
- Colomba MS, Gregorini A (2011) Genetic diversity analysis of the durum wheat *Graziella Ra, Triticum turgidum* L. subsp. durum (Desf.) Husn. (Poales, Poaceae). *Biodiversity Journal* 2: 73-84
- Crespan M, Milani N (2001) The Muscats: A molecular analysis of synonyms, homonyms and genetic relationship within a large family of grapevine cultivars. *Vitis* 40: 23-30
- Croston RP, Williams JT (1981) A world survey of wheat genetic resources IBRGR. *Gultein* 80: 59-37
- D'Amato F (1985) Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerants. *CRC Crit Rev Plant Sci* 3: 73-112
- Damerval C, de Vienne D, Zivy M, Thiellement H (1986) Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7: 52–54
- Danos O, Svinartchouk F (2006) Dialysis-assisted two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 27: 3475-3479
- Debaeke P, Cabelguenne M, Casals, ML, Puech J (1996) Élaboration du rendement du blé d'hiver en conditions de déficit hydrique. II. Mise au point et test d'un modèle de simulation de la culture de blé d'hiver en conditions d'alimentation hydrique et azotée variées: Epicphase-blé. *Agronomie* 16: 25-46
- Delporte F, Mostade O, Jacquemin JM (2001) Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 67: 73–80

- Dhanda SS, Sethi GS, Behl RK (2004) Indices of drought tolerance in wheat genotypes at early stages of plant growth. *J. Agron Crop Sci* 190: 6-12
- Diez R, Herbstreith M, Osorio C, Alzate O. 2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (DIGE) in Neuroproteomics. In: Alzate O, editor. *Neuroproteomics*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2010. Chapter 4
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15
- Duby et Robin (2010) *Analyse en Composantes Principales*. INRA Paris-Grignon
- Duncan DR, Kriz AL, Paiva R, Widholm JM (2003) Globulin-1 gene expression in regenerable *Zea mays* (maize) callus. *Plant Cell Rep* 21: 684-689
- Duncan RR (1997) Tissue culture-induced variation and crop improvement. *Adv Agron* 58: 201-240
- Dure L III (1990) An unstable domain in the vicilin genes of higher plants. *New Biologist* 2: 487-493
- Ehsanpour AA, Razavizadeh A (2005) Effect of UV-C on drought tolerance of alfalfa (*Medicago sativa*) callus. *Am. J. Biochem. Biotech* 1: 107-110
- Elyasi P, Farshadfar E, Aghaee M (2012) Response of bread wheat genotypes to immature embryo culture, callus induction and drought stress. *Current Research Journal of Biological Sciences* 4: 372-380
- Ergen NZ, Budak H (2009) Sequencing over 13,000 expressed sequence tags from six subtractive cDNA libraries of wild and modern wheats following slow drought stress. *Plant Cell Environ* 32: 220-236
- Evans DA (1989) Somaclonal variation—genetic basis and breeding applications. *Trends Genet.* 5: 46-50
- Faedi W, Quarta R, Persano S, Paoloni FM, Damiano C (1993) Somaclonal variations in plants regenerated by anther culture of cv. Pajaro. *Acta Horti* 348: 427-431
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev* 29: 185–212

- Farshadfar E, Kianifar S, Chaghakabodi R (2015) GT biplot analysis of genetic diversity in bread wheat using *in vitro* indicators of drought tolerance. *Biological Forum – An International Journal* 7: 1439-1447
- Feillet P (2000) *Le grain de blé : composition et utilisation*. Paris, FRA : Editions INRA 308 p
- Feldman M (2001) Origin of cultivated wheat. In: Bonjean AP, Angus WJ, eds. *The world wheat book: a history of wheat breeding*. Paris, France: Lavoisier Publishing 3-56
- Galiba G, Kovacs G, Sutka J (1986) Substitution analysis of plant regeneration from callus culture in wheat. *Plant Breeding* 97: 261-263
- Gana JA, Sharma GC, Zipf A, S. Saha, Roberts J, Wesenberg DM (1995) Genotype effects on plant regeneration in callus and suspension cultures of *Avena*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40: 217-224
- Gandonou H, Errabii T, Abrinii J et al (2005) Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane. *African Journal of Biotechnology* 4: 1250-1255
- Gao L, Yan X, Li X, Guo G, Hu Y, Ma W, Yan Y (2011) Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). *Phytochemistry* 72: 1180-1191
- Gao MW, Cheng XY, Liang ZQ, Hu TC (1994) Study on the effect of *in vitro* mutagenesis of somatic tissue of wheat. *Acta Agon. Sin* 20: 18-25
- George EF (1993). *Plant propagation by tissue culture. Part 1: The Technology*. (2nd Ed) Exegetic, Somerset, UK
- Görg A, Postel W, Günther S (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9: 531-46
- Gulati A, Jaiwal PK (1994) *In vitro* selection and characterization of *Vigna radiata* cell line resistant to PEG induced drought stress. *Acta Physiol. Plant* 16: 53-60
- Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R (2000) Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9390-9395
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R (1999) Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Mol Cell Biol* 19: 1720-1730

- Hall RD (1991) The initiation and maintenance of callus cultures of carrot and tobacco. In: Lindsey K (ed) Plant tissue culture manual. Supplement 3. Kluwer, The Netherlands, pp1-19
- Hama-Ali EO, Tan SG (2014) Using Monomorphic Microsatellite Markers in Oil Palm (*Elaeisguineensis* Jacq.). Research and Reviews: Journal of Botanical Sciences 3: 1-6
- Hamrick JL, Godt JW (1997) Allozyme diversity in cultivated crops. Crop Sci 37: 26-30
- Hancock JT, Henson D, Nvirenda M, Desikan R et al. (2005) Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in Arabidopsis. Plant Physiol Biochem 43: 828-835
- Harlan JR (1975) Our vanishing genetics resources. Science 188: 618-621
- Heinze DJ, Mee GWP (1971) Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus culture. Am J Bot. 58: 257-262
- Heringer AS, Vale EM, Barroso T, Santa-Catarina C, Silveira V (2013) Polyethylene glycol effects on somatic embryogenesis of papaya hybrid UENF/CALIMAN 01 seeds. Theoretical and Experimental Plant Physiology 25: 116-124
- Hieng B, Ugrinovic` K, Sustar-Vozlie` J, Kidrie` M (2004) Different classes of proteases are involved in the response to drought of Phaseolus vulgaris L. cultivars differing in sensitivity. J Plant Physiol 161: 519-530
- Higgins P, Mathias RJ (1987) The effect of the 4B chromosomes of hexaploid wheat on the growth and regeneration of callus cultures. Theoretical and Applied Genetics 74: 439-444
- Hsissou D (1994) Sélection *In vitro* et caractérisation de mutants de blé dur tolérants à la sécheresse. Thèse de doctorat. Univ. Catholique de Louvain. 167p
- Itier B (2008) Agriculture et sécheresse : le contexte et les enjeux. Innovations Agronomiques 2: 1-8
- Jain SM (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica 118: 153-166
- Jiang M, Zhang J (2004) Abscisic acid and antioxidant defense in plant cells. Acta Bot Sin 46: 1-9

- Jin S, Mushke R, Zhu H, Tu L, Lin Z, Zhang Y, Zhang X (2008) Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell. Rep* 27: 1303-1316
- Joshi R, Shukla A, Kumar P (2013) *In vitro* water deficit stress induced genotypic alterations in protein profile among aromatic rice varieties. *Ann Plant Sci* 2: 455-458
- Kacem NS (2005) Embryogenèse somatique et variation somaclonale chez le blé dur et tendre (culture d'embryons matures et immatures). Mémoire de magister, Université, Mentouri- Constantine. 144p
- Kacem NS, Mauro S, Muhovski Y, Delporte F, Renaut J, Djekoun A, Watillon B (2016) Diagonal twodimensional electrophoresis (D-2DE): a new approach to study the effect of osmotic stress induced by Polyethylene Glycol in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Mol Biol Rep* 43: 897-909
- Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol Biol* 43: 179-88
- Kamal AH, Cho K, Kim D, Uozumi N, Chung K, Lee SY et al (2012) Changes in physiology and protein abundance in saltstressed wheat chloroplasts. *Mol Biol Rep* 39: 9059-9074
- Kantar M, Lucas SJ, Budak H (2011) miRNA expression patterns of *Triticum dicoccoides* in response to shock drought stress. *Planta* 233: 471-484
- Karim R, Chlyah H, Douira A et 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, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 15: 523-534
- Kasem ZA, Abdelkareem AA (2005) Somaclonal variation in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Field performance of somaclones. *Cereal Research Communications* 33: 485-492
- Khan M, Ganai BA, Kamili AN, Akbar M (2013) Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis of somaclonal variation in *Artemisia amygdalina* Decne. plantlets regenerated from nodal explants. *J New Biol Rep* 2: 40-43
- Kim YJ, Shanmugasundaram S, Yun SJ, Park HK, Park MS (2001) A simple method of seedling screening for drought tolerance in soybean. *Korean J Crop Sci* 46: 284-288

- Klose J (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26: 231-43
- Kosová K, Vítámvás P, Prášil IT (2014) Proteomics of stress responses in wheat and barley-search for potential protein markers of stress tolerance. *Front Plant Sci* 5: 711
- Kriz AL (1989) Characterization of embryo globulins encoded by the maize Gib genes. *Biochem Genet* 27: 239-251
- Kumar S, Mangal M, Dhawan AK, Singh N (2011) Assessment of genetic fidelity of micropropagated plants of *Simmondsia chinensis* (Link) Schneider using RAPD and ISSR markers.
- Laino P, Shelton D, Finnie C, De Leonardis AM, Mastrangelo AM, Svensson B, Lafiandra D, Masci S (2010) Comparative proteome analysis of metabolic proteins from seeds of durum wheat (cv. Svevo) subjected. *Proteomics* 10: 2359-68
- Lamaze T, Tousch D, Sarda X, Grignon C, Depigny-This D, Monneveux P, Belhassen E (1994) Résistance des plantes à la sécheresse : mécanismes physiologiques. *Le sélectionneur Français* 45: 75-85
- Landjeva S, Neumann K, Lohwasser U, Börner A (2008) Molecular mapping of genomic regions associated with wheat seedling growth under osmotic stress. *Biologia Plant* 52: 259-266
- Larkin PJ, Ryan SA, Brettell RIS, Scowcroft WR (1984) Heritable somaclonal variation in wheat. *Theor Appl Genet* 67: 443-455
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation- a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet* 60: 197-214
- Legrand S (2006) Etude transcriptomique au cours des phases précoces de l'embryogenèse somatique chez la chicorée (*Cichorium intybus* L). Thèse de Doctorat. Université de l'Ille 1. 185p
- Lesage V (2011) Contribution à la validation fonctionnelle du gène majeur contrôlant la dureté/tendreté de l'albumen du grain de blé par l'étude de lignée quasi-isogénique. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal. 236p

- Levitt J (1980) Responses of Plants to Environmental Stresses: Water, Radiation, Salt and Other Stresses. Academic Press, New York (2<sup>nd</sup> edn) 365-402
- Li ZY, Xia GM, Chen HM, Guo GQ (1992) Plant regeneration from protoplast derived from embryogenic suspension culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) J Plant Physiol 139: 714-718
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25: 402-408
- Loit E, Melnyk CW, MacFarlane AJ, Scott FW, Altosaar I (2009) Identification of three wheat globulin genes by screening a *Triticum aestivum* BAC genomic library with cDNA from a diabetes- associated globulin. BMC Plant Biol 9:93
- MacFarlane AJ, Burghardt KM, Kelly J, Simell T, Simell O, Altosaar I, Scott FW (2003) A type 1 diabetes-related protein from wheat (*Triticum aestivum*). J Biol Chem 278: 54–63
- Mackey J (1968) Species relations in *Triticum*. Proc. 2nd International Wheat Genetic Symposium, Hereditas 2: 237-276
- Maddock SE, Lancaster VA, Risiott R, Franklin J (1983) Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescence of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). J Exptl Bot 34: 915-926
- Mansouri S, Kobaissi A, Nziengui H, Fakiri M, Shekafandeh A, Sibi M (2005) Gynogenèse *in vitro* chez quelques variétés de blé dur du Maghreb et du Moyen Orient (*Triticum durum* L.) pour l'obtention de régénérants chlorophylliens, en conditions de stress salins. Geo Eco Trop 29 : 77-88
- Matheka JM, Magni E, Rasha AO, Machuka J (2008) *In vitro* selection and characterization of drought tolerant somaclones of tropical maize (*Zea mays* L.). Biotechnology 7: 641- 650
- Mathias RI, Fukui K (1986) The effect of specific chromosome and cytoplasmic substitution on the tissue culture response of wheat (*T. aestivum*) callus. Theoretical and Applied Genetics 71: 797–800



- 
- Medini M, Hamza S, Rebai A, Baum M (2005) Analysis of genetic diversity in Tunisian durum wheat cultivars and related wild species by SSR and AFLP markers. *Genet Resour Crop Ev* 52: 21-31
  - Mefti A, Abdelguerfi A, Chebouti A (2000) Etude de la tolérance à la sécheresse chez quelques populations de *Medicago truncatula* (L.). *Field Crops Research* 66: 165-174
  - Mehta YR, Angra DC (2000) Somaclonal variation for disease resistance in wheat and production of dihaploids through wheat x maize hybrids. *Genetics and Molecular Biology* 23: 617-622
  - Meng S, Zhang C, Su L, Li Y, Zhao Z (2016) Nitrogen uptake and metabolism of *Populus simonii* in response to PEG-induced drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 123: 78-87
  - Mohamed MAH, Harris PJC, Henderson J (2000) *In vitro* selection and characterization of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*, *Plant Science* 159: 213-222
  - Moon HK, Park SY (2008) Somatic embryogenesis and plantlet production using rejuvenated tissues from serial grafting of a mature *Kalopanax septemlobus* tree, *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 44: 119-127
  - Morey LC, Blashfield RK, Skinner HA (1983) A comparison of cluster analysis techniques within a sequential validation framework. *Multivariate Behavioral Research* 18: 309-329
  - Mujumdar RB, Ernst LA, Mujumdar SR, Lewis CJ, Waggoner AS (1993) Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug Chem* 4: 105-11
  - Murashige T, Skoog F (1962) A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479
  - Mushtaq R, Katiyar S, Bennett J (2008) Proteomic analysis of drought stress-responsive proteins in rice endosperm affecting grain quality. *J Crop Sci Biotech* 11: 227-232
  - Nabors MW, Gibbs SE, Bernstein CS, Meis ME (1980) NaCl-tolerant tobacco plants from cultured cells. *Z. Pflanzenphysiol. Bd* 97: 13-17

- Nag DK, Suri M, Stenson EK (2004) Both CAG repeats and inverted DNA repeats stimulate spontaneous unequal sister-chromatid exchange in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 32: 5677-5684
- Nawaz S, Ahmed N, Iqbal A, Khaliq I (2013) Optimization of regeneration protocols for wheat under drought and salt stress. *J Agri Sci* 50: 663-670
- Nei. M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590
- Nevo E (1998) Genetic diversity in wild cereals: regional and local studies and their bearing on conservation *ex situ* and *in situ*. *Genet Res Crop Evol* 45: 355-370
- Nichane M, Khelil MA (2014) Changements climatiques et ressources en eau en Algérie: vulnérabilité, impact et stratégie d'adaptation. *Revue des BioRessources* 4: 1-7
- Nookaraju A, Agrawal DC (2012) Genetic homogeneity of *in vitro* raised plants of grapevine cv. Crimson Seedless revealed by ISSR and microsatellite markers. *S Afr J Bot* 78: 302-306
- O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins *J Biol Chem* 250: 4007-21
- Ong SE, Pandey A (2001) An evaluation of the use of twodimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomol Eng* 18: 195-205
- Ortiz M L, Calero M, Fernandez Patron C, Patron C F, Castellanos L, Mendez L (1992) Imidazole-SDS-Zn reverse staining of proteins in gels containing or not SDS and microsequence of individual unmodified electroblotted proteins. *FEBS Lett* 296: 300-4
- Osborne TB (1907) The proteins of the wheat kernel. Publ. 84. Carnegie Inst. Washington, DC. 119pp
- Özgen M, Türet M, Altinok S, Sancak C (1998) Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Rep* 18: 331-335
- Özgen M, Türet M, Ozcan S, Sancak C (1996) Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. *Plant Breeding* 115: 455-458

- Ozias-Akins P, Vasil IK (1982) Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* (L. Wheat): evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma* 110: 95-105
- Patade VY, Suprasanna P, Bapat VA, Kulkarni UG (2006) Selection for abiotic (salinity and drought) stress tolerance and molecular characterization of tolerant lines in sugarcane. *Bhabha Atomic Research Centre Newsletters* 27: 244-257
- Peng Z, Wang M, Li F, Lv H, Li C, Xia G (2009) A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat. *Mol Cell Proteom* 8: 2676-2686
- Plomion C, Costa P, Dubos C, Frigerio JM, Guehl JM, Queyrens A (1999) Genetical, physiological and molecular response of *Pinus pinaster* to a progressive drought stress. *J Plant Physiol* 155: 120-129
- Popescu AN, Isac VS, Coman MS, Radulescu MS (1997) Somaclonal variation in plants regenerated by organogenesis from callus culture of strawberry (*Fragaria X ananassa*). *Acta Hort* 439: 89-96
- Queiros F, Fidalgo F, Santos I, Salema R (2007) *In vitro* selection of salt tolerant cell lines in *Solanum tuberosum* L. *Biologia Plantarum* 51: 728-734
- Rabilloud T, Strub JM, Luche S, van Dorsselaer A, Lunardi JA (2001) A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* 1: 699-704
- Rahman MH, Rajora OP., 2001 Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant Cell Rep* 20: 531-536
- Ranjbarfordoei A, Samson R, Van Damme P, Lemeur R (2001) Effects of Drought Stress Induced by Polyethylene Glycol on Pigment Content and Photosynthetic Gas Exchange of *Pistacia Khinjuk* and *P. Mutica*. *Photosynthetica* 38: 443-447
- Riou C (1993) L'eau et la production végétale. *Sécheresse* 2: 75-83
- Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal MW (1998) A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007-2023
- Roy B, Mandal AB (2005) Towards development of Al-toxicity tolerant lines in indica rice by exploiting somaclonal variation. *Euphytica* 145: 221-227

- 
- Ryan SA, Larkin PJ, Ellison FW (1987) Somaclonal variation in some agronomic and quality characters in wheat . *Theor Appl Genet* 74: 77-82
  - Salekdeh G, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J (2002) Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* 2: 1131-1145
  - Salt LJ, Robertson JA, Jenkins JA, Mulholland F, Mills ENC (2005) The identification of foam-forming soluble proteins from wheat (*Triticum aestivum*) dough. *Proteomics* 5: 1612-1623
  - Santoni V, Molloy M, Rabilloud T (2000) Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* 21: 1054-70
  - Sato M, Kawabe T, Hosokawa M, Tatsuzawam F, Doi M (2011) Tissue culture induced flower-color changes in Saintpaulia caused by excision of the transposon inserted in the flavonoid 39, 59 hydroxylase (F3959H) promoter. *Plant Cell Rep* 30: 929-939
  - Schägger H (2006) Tricine–SDS-PAGE. *Nat Protoc* 1: 16-22
  - Schägger H, Jagow GV (1987) *Anal Biochem* 166: 368-379
  - Schulze ED, Beck E, Müller-Hohenstein K (2005) *Plant ecology*. Springer. Berlin 117-143
  - Shah MM, Khalid Q, Khan UW et al (2009) Variation in genotypic responses and biochemical analysis of callus induction in cultivated wheat. *Genet Mol Res* 8: 783-793
  - Sharma D, Kumar. N, Pandey. V, Shankhdhar S. C, Shankhdhar. D (2016) *In vitro* evaluation of antioxidant potential under drought stress in endangered drought stress in endangered drought stress in endangered withania somnifera. *The Bioscan* 11: 93-99
  - Shewry PR, Halford NG (2002) Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot* 53: 947-958
  - Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58: 221-227
  - Shulaev V, Cortes D, Miller G, Mittler R (2008) Metabolomics for plant stress response. *Physiol Plant* 132: 199-208

- Sibi M (1996) Vitro-variation, potentialités nouvelles et sélection *in vitro*. In: AUPELF-UREF. éd. Biotechnologies Végétales. Rennes. CNED, 7- 54
- Sirover MA (1999) New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1432: 159-184
- Smith RH, Bhaskaran S, Miller FR (1985) Screening for drought tolerance in sorghum using cell culture. *In Vitro Cell Dev Biol* 21: 541–545
- Srivalli BG, Sharma Khanna-Chopra R (2003) Anti oxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress following by recovery. *Physiol Planta* 119: 503–512
- Stasolla C, van Zyl L, Egertsdotter U, Craig D, Liu W, Sederoff RR (2003) The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. *Plant Physiology* 131: 49–60
- Sun Z X, Zhao C Z, Zheng K L, Qi X F, Fu Y (1983) Somaclonal genetics of rice *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet* 67: 67-73
- Sunaryo W, Widoretno W, Nurhasanah, Sudarsono (2016) Drought tolerance selection of soybean lines generated from somatic embryogenesis using osmotic stress simulation of poly-ethylene glycol (PEG). *Nusantara Bioscience* 8: 45-54
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739
- Tang CY, Liu CC, Hwang SC (2000) Improvement of the horticultural traits of Cavendish banana (*Musa* spp., AAA group I). Selection and evaluation of a semi-dwarf clone resistant to *Fusarium* wilt. *J Chin Soc Hortic Sci* 46: 173-182
- Tatham AS, Shewry PR (2008) Allergens to wheat and related cereals. *Clin Exp Allergy* 38: 1712-1726
- Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Ac. Res.* 16: 6463-6471
- Unlu M, Morgan ME, Minden JS (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18: 2071-7

- 
- Vachon M, Beaulieu-Prévost D, Ouellette A, Achille M (2005) Analyse de classification hiérarchique et qualité de vie. *Tutorials in Quantitative Methods for Psychology* 1: 25-30
  - Vasil V, Vasil IK (1982) The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. In cultured immature embryos. *Bot. Gaz* 143: 454-465
  - Vensel WH, Tanaka CK, Cai N, Wong JH, Buchanan BB, Hurkman WJ (2005) Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *Proteomics* 5: 1594-1611
  - Viertel K, Schmid A, Iser M, Hess D (1998) Regeneration of German spring wheat varieties from embryogenic scutellar callus. *Journal of Plant Physiology* 152: 167-172
  - Ward KA, Jordan MC (2001) *In Vitro* cellular and development biology. *Plant* 37: 361-368
  - Widoretno W, Megia R, Sudarsono (2003) Responses of soybean somatic embryos to polyethylene glycol and its uses for *in vitro* selection of soybean against drought stress. *Hayati* 10: 134-139
  - Wilkins M, Sanchez J, Gooley A, Appel R, Humphery-Smith I, Hochstrasser D, Williams K (1995) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnological and Genetic Engineering Review* 13: 19-50
  - Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14: 65–83
  - Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcription regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Ann Rev Plant Biol.* 57: 781-803
  - Ye JX, Wang SP, Zhang FJ, Xie DQ, Yao YH (2013) Proteomic analysis of leaves of different wheat genotypes subjected to PEG 6000 stress and rewatering. *Plant Omics* 6: 286-294
  - Yu Y, Wei ZM (2008) Influences of cefotaxime and carbenicillin on plant regeneration from wheat mature embryos. *Biologia Plantarum* 52: 553-556

- Yusnita Y, Widodo W, Sudarsono S (2005) *In vitro* selection of peanut somatic embryos on medium containing culture filtrate of *Sclerotium rolfsii* and plantlet regeneration. HAYATI J Biosci 112: 50-56
- 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 Organ Culture 73: 237-244
- Zalc JM, Wicr HB, Kidwell KK, Steber CM (2004) Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. Plant Cell Tissue and Organ Culture 76: 277-281
- Zhang JX, Kirkham MB (1994) Drought-stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. Plant Cell Physiol 35: 785-791
- Zhang M, Li G, Huang W, Bi T, Chen G, Tang Z, Su W, Sun W (2010) Proteomic study of *Carissa spinarum* in response to combined heat and drought stress. Proteomics 10: 3117-3129
- Zhang M, Wang H, Dong Z, Qi B, Xu K, Liu B (2010) Tissue culture induced variation at simple sequence repeats in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) is genotype-dependent and associated with down-regulated expression of a mismatch repair gene, MLH3. Plant Cell Rep 29: 51–59
- Zhang Y, Huang X, Wang L, Wei L, Wu Z, You M, Li B (2014) Proteomic analysis of wheat seed in response to drought stress. J Integr Agric 13: 919-925
- Zhou J, Ma C, Zhen S, Cao M, Zeller FJ, Hsam SLK, Yan Y (2016) Identification of drought stress related proteins from 1S<sup>1</sup> (1B) chromosome substitution line of wheat variety Chinese Spring. Botanical Studies 57: 2-10
- Zi J, Zhang J, Wang Q, Lin L, Tong W, Bai X, Zhao J, Chen Z, Fu X, Liu S (2012) Proteomics study of rice embryogenesis: Discovery of the embryogenesis-dependent globulins. Electrophoresis 33: 1129-1138

# *Annexe*



**ANNEXE 1****Sommes des carrés de l'analyse de la variance des différentes variables mesurées.**

Source de variation	ddl	Sommes des carrés						ddl	Sommes des carrés
		TIC	EC	SCC	PCE	RP	ER		TR
<b>Variété</b>	2	58 <sup>***</sup>	455 <sup>***</sup>	1432 <sup>***</sup>	2066 <sup>***</sup>	969 <sup>***</sup>	1223 <sup>***</sup>	2	3358.7 <sup>***</sup>
<b>Stress PEG</b>	2	39 <sup>***</sup>	3024 <sup>***</sup>	1354 <sup>***</sup>	7366 <sup>***</sup>	4908 <sup>***</sup>	4110 <sup>***</sup>	1	2302.9 <sup>***</sup>
<b>Variété X stress PEG</b>	4	0.8 <sup>***</sup>	231 <sup>***</sup>	13 <sup>*</sup>	578 <sup>***</sup>	193 <sup>*</sup>	140 <sup>**</sup>	2	382.8 <sup>**</sup>
<b>Erreur</b>	36	0.1	0.8	4.9	11.2	72	25	24	38.38

Temps d'induction des cals (TIC), Efficacité de la callogenèse (EC), surface des cals embryogènes (SCC), Production de cals embryogènes (PCE), Régénération des plantes (RP), Efficacité de régénération (ER) et tolérance relative (TR). <sup>\*</sup>, <sup>\*\*</sup> et <sup>\*\*\*</sup> significatifs seuil de : 0.1 %, 1% et 5%.

**ANNEXE 2****Protocole d'extraction d'ADN selon Doyle et Doyle (1990).**

- Préchauffer le **tampon d'extraction** à 60°C (Doyle and Doyle 1990).
- Ajouter 600 µl de tampon d'extraction CTAB préchauffé à 65 °C.
- Incuber à 60°C pendant 30minutes en agitant de temps à autre
- Ajouter 600µl de Chloroform/Alchool Isoamylique (24 :1)
- Mélangé doucement en inversent plusieurs fois la cupule
- Centrifuger 15 minutes à 10000rpm à température ambiante.
- Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube Eppendorf
- Précipiter avec 216µl de NaCl (2M final) et mélanger
- Reprécipiter avec 2 volumes d'éthanol (1512µl)
- Mélanger doucement par inversion
- Centrifuger 10 minutes à 10000rpm à 4°C.
- Laver le culot à l'éthanol 70%
- Resuspendre le culot dans 50µl de TE.
- Laisser dissoudre
- Ajouter 2µl de ARNase
- Laisser agir à température ambiante pendant 30 minutes et stocker à -20°C.



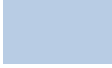
**Composition du tampon d'extraction de l'ADN génomique (Doyle and Doyle, 1990)**

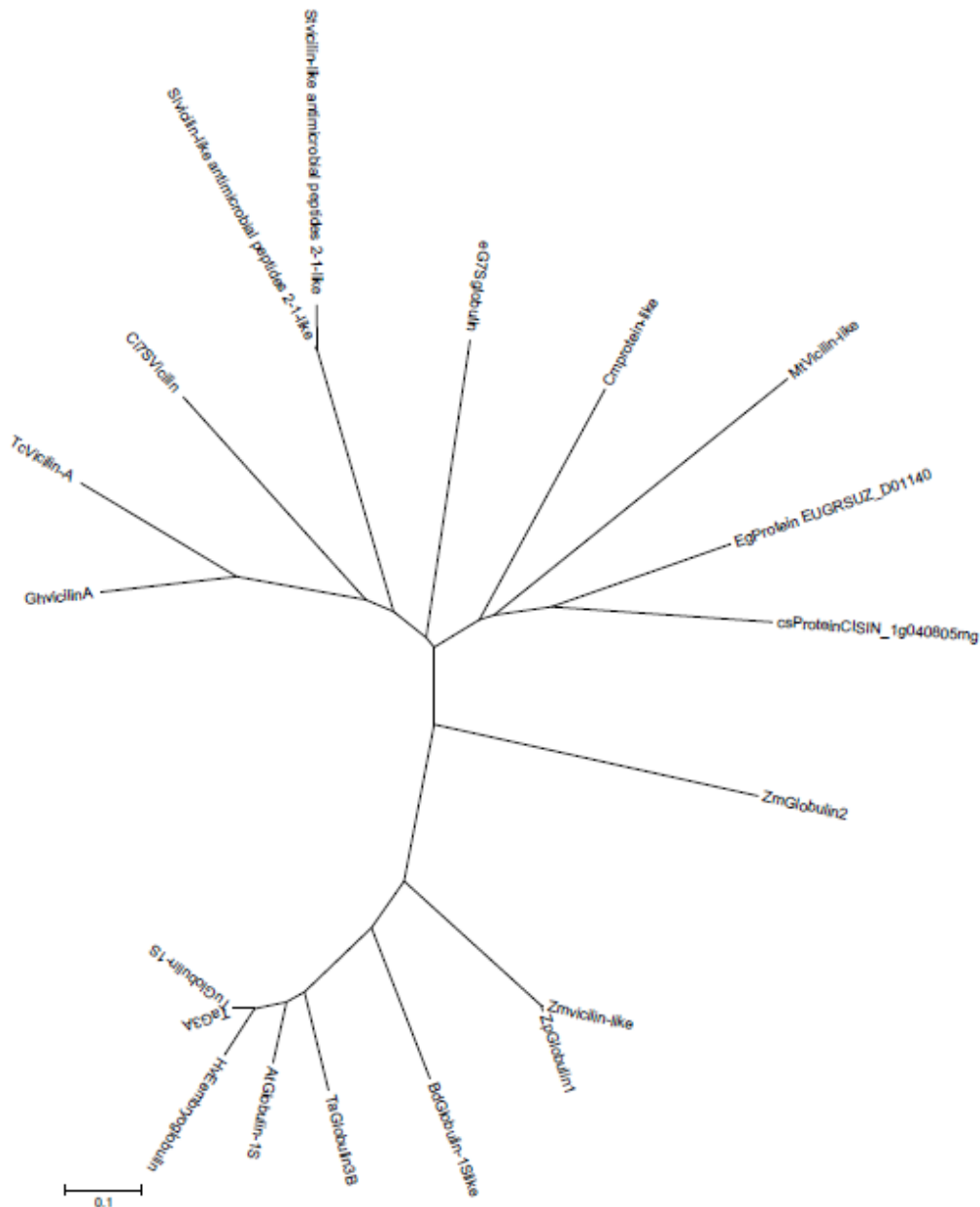
<b>Concentrations initiales</b>	<b>Concentrations finale</b>
10ml Tris HCl 1M	100Mm
10ml EDTA 200 mM, pH 8.5	20 Mm
28ml NaCl 5M	1.4M
200µl de b-mercaptoéthanol	0.2%(v/v)
2g de CETAB	2% (m/v)
1g de PVP	1% (m/v)
5ml de Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 10Mm	0.5 mM
H <sub>2</sub> O stérile	100 ml

**ANNEXE 3****Chargement des échantillons pour LI-COR**

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	M	OZ100	W100	DK100	W100	DK100	OZ100	DK300
B	DK100	OZ100	W100	OZ100	W100	DK100	W100	DK300
C	DK100	OZ100	DK100	OZ100	W100	OZ100	W100	DK300
D	DK100	W100	DK100	OZ100	DK300	OZ100	W100	OZ300
E	OZ300	W300	OZ300	W300	DK300	W300	M	
F	OZ300	DK300	OZ300	W300	OZ300	W300		
G	W300	DK300	OZ300	DK300	OZ300	W300		
H	W300	DK300	W300	DK300	OZ300			

M      Marqueur (350pb)

	<i>gwm131</i>
	<i>gwm135</i>
	<i>gwm427</i>

**ANNEXE 4****Arbre phylogénétique des globulines**

Arbre phylogénétique, contenant les protéines globuline 1S de *Triticum urartu* et globuline 3A de *Triticum aestivum* (identifiées par spectrométrie de masse) ainsi que des globulines d'autres espèces, basé sur l'alignement par la méthode ClustalW et construit à l'aide du logiciel MEGA5 (Tamura et al. 2011). *Arabidopsis thaliana* (At), *Triticum urartu* (Tu), *Hordeum vulgare* (Hv), *Brachypodium distachyon* (Bd), *Zea mays* (Zm), *Eucalyptus grandis* (Eug), *Citrus sinensis* (Cs), *Cucumis melo* (Cm), *Solanum lycopersicum* (St), *Gossypium herbaceum* (Gh), *Zea perennis* (Zp), *Medicago truncatula* (Mt), *Theobroma cacao* (Tc), *Carya illinoensis* (Ci) et *Triticum aestivum* (Ta).

## **ANNEXE 5**

### **Extraction des protéines au TCA/acétone**

#### **Préparation des solutions requises**

- Solution de précipitation (10% TCA/acétone/0.07% DTT) : 5g de TCA dans 50ml d'acétone et 225 µL de DTT 1M / 50 ml d'acétone
- Solution de lavage (acétone/0.07% DTT)
- Tampon de solubilisation

Le tampon de solubilisation peut être du SDS 2%-Tris 30 mM pH 8,8 ou un mélange d'urée/thiourée (urée 7M ; thiourée 2M ; CHAPS 4% ; Tris 30 mM)

Attention que seul le deuxième tampon sans SDS pourra être dosé par la méthode de Bradford

#### **Mode opératoire**

##### **Précipitation des protéines**

- Peser 100 mg d'échantillon (étape non indispensable) et mettre dans des tubes en polypropylène à billes de Lysing Matrix

- Ajouter 1 ml de TCA 10%-acétone-0.07% DTT
- Soniquer pendant 10 minutes
- Vortexer 1 heure
- Mettre l'échantillon la nuit à -20°C

##### **Lavage des protéines**

- Centrifuger au maximum pendant 15 minutes à 4°C et à 20000 g
- Eliminer le surnageant
- Centrifuger au maximum pendant 10 minutes à 4°C et à 20000 g
- Eliminer le surnageant
- Ajouter 1 ml d'acétone (100%)-0.07% DTT
- Soniquer 10 minutes et vortexer
- Centrifuger au maximum pendant 10 minutes à 4°C et à 20000 g
- Eliminer le surnageant et recommencer le lavage au moins 3X
- Faire un dernier lavage avec de l'acétone 90%-0.07%DTT

### **Solubilisation des protéines**

- Centrifuger au maximum pendant 10 minutes à 4°C et à 20000 g
- Faire sécher l'échantillon à T° ambiante ou par speed vacuum (5 minutes)
- Ajouter 200 µl de solution de solubilisation
- Vortexer 1 heure
- Centrifuger à 15000g pendant 10 minutes
- Récupérer le surnageant dans un nouvel Eppendorf

## ANNEXE 6

### **Dosage Bradford sur plaque multipuits**

#### **1. Principe de l'analyse**

La méthode Bradford est un dosage colorimétrique utilisé pour la quantification des protéines en solution.

Il exploite les modifications du spectre d'absorption du bleu de Coomassie qui se produisent lors de son interaction avec des protéines.

#### **2. Préparation des solutions requises**

- Réactif de Bradford
  - Pour un volume final de 500 ml :
  - Dissoudre 50mg de bleu de Coomassie dans 50ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> et 23.5 ml éthanol absolu
  - Filtrer la solution sur papier Watman N°1
  - Stocker la solution à température ambiante dans une bouteille en verre brun
  
- Tris 1M pH 8.8  
Pour un volume final de 100ml
  - Peser 12,11g de Tris et ajouter 90ml d'eau MilliQ
  - Mélanger et ajuster le pH à 8.8 avec HCl quelle concentration
  - Ajouter de l'eau MilliQ pour avoir 100ml et transférer dans une bouteille en verre
  - Conserver la solution à 4°C
  
- Tris 30mM pH 8.8  
Dans un tube de 15ml, mettre 300µl de Tris 1M pH 8.8 et ajouter de l'eau MilliQ pour avoir 10ml et stocker la solution à 4°C.
  
- Préparation des standards de BSA
  - Préparer une solution stock de BSA à 2mg/ml (2mg de BSA dans 1 ml d'eau MilliQ)
  - Faire des dilutions avec Tris 30mM pH 8.8 pour avoir des concentrations de 0 ; 0.2 ; 0.4 ; 0.6 ; 0.8 ; 1 et 1.5 mg/ml.
  - Vortexer et stocker les standards à -20°C

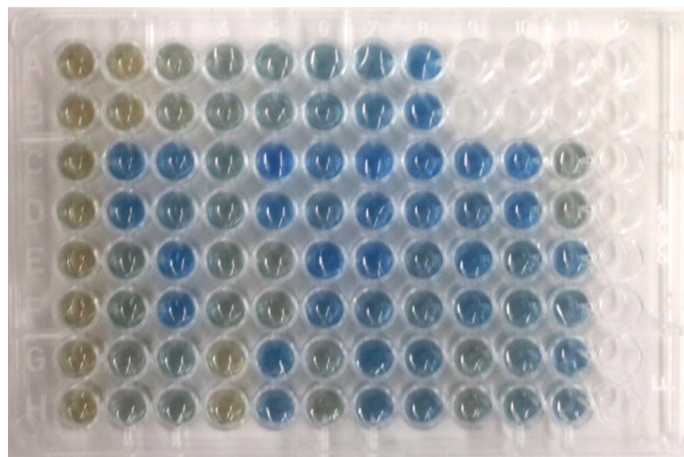
#### **3. Remplissage de la plaque multipuits**

- Mettre 5 µl de tampon Tris 30mM pH 8.8 dans les puits « blanc » et 0 mg/ml en BSA
- Mettre 5 µl d'échantillons par puits (ou d'une dilution de l'échantillon)

- Ajouter 250 µl de réactif de Bradford
- Attendre 5 minutes et mesurer la DO à 620nm.

Le remplissage de la plaque multipuits se fait comme suit :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc	BSA 0mg/ml	BSA 0.2mg/ml	BSA 0.4mg/ml	BSA 0.6mg/ml	BSA 0.8mg/ml	BSA 1mg/ml	BSA 1.5mg/ml				
B	Blanc	BSA 0mg/ml	BSA 0.2mg/ml	BSA 0.4mg/ml	BSA 0.6mg/ml	BSA 0.8mg/ml	BSA 1mg/ml	BSA 1.5mg/ml				
C	Blanc	Ech.1	Ech.2	Ech.3	Ech.4	Ech.5	Ech.6	Ech.7	Ech.8	Ech.9	Ech.10	Ech.11
D	Blanc	Ech.1	Ech.2	Ech.3	Ech.4	Ech.5	Ech.6	Ech.7	Ech.8	Ech.9	Ech.10	Ech.11
E	Blanc	Ech.12	Ech.13	Ech.14	Ech.15	Ech.16	Ech.17	Ech.18	Ech.19	Ech.20	Ech.21	Ech.22
F	blanc	Ech.12	Ech.13	Ech.14	Ech.15	Ech.16	Ech.17	Ech.18	Ech.19	Ech.20	Ech.21	Ech.22
G	Ech.23	Ech.24	Ech.25	Ech.26	Ech.27	Ech.28	Ech.29	Ech.30	Ech.31	Ech.32	Ech.33	Ech.34
H	Ech.23	Ech.24	Ech.25	Ech.26	Ech.27	Ech.28	Ech.29	Ech.30	Ech.31	Ech.32	Ech.33	Ech.34



### Mesure des DO sur plaque multipuits avec le réactif de Bradford

Evolution suit : Quantitative												19:03:00
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
0.936	0.050	0.199	0.203	0.631	0.833	1.071	1.404	<0.00	<0.00	<0.00	<0.00	
0.909	0.050	0.247	0.300	0.532	0.774	1.003	1.49X	<0.00	<0.00	<0.00	<0.00	
0.929	1.166	1.095	0.661	>1.60	1.127	1.376	1.325	1.400	1.53X	0.393	<0.00	
0.885	1.206	0.829	0.576	1.273	0.904	1.301	1.127	1.003	1.400	0.374	<0.00	
0.925	0.409	1.46X	0.405	0.342	1.46X	1.420	0.837	1.257	0.829	1.154	<0.00	
0.917	0.429	1.297	0.437	0.342	1.071	0.992	0.603	1.119	0.097	0.925	<0.00	
<0.00	0.334	0.520	0.013	1.226	0.330	1.123	1.059	0.473	0.603	0.900	<0.00	
<0.00	0.251	0.405	-0.011	1.020	0.544	1.091	0.936	0.362	0.726	0.790	<0.00	

### Lecture des densités optiques à 620nm sur Densitomètre (GloMax®-Multi Detection System, Promega)



## ANNEXE 7

### **Préparation des solutions requises pour le Western blot**

#### **Tampon de migration Tris-Glycine 10X :**

- Tris 30 g/L
- Glycine 144 g/L
- Ajuster le volume avec de l'eau milliQ

#### **Tampon de transfert :**

- 100 mL de tampon de migration Tris-Glycine 10X
- 200 mL de Méthanol
- Ajuster le volume à 1L avec de l'eau milliQ

#### **Solution de Rouge Ponceau :**

- 96,7 mL d'eau milliQ
- 3 mL d'acide trichloroacétique (MERCK 805740)
- 0,3 % de rouge Ponceau (SERVA 33429)

#### **Solution de blocage :**

- PBS 1X : 8g NaCl + 0,2g KCl + 1,44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .
- Ajuster à pH=7,4 avec HCl 1M
- Ajuster le volume à 1 L avec de l'H<sub>2</sub>O milliQ
- Pour réaliser la solution de blocage, ajouter au PBS 1X du tween 20 à 0,1 % (v/v) ainsi que de l'agent bloquant (Amersham) à 2% (w/v).

#### **Solution de lavage :**

- PBS 1X et y ajouter du tween 20 à 0,1% (v/v)

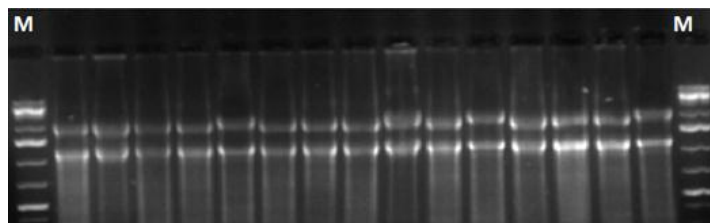
## **ANNEXE 8**

### **Protocole pour extraction d'ARN au Trizol « TRI REAGENT » (MPBio)**

L'extraction des ARN a été réalisée selon le protocole suivant :

- Ajouter 1 ml de l'azote liquide Tri Reagent à 50 à 100 mg de cals frais ou congelés.
- Incuber pendant 5min à température ambiante.
- Broyer pendant 80secondes.
- Incuber pendant 5min à température ambiante.
- Ajouter 400µl de chloroforme
- Mélanger et laisser reposer 7 min à température ambiante.
- Centrifuger à 12000 g à 4°C pendant 15 minutes.
- Récupérer la phase supérieure contenant les ARN, ajouter 0,5 ml d'isopropanol (4°C)
- mélanger et laisser reposer 5 minutes à température ambiante.
- Centrifuger à 12000 g à 4°C pendant 8 minutes.
- Eliminer le surnageant et laver le culot avec 0,5 ml d'éthanol 75% froid.
- Centrifuger à 12000 g à 4°C pendant 5 minutes.
- Eliminer le surnageant et laisser sécher partiellement le culot à l'étuve à 37°C°.
- Reprendre dans 25 µl d'H<sub>2</sub>O-DEPC 0.1%.

Afin d'éliminer toute trace d'ADN potentiellement contaminant, les échantillons ont ensuite systématiquement été traités à la DNase à l'aide du kit «DNA-free » (DNase treatment and removal reagents) (Promega). A l'issue de l'extraction, la qualité des ARN a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 1.2%, tampon TBE 0.5X. Leur concentration a été évaluée par mesure de la densité optique (DO) avec un spectrophotomètre Nanodrop (Thermo Scientific). Le rapport 260/280 doit être voisin de 1.8 pour les ARN de bonne qualité.



**Electrophorèse des ARN totaux extraits à partir des cals de blé dur.**

**M : marqueur de taille moléculaire (1kb DNA Ladder- Invitrogen).**

# *Articles et communications scientifiques*

## Communications internationales par affiche

- Kacem Nadia Sandra, Ykhlef Nadia, Bousbaa Ratiba, Djekoun Abdelhamid. **Sélection *in vitro* de géotypes de blé tolérants au stress hydrique par application du polyéthylène glycol.** Séminaire international sur « La prévention et la mise en valeur de l'Ecosystème Steppique », du 14 au 16 Mars 2010. M'sila, Algérie.
- Kacem Nadia Sandra, Ykhlef Nadia, Djekoun Abdelhamid. **Effet du 2.4-D et du polyéthylène Glycol sur la callogenèse du blé tendre et dur.** Séminaire international de « Biologie végétale et Ecologie », du 22 au 25 Novembre 2010. Constantine, Algérie.
- Kacem Nadia Sandra, Ykhlef Nadia, Djekoun Abdelhamid. **Sélection *in vitro* de cals de blé dur et tendre tolérants au stress hydrique.** 1<sup>er</sup> Congrès international « Aide à l'agriculture Algérienne », du 22 au 24 Novembre 2011. Annaba, Algérie.
- Kacem Nadia Sandra, Delporte Fabienne, Djekoun Abdelhamid, Watillon Bernard. ***In vitro* screening for grought tolerant somaclones and genetic diversity in wheat (*Triticum durum* Desf).** Séminaire international de « Plant Regeneration ». Belgian Plant Biotechnology, 29 November 2013. Bruxelles.
- Kacem N.S, Mauro S, Muhovski Y, Delporte F, Djekoun A, Watillon B. **Diagonal electrophoresis for studing drought stress in durum wheat (*Triticum durum* Desf).** Séminaire international de «Cellular, Molecular Biology and Biochemistry». 15 Mai 2014. Université de Liège, Liège, Belgique.
- Kacem Nadia Sandra, Delporte Fabienne, Djekoun Abdelhamid, Watillon Bernard. ***In vitro* screening for drought tolerant somaclones and genetic diversity in wheat (*Triticum durum* Desf).** Séminaire international de

« Environmental Sciences, Technologies and Management (ENVITAM) ». 05 March 2014. Université catholique de Louvain, Louvain la Neuve, Belgique.

- Kacem Nadia Sandra, Delporte Fabienne, Djekoun Abdelhamid, Watillon Bernard. **Developing stress tolerant plants of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) through *in vitro* selection.** Séminaire international de « New breeding technologies ». Belgian Plant Biotechnology, 29 November 2014. Bruxelles.
- Kacem N.S, Mauro S, Muhovski Y, Delporte F, Djekoun A, Watillon B. III<sup>ème</sup> Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bioressources. **Sélection *in vitro* et caractérisation moléculaire pour la tolérance au stress hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf),** du 20 au 23 Mars 2015, Tabarka, Tunis.

## **Molecular characterization of genetic variation in somaclones of durum wheat (*Triticum durum* Desf) using SSR markers**

***Nadia Sandra Kacem, PhD Student***

Freres Mentouri University Constantine, Algeria

***Yordan Muhovski, PhD***

Walloon Agricultural Research Centre, Gembloux, Belgium

***Abdelhamid Djekoun, Professor***

Freres Mentouri University Constantine, Algeria

***Bernard Watillon, PhD***

Walloon Agricultural Research Centre, Gembloux, Belgium

doi: 10.19044/esj.2017.v13n9p426

[URL:http://dx.doi.org/10.19044/esj.2017.v13n9p426](http://dx.doi.org/10.19044/esj.2017.v13n9p426)

---

### **Abstract**

This study is a continuation of a previous work; the main objective is to characterize the induced somaclonal variation in the first generation of durum wheat plants. In a previous experiment, *in vitro* plants of three genotypes of durum wheat were obtained following treatment with PEG6000 (0%, 10% and 20%). First generation offspring was produced. Five microsatellite markers were used for genotyping 26 durum wheat somaclones obtained under stressful and non-stressful conditions from 3 durum wheat cultivars. Amplifiable and reproducible alleles were obtained in three of the tested loci. These loci provided in total 78 monomorphic alleles of which 69 were detected in somaclones while the remaining 9 in the mother plants. High values of among-population genetic diversity were found, which accounted for 71 % of the total genetic variation. The number of alleles per locus varied from three to six. Estimated genetic distances varied from 0.83 to 1.67 between populations. The somaclonal variation was identified with 2 SSR markers. Five new alleles were identified in somaclonal variants DKR<sub>1</sub>-S1, DKR<sub>1</sub>-S2, OZR<sub>1</sub>-S2, WR<sub>1</sub>-C3 and WR<sub>1</sub>-S1 at loci *gmw131* and *gwm427*. Genetic variation rate was 21.74%. Eighty % of the genetic variation was identified in plants obtained from callus undergoing high osmotic pressure. The presence of selective agent in the medium could explain the observed genetic variations. Somaclonal variation cannot always be detected at the gross morphological level. The selected SSR markers

could be used to study the uniformity of plants obtained from tissue culture and varietal identification.

---

**Keywords:** *Triticum durum* Desf, somaclones, somaclonal variation, SSR markers.

## **Introduction**

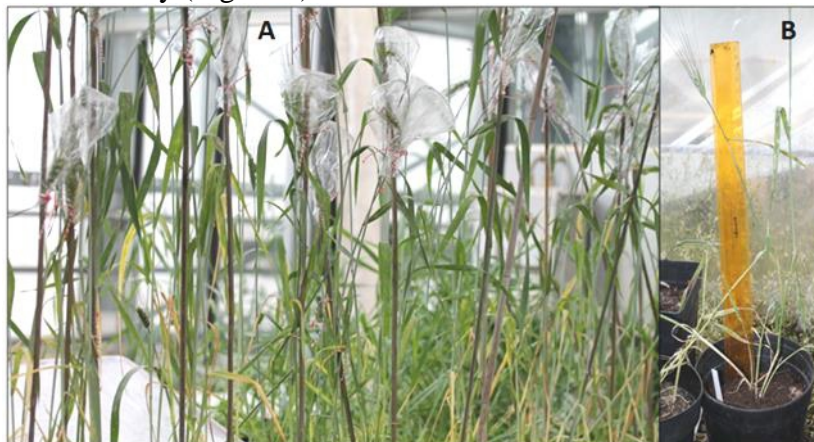
Wheat is encountering different environmental challenges, such water stress, that affects growth and development of wheat. The development of new varieties is a practical strategy for improving yield, especially under abiotic stress and future climate changing conditions. Diversity in plant genetic resources provides opportunity for plant breeders to develop new and improved cultivars with desirable characteristics (Bellatreche et Gaouar 2012, Govindaraj et al., 2015). Somaclonal variation resulted from tissue or cell culture (Larkin and Scowcroft, 1981) is an alternative source of new genetic diversity that is very useful for plant breeding programs including generating a novel character like drought tolerance. Several works with wheat have revealed that the somaclonal variation might result from point mutation, chromosomal translocation, chromosomal aberration, alterations in gene expression and mtDNA rearrangement (Larkin et al., 1981; Hartmann et al., 1989; Sato et al. 2011), although little is known about the mechanism regulating this processes. A selection pressure applied by stress agent could induce genetic variation, which confer broad resistance to multiple biotic or abiotic stresses (Zair et al., 2003). Several strategies are available for detecting genetic variation including morphological traits, cytogenetic analysis, molecular and biochemical markers (Heinze and Mee 1971; Hsissou and Bouharmont 1994; Mehta et al. 2000), most of them have limitations. Nowadays, DNA marker techniques based on PCR amplification have become increasingly important to study the genetic relationships among plants. Simple sequence repeat (SSR) markers are the most popular type of co-dominant molecular markers in phylogenetic studies, evaluation of genetic diversity, cultivar identification and genotypic variations. There are limited numbers of research reports on somaclonal variation detection in durum wheat using microsatellites. In this paper, we used SSR analysis of first generation ( $R_1$ ) durum wheat somaclones.

## **Material and methods**

### **Plant material**

In a previous study, three durum wheat varieties (Djenah Khetifa-DK, Oued Zenati-OZ and Waha-W) were screened for drought tolerance at cellular level. Several *in vitro* plants ( $R_0$ ) with different level of tolerance were developed using polyethylene glycol (PEG-6000) as a drought

simulation agent (Kacem et al., 2016).  $R_0$  plants were self-pollinated to produce  $R_1$  seed. The obtained  $R_1$  plants were subjected to analysis of the induced genetic variation (Table 1). From a morphological point of view, plants obtained from non-stressed callus are identical to their mother plants with the exception of one somaclone obtained from stressed callus of the Oued Zenati variety (Figure 1).



**Figure 1.**  $R_0$  plants at the heading stage. **A.** Plants obtained from non-stressed callus. **B.** Plants obtained from stressed callus (20% PEG).

### DNA extraction

Genomic DNA of somaclones ( $R_1$ ) was extracted from 50 mg leaf tissue. For mother plant, genomic DNA was extracted from 25 mature embryos per each genotype. The total genomic DNA was extracted using the CTAB method by Doyle and Doyle (1990). The quantity and quality of the DNA was checked on nano-spectrophotometer (IMPLEN, Germany) and by 0.8% agarose gel electrophoresis, respectively. Absorbance ratio between 260 and 280 nm was computed and the quality of the genomic DNA was confirmed.

**Table 1.** Number and origin of  $R_1$  somaclones used.

Genotypes	Origin of $R_1$ somaclones	
	Control callus (0% PEG)	Stressed callus (20% PEG)
Djenah Khetifa	6	5
Oued Zenati	6	2
Waha	3	1

### PCR Amplification and SSR Analysis

A total of 5 SSR markers were used in this study (Table 2). These markers were developed in *Triticum aestivum* (Röder et al., 1998). PCR reactions were performed in a total reaction volume of 20  $\mu$ l containing about 20 ng of genomic DNA, 1 $\times$  PCR buffer, 0.2mM of each dNTP, 1.5mMMgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA, 0.25  $\mu$ M of each primer, and 0.5 U Taq DNA polymerase (Fermentas). Reactions were performed in iCycler (Bio-Rad)



thermal cycler with the following conditions: 94 °C for 4 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 60 s, 55–60 °C depending on the primer pair for 60 s (Table 2), and 72 °C for 2 min. The last step was at 72 °C for 10 min. The electrophoresis was performed in 6.5 % denaturing polyacrylamide gel using a Li-Cor global edition IR2 DNA sequencer (Westburg). Allele scoring was done using Gene ImagIR software, v 4.03 (Westburg).

**Table 2.** Sequences of SSR primers used in PCR-reactions. All primer sequences are given in the 5 to 3 direction

Locus	Primer sequences (forward)	Primer sequences (reverse)	Core Motifs	Location	T <sub>m</sub> (C°)
<i>gwm131</i>	AAT CCC CAC CGA TTC TTC TC	AGT TCG TGG GTC TCT GAT GG	(CT)22	1B-3B	60°C
<i>gwm135</i>	TGT CAA CAT CGT TTT GAA AAG G	ACA CTG TCA ACC TGG CAA TG	(GA)20	1A	60°C
<i>gwm427</i>	AAA CTT AGA ACT GTA ATT TCA GA	AGT GTG TTC ATT TGA CAG TT	(CA)31 (CA)22	6A	50°C
<i>gwm088</i>	CACTACAACATGCGCTCGC	TCCATTGGCTTCTCTCTCAA	(GT)18TT (GA)4	6B	60°C
<i>gwm186</i>	CACTACAACATGCGCTCGC	TCCATTGGCTTCTCTCTCAA	(GT)18TT (GA)4	6B	60°C

## Statistical Analysis

The distance and genetic identity matrix were estimated according to Nei's coefficient (Nei, 1978) using GENETIX software version 4.05 (Belkhir et al., 2004).

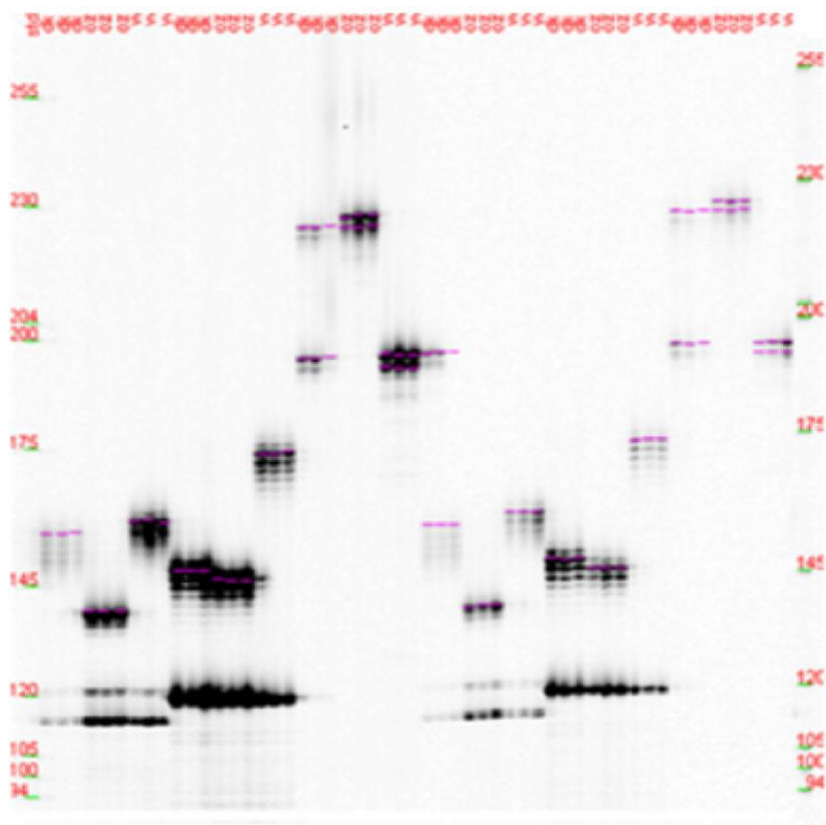
## Results

### Detection of somaclonal variation

After size determination of the alleles for each locus in the tested individuals, we decided to exclude data related to markers *gwm088* and *gwm186* due to bad separation and difficulty of reading the size of alleles. Three amplifiable and reproducible SSR markers: *gwm131*, *gwm135* and *gwm427* were selected. We started our study by verifying the obtained profiles using microsatellites *gwm131*, *gwm135* and *gwm427* on mother plants (Figure 2). A total of 9 monomorphic and reproducible fragments were produced, with the studied genotypes of durum wheat. The amplification products were between 139 bp to 225 bp (Table 3).

With the 23 analyzed somaclones, we obtained a total of 69 reproducible and monomorphic fragments. The amplification products were between 136 bp to 225 bp. With the marker *gwm131* two deletions of 4 and 16 base pairs were identified in the somaclones DKR<sub>1</sub>-S1 and DKR<sub>1</sub>-S2, respectively. With the same marker, we recorded another case of deletion of one base pair in the somaclone WR<sub>1</sub>-S1 and one more case of deletion of three base pairs in the somaclone OZR<sub>1</sub>-S2. In only the somaclone WR<sub>1</sub>-C3

of Waha variety an additional band corresponding to about 0.22kb was observed in locus *gwm427*. No genetic variation was detected in R<sub>1</sub> plants with the microsatellite *gwm135*.



**Figure 2.** Microsatellites fragments, the amplification products are between 139 bp to 225bp. The DNA was amplified by PCR and migrated on Li-Cor DNA Sequencer. Dk (Djenah Khetifa), OZ (Oued Zenati), W(Waha).

The frequencies of total variation detected by the three primers (*gwm131*, *gwm135* and *gwm427*) was 21.74%; the highest variation rate is recorded in the locus *gwm131* (17.39%) followed by *gwm427* (4.35%). However the locus *gwm135* did not reveal any genetic variation. 80% of these variations was revealed in plants originating from stressed callus (PEG20%) while 20% was observed in plants obtained from non-stressed callus (PEG0%) (Table 3).

**Table 3.** Characterization of genetic variation in the first generation (R<sub>1</sub>) of durum wheat somaclones. Genetic variation was observed in five somaclones (DKR<sub>1</sub>-S1, DKR<sub>1</sub>-S2, OZR<sub>1</sub>-S2, WR<sub>1</sub>-S1 and WR<sub>1</sub>-C3) in loci *gwm131* and *gwm427* in comparison to mother plants of 3 durum wheat cultivars (DK - Djenah Khetifa, OZ - Oued Zenati, W - Waha) cultivated *in vivo*.

<i>Variety</i>	<i>Code somaclones</i>	<i>Origin of plants</i>	<i>Fragment sizes (bp)</i>		
			<i>gwm131</i>	<i>gwm135</i>	<i>gwm427</i>
DK		Mother Plant	155	148	223
Plant	DKR <sub>1</sub> -C1	<i>Control Callus</i>	155	148	223
Plant	DKR <sub>1</sub> -C2	<i>Control Callus</i>	155	148	223
Plant	DKR <sub>1</sub> -C3	<i>Control Callus</i>	155	148	223
Plant	DKR <sub>1</sub> -C4	<i>Control Callus</i>	155	148	223
Plant	DKR <sub>1</sub> -C5	<i>Control Callus</i>	155	148	223
Plant	DKR <sub>1</sub> -C6	<i>Control Callus</i>	155	148	223
Plant	DKR <sub>1</sub> -S1	<i>Stressed Callus</i>	151	148	223
Plant	DKR <sub>1</sub> -S2	<i>Stressed Callus</i>	139	148	223
Plant	DKR <sub>1</sub> -S3	<i>Stressed Callus</i>	155	148	223
Plant	DKR <sub>1</sub> -S4	<i>Stressed Callus</i>	155	148	223
Plant	DKR <sub>1</sub> -S5	<i>Stressed Callus</i>	155	148	223
OZ		Mother Plant	139	146	225
Plant	OZR <sub>1</sub> -C1	<i>Control Callus</i>	139	146	225
Plant	OZR <sub>1</sub> -C2	<i>Control Callus</i>	139	146	225
Plant	OZR <sub>1</sub> -C3	<i>Control Callus</i>	139	146	225
Plant	OZR <sub>1</sub> -C4	<i>Control Callus</i>	139	146	225
Plant	OZR <sub>1</sub> -C5	<i>Control Callus</i>	139	146	225
Plant	OZR <sub>1</sub> -C6	<i>Control Callus</i>	139	146	225
Plant	OZR <sub>1</sub> -S1	<i>Stressed Callus</i>	139	146	225
Plant	OZR <sub>1</sub> -S2	<i>Stressed Callus</i>	136	146	225
W		Mother Plant	157	173	194
Plant	WR <sub>1</sub> -C1	<i>Control Callus</i>	157	173	194
Plant	WR <sub>1</sub> -C2	<i>Control Callus</i>	157	173	194
Plant	WR <sub>1</sub> -C3	<i>Control Callus</i>	157	173	222
Plant	WR <sub>1</sub> -S1	<i>Stressed Callus</i>	156	173	194

### Genetic diversity

The results obtained showed high level of genetic diversity (71%) (inter-population polymorphism). The highest level of genetic diversity was recorded in locus *gwm131* (75.37%) followed by *gwm427* (70.76%) and *gwm135* (66.67%). In contradiction, the level of intra-population polymorphism was lower (0.145%). The highest level of intra-population polymorphism was observed in locus *gwm131* (31.06%) followed by *gwm427* (12.28%), whereas absence of polymorphism was observed in locus

*gwm135*. The number of alleles range from 1 to 3 within the population of Djenah Khetifa and from 1 to 2 for the rest two populations of cultivars. The number of alleles ranged from 3 in locus *gwm135* to 6 in the locus *gwm131*. The marker *gwm427* showed in total 4 alleles (Table 4).

**Table 4.** Allele frequency at 3 loci across 3 population of durum wheat (DK - Djenah Khetifa, OZ - Oued Zenati, W - Waha).

Locus	Alleles (bp)	Populations			Total
		DK	OZ	W	
<i>gwm131</i>	(N)	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	
	<b>136</b>	0.000	0.111	0.000	0.037
	<b>139</b>	0.083	0.889	0.000	0.324
	<b>151</b>	0.083	0.000	0.000	0.028
	<b>155</b>	0.833	0.000	0.000	0.278
	<b>156</b>	0.000	0.000	0.200	0.067
<i>gwm135</i>	(N)	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	
	<b>146</b>	0.000	1.000	0.000	0.333
	<b>148</b>	1.000	0.000	0.000	0.333
	<b>173</b>	0.000	0.000	1.000	0.333
<i>gwm427</i>	(N)	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	
	<b>194</b>	0.000	0.000	0.800	0.267
	<b>222</b>	0.000	0.000	0.200	0.067
	<b>223</b>	1.000	0.000	0.000	0.333
	<b>225</b>	0.000	1.000	0.000	0.333

Table 4 also presents the frequencies and sizes of alleles from different populations. The allelic frequencies calculated for each locus and each population ranged from 0 to 0.89. The locus *gwm131* is presented by six alleles, and was the most polymorphic. The predominance of the allele 139 is remarkable and its frequency was 0.324 in the three analysed populations. The *gwm135* locus indicates the presence of three alleles. For *gwm427* locus, the predominance of the allele 194 in Waha variety was remarkable, with a frequency of 0.8.

The matrix of genetic distances estimated between individuals (Table 5) indicated high values between each 2 populations. These distances ranged from 0.83 to 1.67. The two varieties Djenah Khetifa and Waha seem to be genetically more closer.

**Table 5.** Matrices of Nei genetic distances among populations of durum wheat.

	Djenah Khetifa	Oued Zenati	Waha
Djenah Khetifa	0		
Oued Zenati	1.16	0	
Waha	0.83	1.67	0

## Discussion

The variations in the lengths of the amplification products at 2 of the tested microsatellite loci revealed somaclonal variation in  $R_1$  plants of durum wheat. These variations suggest that such modifications were transmitted to descendants of regenerants. The transmission of genetic variations through mitosis and cellular heritability of variations is now well proven. According to Meins (1983) the changes resulting from permanent modifications of genome are genetic; these changes are transmissible in regenerating plants and their descendants according to the rules of the classic mendelian inheritance.

The obtained results are consistent with those conducted *in vitro* in *Artemisia* species in which two new alleles of 0.15 kb and 0.2 kb have been reported using ISSR markers (Khan et al., 2013). The finding here also are in agreement with earlier reports on application of SSR for identification of genetic variation among regenerated plants in several other plants such aspen (Rahman & Rajora 2001), rice (Khai and Lang 2005) and cotton (Jin et al. 2008).

Despite of the phenotypic similarities between somaclones and mother plants, the differences in genomic constituents of the regenerated plants originating from the same cell has been effectively determined by SSR markers. Phenotypic identification, based on a description of the morphological traits, can be used but some changes induced by *in vitro* culture cannot be easily observed. Similar findings on genomic variation in phenotypically normal regenerants have been well documented in some other plants (Rahman & Rajora 2001, Jin et al. 2008).

Based on our results, it seems that the presence of osmotic agent (20% PEG) in *in vitro* culture might be the reason of the observed genotypic variation. In this study the majority of variations were observed on plants obtained from stressed callus. The frequency of occurrence of somaclonal variation in regenerated plants is strongly affected by genotype, medium, duration of culture and the source of explants. Handro (1981) reported that when *in vitro* selective agents are added to the media, additional interactions are encountered. Various hypotheses have been put forward to explain this phenomenon. The best accepted hypothesis states that *in vitro* culture represents breakdown of normal, default cellular controls resulting in a cascade of genetic and epigenetic instabilities and hence lead to alterations in the gene expression and to the development of new phenotype (Kaeppler et al., 2000). Recent studies have indicated that the absence or presence of a specific gene or allele could cause a change in the drought resistant nature depending on the role of the genes affected (Nag et al., 2004, Arumingtyas et al., 2012).

The matrix of genetic distances estimated between individuals indicates high values between populations taken two by two. The genetic distances matrix indicates that the three populations showed a genetic dissemblance. The two varieties Djenah Khetifa and Waha seem to be the most genetically related. The monomorphic banding pattern confirmed the genetic uniformity of mother plants and certain clones of the same variety (Zhang et al. 2010; Manoj et al., 2012). Greater genetic diversity (inter-population genetic diversity) was observed among populations (71%) compared to the intra-population genetic diversity (14.5%), which translates an important genetic differentiation between the studied varieties of durum wheat. The locus *gwm131* was the most polymorphic, followed by the locus *gwm427*. Our results are in agreement with the studies of Medini et al. (2005) and those of Colomba and Gregorin (2011) conducted on different durum populations and showed the existence of a higher genetic diversity estimated on the base of the use of SSR and AFLP markers. Hamrick and Godt (1997) reported that intra-population genetic diversity of cross-pollinated species varies from 10.3% to 26.6%, whereas intra-population genetic diversity of self-pollinated species varies from 0.09% to 0.14%.

## Conclusion

SSR markers can be efficiently used for assessment of genetic variation among regenerants derived from an *in vitro* culture. High level of genetic diversity in three durum wheat populations was observed. The frequency of somaclonal variation seems to be a consequence of the culture conditions, suggesting that the drought stress induced by PEG6000 is capable of altering DNA sequence. Somaclonal variation cannot always be detected at the gross morphological level. The genetic changes in somaclones ( $R_1$  generation) are a result of segregation process during meiosis and assorted independently in the self fertilization. Performing stability tests at later generations and in water stress conditions would confirm the usefulness of this approach to select somaclonal variants tolerant to water deficit.

## Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria and Walloon Agricultural Research Centre (Belgium). We thank the both institutions for their assistance.

## References:

1. Arumingtyas, E.L., Widoretno W. & Indriyani S., 2004. Evaluation on some lines of somaclonal variant soybeans arised from *in vitro* selection against drought. *Hayati*, 11, 11-20.

2. Belkhir, K., Borsa, P., Goudet, J., Chikhi, L. & Bonhomme, F., 2004. GENETIX v.4.05 logiciel sous Windows pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, University of Montpellier II, Montpellier.
3. Bellatreche A. & Gaouar SBS., 2012 Preliminary genetic study of some varieties of durum wheat and bread wheat in the wilaya of Tlemcen and the influence of the environment on their yields. *Science and Nature* 4, 37-42.
4. Colomba M.S. & Gregorini A., 2011. Genetic diversity analysis of the durum wheat Graziella Ra, *Triticum turgidum* L. subsp. durum (Desf.) Husn. (Poales, Poaceae). *Biodiversity Journal*, 2, 73-84.
5. Davies, P .A ., M.A . Pallotta, S .A . Ryan, W.R . Scowcroft & P.J . Larkin, 1986 . Somaclonal variation in wheat : genetic and cytogenetic characterization of alcohol dehydrogenase 1 mutant . *Theor . Appl . Genet* . 72 : 644-653 .
6. Doyle J.J. & Doyle J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15
7. Govindaraj M., Vetriventhan M. & Srinivasan M., 2015. Importance of Genetic Diversity Assessment in Crop Plants and Its Recent Advances: An Overview of Its Analytical Perspectives. *Genet Res Int*, 2015, 1-14.
8. Hamrick J.I. & Godt J.W., 1997. Allozyme diversity in cultivated crops. *Crop Sci*, 37: 26-30.
9. Handro W., 1981. Mutagenesis and *in vitro* selection. In: Thorpe TA (ed.) *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*. Academic Press, New York, USA., 155-190.
10. Hartmann C., Henry Y., De Buyser J., Aubry C. & Rode A., 1989. Identification of new mitochondria genome organizations in wheat plants regenerated from somatic tissue culture. *Theor . Appl . Genet*. 77 : 169-175 .
11. Heinze D.J., Mee G.W.P., 1971. Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus culture. *Am J Bot*. 58,57–262.
12. Jin S., Mushke R., Zhu H., Tu L., Lin Z., Zhang Y. & Zhang X., 2008. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell. Rep.*, 27, 1303-1316.
13. Kacem N.S., Mauro S., Muhovski Y., Delporte F., Renaut J., Djekoun A. & Watillon B., 2016. Diagonal two-dimensional electrophoresis (D-2DE): a new approach to study the effect of osmotic stress induced by Polyethylene Glycol in durum wheat

(*Triticum durum* Desf.). *Mol Biol Rep.*  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11033-016-4028-5>

14. Kaeppeler S.M., Kaeppeler H.F. & Rhee Y., 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*, 43, 179-188.
15. 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, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 15, 523-534.
16. Khai T. H. & Lang, T. N., 2005. Using SSR markers to identify allele variation of somaclonal mutants in indica rice. *Omonrice*, 13, 121-12.
17. Khan M., Ganai B.A., Kamili A.N. & Akbar M., 2013. Inter-simple sequence repeats (ISSR) analysis of somaclonal variation in *Artemisia amygdalina* Decne. Plantlets regenerated from nodal explants. *J New Biol Rep*, 2, 40-43.
18. Larkin P.J. & Scowcroft W.R., 1981. Somaclonal variation- a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet.*, 60, 197-214.
19. Medini M, Hamza S, Rebai A. & Baum M., 2005. Analysis of genetic diversity in Tunisian durum wheat cultivars and related wild species by SSR and AFLP markers. *Genet Resour Crop Ev*, 52, 21-31.
20. Mehta Y.R. & Angra D.C., 2000. Somaclonal variation for disease resistance in wheat and production of dihaploids through wheat x maize hybrids. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 617-622.
21. Meins F., 1983. Heritable variation in plant cell culture. *Ann Rev Plant Physiol*, 34, 327-346
22. Nag D.K., Suri M., Stenson E.K., 2004. Both CAG repeats and inverted DNA repeats stimulate spontaneous unequal sister-chromatid exchange in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 32, 5677-5684.
23. Nei M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
24. Rahman M.H., Rajora O.P., 2001. Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant Cell Rep*, 20,531-536.
25. Rai M.K., Phulwaria M., Harish, Gupta AK, Shekhawat N.S. & Jaiswal U., 2012. Genetic homogeneity of guava plants derived from somatic embryogenesis using SSR and ISSR markers. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 111, 259-264.



26. Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P. & Ganal M.W., 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149, 2007-2023.
27. Sato M., Kawabe T., Hosokawa M., Tatsuzawam F., Doi M., 2011. Tissue culture induced flower-color changes in *Saintpaulia* caused by excision of the transposon inserted in the flavonoid 39, 59 hydroxylase (F3959H) promoter. *Plant Cell Rep* 30, 929–939.
28. Zair I., Chlyah A., Sabounji K., Titahsen M. & Chlyah H., 2003. Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of *in vitro* selection pressure. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 73, 237-244.
29. Zhang M., Wang H., Dong Z., Qi B., Xu K. & Liu B., 2010. Tissue culture induced variation at simple sequence repeats in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) is genotype-dependent and associated with down-regulated expression of a mismatch repair gene, MLH3. *Plant Cell Rep*, 29, 51-59.

HOSTED BY



ELSEVIER

Academy of Scientific Research & Technology and  
National Research Center, Egypt  
**Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**

[www.elsevier.com/locate/jgeb](http://www.elsevier.com/locate/jgeb)



## ORIGINAL ARTICLE

# *In vitro* screening of durum wheat against water-stress mediated through polyethylene glycol

Nadia Sandra Kacem<sup>a,b,\*</sup>, Fabienne Delporte<sup>a</sup>, Yordan Muhovski<sup>a</sup>,  
Abdelhamid Djekoun<sup>b</sup>, Bernard Watillon<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Life Sciences, Walloon Agricultural Research Centre, Chaussée de Charleroi, 234, 5030 Gembloux, Belgium

<sup>b</sup> Laboratory of Genetic Biochemistry and Plant Biotechnology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Frères Mentouri Constantine, 25017 Constantine, Algeria

Received 10 November 2016; revised 21 February 2017; accepted 8 April 2017

## KEYWORDS

Callus;  
Durum wheat;  
Mature embryo;  
PEG;  
Selection;  
Water stress

**Abstract** Three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) genotypes with three levels of drought tolerance were screened in order to evaluate their response to water stress at callus induction and plant regeneration levels. Significant differences were observed among the genotypes, and polyethylene glycol (PEG) levels used, and their interactions were however, significant for all the studied characters. Increase in PEG concentration increased the time required for callus initiation and reduced the number of calli frequency of embryogenic structures and number of plants regenerated, showing the adverse effect of PEG on the somatic embryogenesis developmental, under *in vitro* conditions tested, and Djenah Khetifa was the most tolerant genotype, followed by Oued Zenati and Waha. This pattern was per their drought tolerance behavior under field conditions. Principal component analysis (PCA) showed that 95.56% of the total variation was explained by the first two principal components. Biplot analysis allowed the stress-tolerant genotype to be distinguished from the two less tolerant genotypes. Time required for callus initiation was strongly negatively correlated with all other studied traits. These traits can be recommended as suitable selection criteria for screening drought-tolerant genotypes. The selected cells and plants will provide a tool for determining the mechanisms involved in tolerance to water stress.

© 2017 Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of Academy of Scientific Research & Technology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

Environmental conditions in agricultural settings are highly variable, leading to suboptimal crop yields and survival rates. The frequency and intensity of environmental extremes are expected to increase with climate change [24]. How plants cope with drought stress is a topic of an intense debate. In addressing this problem, geneticists and breeders have focused mainly

\* Corresponding author at: Laboratory of Genetic Biochemistry and Plant Biotechnology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Frères Mentouri Constantine, 25017 Constantine, Algeria.  
E-mail address: [kacem.nadia@umc.edu.dz](mailto:kacem.nadia@umc.edu.dz) (N.S. Kacem).

Peer review under responsibility of National Research Center, Egypt.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.04.004>

1687-157X © 2017 Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of Academy of Scientific Research & Technology.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

on exploiting high yield potential and genotype selection for morphological, physiological and agronomic traits indicative of drought tolerance under field conditions [12]. Developing an understanding of plant responses to drought is a fundamental part of developing stress-tolerant varieties [31,36]. Screening for drought tolerance under field conditions involves considerable resources (land, people and power) and requires suitable environmental conditions for the effective and repeatable phenotypic expression of drought tolerance attributable to the genotype. It is therefore necessary to use simple but effective early screening methods that relate to the field phenotypes [14]. However, *in vitro* selection for tolerance to abiotic stress depends on the development of efficient and reliable callus induction and plant regeneration systems. In wheat species, various explants sources have been used for embryogenic callus formation and plant regeneration [10,11,32,33]. These tissues differ in their ability to regenerate whole plants [11]. If the mature embryos can be used as the explants for tissue culture, this offers many important advantages over immature tissues as explants. For example, the dry seeds would be available for isolating mature embryos in large quantities with no seasonal influence throughout the year. The physiological states of mature embryos are similar and dry seeds are easy to manipulate in tissue culture [7]. Water stress could be induced in plant cell cultures by adding osmotica, such as mannitol, polyethylene glycol, sucrose or sorbitol. For drought stress induction, however, one of the most popular approaches is to use high molecular weight osmotic substances, such as polyethylene glycol (PEG) [27,34,41]. These agents have no detrimental or toxic effects on the plant; they inhibit the plant's growth, however, by reducing the water potential of the culture medium in a way similar to soil drying, so that cultured explants are unable to take up water [9]. The *in vitro* culture system is based on inducing genetic variation among cells, tissues and/or organs in cultured and regenerated plants. However, there are genetic, biochemical and physiological constraints to obtaining stress-tolerant plants through *in vitro* culture [7,22]. Several authors have used this technique successfully to screen various genotypes for water tolerance. The present study sought to identify the superior genotypes in terms of water stress tolerance with the objective to develop *in vitro* screening method for drought tolerance.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material

The experiments were carried out on three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) genotypes. Based on field trials, one genotype was classified as drought sensitive (Waha) and two as drought tolerant (Oued Zenati and Djenah Khetifa) [23]. The wheat germplasm was obtained from the Technical Institute of Field Crops (ITGC) Institut Technique des Grandes Cultures (Station El-khroub Constantine, Algeria).

### 2.2. Callus induction and *in vitro* selection procedures

Callus cultures were initiated using mature embryos. The seeds were surface sterilized with 70% ethanol for 15 min, followed by 12% sodium hypochlorite (NaClO) for 20 min, and then rinsed five times with sterile dH<sub>2</sub>O. Mature embryos about

2–4 mm long were aseptically excised and then incubated with the scutellum side down on MS induction medium (Table 1) [30], supplemented with 2 mg l<sup>-1</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 3% sucrose and 2.5 g l<sup>-1</sup> phytigel (Sigma-Aldrich). The pH value of the medium was adjusted to 5.7 prior to autoclaving at 110 °C for 30 min. The cultures were maintained at 25 ± 1 °C under 30 μm<sup>-2</sup> S<sup>-1</sup> cool fluorescent light intensity, with a 16 h/8 h (light/dark) photoperiod. Each treatment was performed in five replicates (20 mature embryos per Petri dish). The calli were maintained by subculturing every 20 days on the same MS medium with different PEG 6000 concentrations: 0% (control), 10% (SI: -0.49 MPa) and 20% (SII: -1.2 MPa). The osmoticum was added to the media before autoclaving.

### 2.3. Plant regeneration and acclimatization

The surviving calli on media containing 10% and 20% PEG 6000 were transferred into test tubes containing MS basal salt medium (Table 1) [30] supplemented with 1.0 mg l<sup>-1</sup> benzylaminopurine (BAP), 0.5 mg l<sup>-1</sup> naphthalene acetic acid (NAA), 30 g l<sup>-1</sup> sucrose and 2 g l<sup>-1</sup> Phytigel. The cultures were maintained at 25 °C under cool-white fluorescent light (30 μm m<sup>-2</sup> S<sup>-1</sup>) 16 h/8 h (light/dark) photoperiod. Rooted plantlets were transferred to Jiffy peat pellets containing a mixture of garden soil and sand (2:1) for acclimatization in a greenhouse.

**Table 1** MS basal media composition [30].

Ingredients	Conc. of stock solution (mg/l)	Concentration in medium (mg/l)
<i>Macroelements</i>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33,000	1650
KNO <sub>3</sub>	38,000	1900
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	8800	440
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7400	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3400	170
<i>Microelements</i>		
KI	166	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1240	6.2
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	4460	22.3
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1720	8.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50	0.25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	5	0.025
CoCl <sub>2</sub>	5	0.025
<i>Iron source</i>		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5560	27.8
Na <sub>2</sub> -EDTA·2H <sub>2</sub> O	7460	37.3
<i>Vitamins</i>		
Myo-inositol	20,000	100
Nicotinic acid	100	0.5
Pyridoxine HCl	100	0.5
Thiamine HCl	100	0.5
Glycine	400	2
<i>Carbon source</i>		
Sucrose	Added as solid	30,000

#### 2.4. Measured variables

The following characteristics were recorded for the three durum wheat genotypes:

**Time of callus initiation (TCI):** Time taken for callus initiation (days) using binoculars.

**Callus induction frequency (CIF):** The number of embryos producing calli divided by the number of cultured mature embryos plated on Petri dishes  $\times 100$ .

**Callus growth surface (CGS):** Evaluated based on the callus surface area ( $\text{mm}^2$ ) measured at 7, 15 and 30 days, using Image Pro Plus 6.2 software (Media Cybernetics).

**Relative tolerance (RT):** Callus growth surface ( $\text{mm}^2$ ) under stress divided by the mean value of callus growth surface ( $\text{mm}^2$ ) under non-stress  $\times 100$ .

**Embryogenic callus production (ECP):** Expressed as the number of embryogenic calli divided by the total number of induced calli  $\times 100$ .

**Reduction percentage (R):** Mean CGS value under stress level – mean CGS value at 0% stress level.

**Plant regeneration (PR):** Number of plants regenerated divided by the total number of embryogenic calli  $\times 100$ .

**Regeneration frequency (RF):** Number of plantlets obtained divided by the number mature embryos induced in culture  $\times 100$ .

#### 2.5. Statistical analysis

Analyses of variance (ANOVA), correlation analysis, principal component analysis (PCA) and biplot analysis were carried out using SPSS20, MINITAB17 and XLSTAT2015 software. Cluster analysis was performed using a Ward method and Euclidean distance [29,42].

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Water stress with PEG 6000

Significant differences were observed among the genotypes, PEG concentrations (0%, 10% and 20%), and their interactions for all the studied characters (Table 2), indicating genetic variability in response to PEG-simulated drought stress in terms of TCI, CIF, CGS, ECP, PR and RF.

#### 3.2. Effect of water stress on time of callus initiation

Callus initiation was visible within a few days of mature embryos being cultured under control conditions. For Djenah Khetifa and Oued Zenati, TCI was 2 days and for Waha it was 5 days. The TCI was greatly influenced by genotype, explant, media composition and hormones. For example, in *Triticum aestivum*, the appearance of primary calli from mature embryos was observed 3–4 days after inoculation as translucent, rough and rather watery structures [44]. For Bi and Wang [7], it was 2 days later; calli formed from mature embryos of durum wheat on  $2 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D. For Özgen et al. [32] it was 10–11 days; calli formed from mature embryos of winter durum wheat on  $8 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D. For Özgen et al. [33], it was 2–3 days later; calli formed from mature embryos of common winter wheat (*T. aestivum* L.). In the presence of the osmotic

agent, however, increased PEG concentration significantly increased the TCI in all varieties compared with the controls, the delay being longer for Waha than those for the Djenah Khetifa and Oued Zenati varieties (Table 2).

#### 3.3. Effect of water stress on callus induction frequency

The results of our study showed that there were no significant differences among the varieties under non-stress conditions (without PEG), with all explants producing calli (Table 2). The frequency of callus induction approached 100%. The high CIF observed demonstrating the high capacity of the durum wheat genotypes tested to induce calli from mature embryo explants. This observation is in agreement with previous reports that showed a high rate of callus production from mature and/or immature embryos of durum wheat [3].

Under water stress, however, the callus response from mature embryos was genotype dependant (Table 2). At 10% PEG, Djenah Khetifa had the highest rate of callus production (84.0%), followed by Oued Zenati (82.56%) and then Waha (77.4%). Increasing the concentration to 20% PEG resulted in a significant reduction in CIF in all genotypes. The highest percentage of callus induction (80%) was recorded for Djenah Khetifa and the lowest (57%) for Waha (Table 2). Our results showed that CIF response under PEG treatment was genotype dependent. The genetic constitution appeared to play a major role in callus induction under water stress. A decrease in CIF is a typical response of the explants of species, including wheat, when subjected to PEG-simulated drought stress [6,15,18,26,35]. Mahmood et al. [26], reported that incubation of wheat calli derived from immature embryos on callus selection media supplemented with PEG-6000 induced osmotic stress of  $-0.9 \text{ MPa}$  for four weeks seemed sub-lethal and can be expected to kill non-tolerant calli and allow only tolerant ones to survive (survival 26.62%) with reasonable regeneration potential.

#### 3.4. Effect of water stress on callus growth surface and relative tolerance

The growth dynamic of callus tissues was measured at 30 days on MS medium supplemented with different concentrations of PEG (0%, 10% and 20%), and digital images were analyzed using Image Pro Plus software. This non-invasive evaluation of growth had previously proved to be effective and helpful in that it allowed the evolution of the calli to be monitored until regeneration without removing them from their *in vitro* environment, and thus not interfering with their development [23]. On average across all the genotypes, the highest CGS ( $37.90 \text{ mm}^2$ ) was recorded when calli were cultured for 30 days on 0% PEG, compared with 10% ( $25.87 \text{ mm}^2$ ) and 20% ( $18.54 \text{ mm}^2$ ) PEG (Table 3).

All culture conditions and for the three measurements taken over time, Djenah Khetifa had the highest CGS ( $36.22 \text{ mm}^2$ ), followed by Oued Zenati ( $28.74 \text{ mm}^2$ ) and Waha ( $17.35 \text{ mm}^2$ ). The most severe growth slowdown was observed in Waha, where the reduction rate was 42.82% at 10% PEG and increased significantly ( $p < 0.001$ ) with increasing stress up to 20% PEG, reaching 77.95%. Oued Zenati seemed less affected by stress than Waha, with a reduction rate of 32.13% at 10% PEG and 47.44% at 20% PEG. Djenah

**Table 2** *In vitro* screening of three genotypes for increased water stress tolerance in durum wheat. Mature embryos of three genotypes displaying various levels of drought tolerance (DK: Djenah Khetifa; OZ: Oued Zenati; W: Waha) were exposed to PEG throughout (30 days) the process of somatic embryo induction and formation. **TCI**: time of callus initiation; **CIF**: callus induction frequency; **ECP**: embryogenic callus production; **PR**: plant regeneration; **RT**: relative tolerance; **RF**: regeneration frequency. Mean  $\pm$  standard deviation from at least 5 replicate experiments ( $n = 100$ ); common letters indicate no significant differences at 5% level of probability.

Variety	DK			OZ			W		
	0%	10%	20%	0%	10%	20%	0%	10%	20%
PEG concentration									
TCI	2.0 $\pm$ 0.0f	3.0 $\pm$ 0.2e	5 $\pm$ 1c	2.0 $\pm$ 0.14f	4.0 $\pm$ 0.5d	5.0 $\pm$ 0.2c	5.0 $\pm$ 0.5c	7.0 $\pm$ 0.5b	9.0 $\pm$ 0.5a
CIF	100 $\pm$ 0a	84.0 $\pm$ 1b	80 $\pm$ 1.0d	100 $\pm$ 0a	82.56 $\pm$ 1.2c	79.4 $\pm$ 0.5d	100 $\pm$ 0a	77.4 $\pm$ 2e	57.0 $\pm$ 1f
ECP	79.2 $\pm$ 3.9b	83.0 $\pm$ 2.7ab	56.0 $\pm$ 4.2d	61.0 $\pm$ 4.2c	58.0 $\pm$ 2.7cd	29.0 $\pm$ 2.2e	81.0 $\pm$ 4.2ab	84.0 $\pm$ 2.2a	23.0 $\pm$ 2.7f
PR	60.7 $\pm$ 5a	46.7 $\pm$ 6.2c	34.2 $\pm$ 12.7d	49.2 $\pm$ 5.4bc	32.7 $\pm$ 10.7d	17.3 $\pm$ 1.5e	58.1 $\pm$ 3.6ab	34.5 $\pm$ 3.0d	8.0 $\pm$ 10.9e
RF	48.0 $\pm$ 4.5a	41.0 $\pm$ 8.9b	19.0 $\pm$ 6.5d	30.0 $\pm$ 3.5c	19.0 $\pm$ 6.5d	5.0 $\pm$ 3.5e	46.0 $\pm$ 2.2ab	29.0 $\pm$ 2.2c	2.0 $\pm$ 2.7e

**Table 3** Effects of PEG concentrations on the callus growth surface ( $\text{mm}^2$ ) in three durum wheat varieties. Presented data are mean values calculated for the three measurements taken over time (at 7, 15 and 30 days) for each variety and each culture condition. DK: Djenah Khetifa; OZ: Oued Zenati; W: Waha; **CGS**: callus growth surface; **RT**: relative tolerance; **R**: reduction percentage. Means followed by the same letter are not statistically different according to the Fisher test ( $P < 0.05$ ).

PEG concentration	0%		10%		20%		Means across treatments	
	CGS	RT%	CGS	R%	CGS	RT%	R%	CGS means
DK	45.56 $\pm$ 3.1a	75.55	34.42 $\pm$ 2.45c	24.45	28.68 $\pm$ 1.2d	62.95	37.05	36.22 $\pm$ 7.57
OZ	39.12 $\pm$ 3.2b	67.84	26.54 $\pm$ 3.2d	32.16	20.54 $\pm$ 2.07e	52.56	47.49	28.74 $\pm$ 8.44
W	29.00 $\pm$ 1.4d	57.38	16.64 $\pm$ 0.7f	42.62	6.40 $\pm$ 0.6g	22.07	77.93	17.35 $\pm$ 9.61
Means	37.89 $\pm$ 7.48	68.26	25.87 $\pm$ 7.84	31.74	18.54 $\pm$ 9.62	48.94	51.06	–

Khetifa seemed to be the most tolerant, showing reduction rates of 24.52% and 37.06% at 10% and 20% PEG, respectively (Table 3). Although a progressive increase in CGS was maintained when calli were incubated on 10% and 20% of PEG, an increase in water stress induced by PEG caused a significant decrease in CGS (especially at the highest PEG concentration) compared with the controls. The callus induction response in terms of callus surface was variety dependent, with Djenah Khetifa showing the highest rate growth under control conditions and the least affected rate under PEG treatment (Table 3). Data recorded after the PEG treatments confirmed that all the studied genotypes had different, but nevertheless high, capacities for callusing under water stress. CGS data were also used to calculate relative tolerance (RT) in order to provide a value for relative comparisons among genotypes, by eliminating inherent differences associated with the growth rate of each genotype in response to water stress. For each genotype, RT was calculated based on the growth difference measured between calli exposed to two PEG concentrations [1]. Djenah Khetifa exhibited the highest tolerance of PEG from 10% to 20% (Table 3), whereas Waha exhibited the lowest RT values under these water stress conditions. Cells that continue to grow under severe stress are tolerant, but PEG might improve callus growth capacity. Bressan et al. [9] reported that an enhanced ability to grow in the presence of water stress was achieved by the exposure of cultured cells to a medium containing PEG. Reduced growth in the presence of PEG in the medium has been reported for several plants, including wheat [35], rice [8] and sugarcane [5]. As plant growth is a result of cell division and enlargement, water stress

would directly restrict growth by slowing down both processes [25], and the most sensitive process to get affected by water deficit is the cell growth [16]. Our results indicated that Djenah Khetifa and Oued Zenati were better at adapting to higher water stress than Waha, which indicated the superiority of these genotypes for *in vitro* water stress tolerance. The calli that actively grew at this stage were considered to be PEG tolerant and were used for further characterization and their ability to regenerate plantlets [23].

### 3.5. Effect of water stress on embryogenic callus production

Significant differences were observed among the genotypes (Table 2). The embryogenic and nonembryogenic calli were distinguished on the basis of their external aspect, as reported in several studies [11,20]. Embryogenic calli have a glossy look, are compact and have a whitish-cream color and a nodular structure, whereas non-embryogenic calli are soft and translucent and have a hyperhydric appearance. In our observations, non-embryogenic callus showing necrosis or browning (Fig. 1C) was not selected for regeneration. According to Sharma et al. [37], the browning of the callus cells was considered as an indicator of tissue culture intolerance to PEG induced drought.

The three genotypes showed high embryogenic callus production rates, the average percentage of embryogenic calli formation from unstressed calli being (73.66%) (Table 2). Waha and Djenah Khetifa had the highest ECP rates (81% and 79.2%, respectively), whereas Oued Zenati had the lowest (61%).

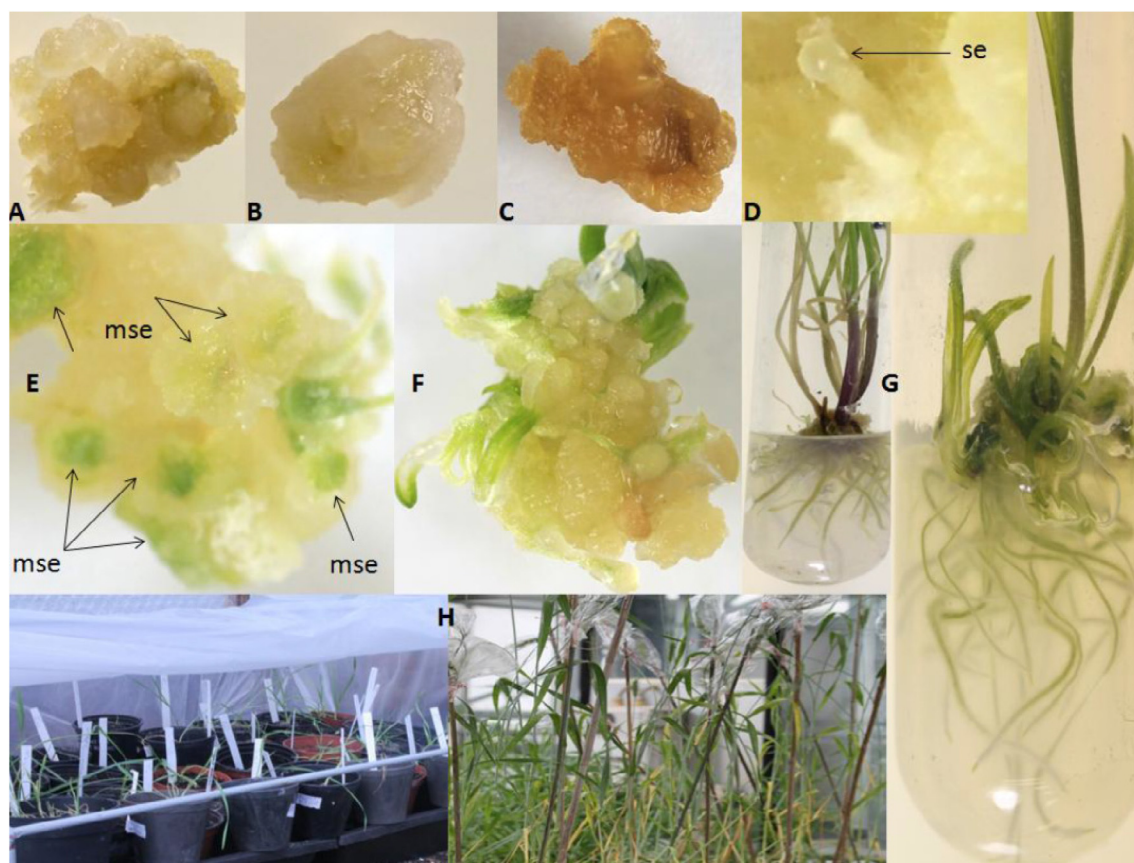
Homogenous grouping using the Fisher LSD Method and a 5% probability level showed that under non-stress conditions Waha had very similar behavior to Djenah Khetifa (Table 2). The ECP was slightly higher when mature embryos were exposed to the moderate water stress treatment (10% PEG treatment) compared with the control conditions (Table 2). The calli had a nodular appearance (Fig. 1A), which is considered a typical physical feature of embryogenic calli. The presence of 10% PEG in the medium might increase the number and quality of embryogenic calli, as reported by Heringer et al. [21] for papaya (*Carica papaya* L.), who noted that PEG treatment facilitated the maturation of somatic embryos and their conversion into plantlets similar to those that originated from seed.

The beneficial effect of PEG in the maturation medium was first reported in *Picea glauca* [4] and it has been shown that different genotypes react in various ways. Moon and Park [28], reported a significant increase in embryogenesis, with more than twice the average number of somatic embryos obtained by doubling the PEG concentration. Stasolla et al. [39], however, reported that the inclusion of PEG (up to 10%) in the maturation medium could improve the number and quality of embryos produced.

A significant reduction in ECP was observed at 20% PEG; this effect being found at this high PEG concentration probably corresponds to more severe physiological conditions. Waha had the highest reduction rate ( $R = 58\%$ ). The resistant varieties (Djenah Khetifa and Oued Zenati) showed minimum reduction in callus initiation (23% and 32%, respectively) at high (20%) PEG levels. This result confirmed that the level of the applied stress affects somatic embryo development and that ECP capacity is genotype dependent. The genotype effect on ECP has been reported in previous studies [8,33].

### 3.6. Effect of water stress on regeneration potential

Calli with green spots developed small shoots and roots simultaneously on regeneration medium (Fig. 1). There was variability among the genotypes in the number of plants regenerated ( $p < 0.05$ ) after a minimum period of 60 days after culture initiation from mature embryos (Table 2). The data indicated that embryogenic calli regenerated at a high frequency on the control medium, particularly Djenah Khetifa (60.7%) and Waha (58.1%). Oued Zenati recorded a mean of 49.2%. These results demonstrated the efficiency of the regeneration



**Figure 1** Callus induction, somatic embryo formation and plant regeneration. (A) An 18-day-old embryogenic callus obtained from the inoculated embryo on MS medium in the presence of PEG. (B) An 18-day-old non-embryogenic callus obtained from the inoculated embryo on MS medium in the absence of PEG. (C) A non-embryogenic callus obtained from the inoculated embryo on MS medium in the presence of 20% PEG. (D) A somatic embryo 20 days after incubation. (E) Matured somatic embryos 45 days after incubation. (F) Germination of a somatic embryo. (G) Continuation of the regeneration in a small glass and root formation on regeneration medium 60 days after incubation. (H) Mature plants derived from embryogenic calli acclimated in a greenhouse. **mse**: mature somatique embryo; **se**: somatic embryo.

**Table 4** Pearson's correlation coefficients between three mature embryo callus characteristics under stress and non-stress conditions. **CIF**: callus induction frequency, **TCI**: time of callus initiation, **CGS**: callus growth surface, **ECP**: embryogenic callus production, **PR**: plant regeneration, **RT**: relative tolerance, **RF**: regeneration frequency.

Variables	CIF	TCI	CGS	ECP	PR	RT	RF
CIF	1	-0.833**	0.878**	0.638	0.915**	0.990**	0.795*
TCI		1	-0.958**	-0.471	-0.746*	-0.836**	-0.616
CGS			1	0.584	0.863**	0.897**	0.752*
ECP				1	0.844**	0.697**	0.917**
PR					1	0.955**	0.962**
RT						1	0.850**
RF							1

\* Significant at the 5% probability level.

\*\* Significant at the 1% probability level.

medium used. Effects of genotype on plant regeneration from embryo cultures have been reported previously [7,44]. Genetic variability can be observed at each step of the morphogenic process of somatic embryogenesis, from the early stages of cell proliferation and callus formation to somatic embryo formation and maturation within the embryogenic calli and through to the ability of these embryos to germinate into plantlets. For all the genotypes, plant regeneration (PR) ability decreased significantly with increasing osmotic stress in selective media (Table 2). Djenah Khetifa had the lowest reduction percentage (14%), followed by Oued Zenati (17%), compared with the control (0% PEG), whereas Waha had the lowest PR percentage and the highest reduction percentage compared with the control (23.6%). After exposure to 20% PEG, the calli exhibited significantly lower PR capacity than the control and with 10% PEG. Djenah Khetifa had a higher PR capacity than Oued Zenati and Waha, with the reduction percentages in PR being 26.5%, 32.37% and 50.1%, respectively.

The tested genotypes differed in their ability to regenerate plants after exposure to PEG concentration (10% and 20%). Djenah Khetifa and Oued Zenati were most able to do this and were therefore the most tolerant genotypes, whereas Waha had a high sensitivity response, especially at high PEG concentration levels (20%).

Under non-stress conditions (0% PEG), however, Waha and Djenah Khetifa produced similar results and the regeneration frequency confirmed these observations (Table 2). We fully expect the selected plants to be highly tolerant, although this remains to be seen. Positive correlation between calli behavior in the presence of osmotic stress and between the plants' levels of drought resistance has been demonstrated by several authors [2,38,40]. Adding PEG 6000 to culture media reduces the water potential of the medium that affects cell division, leading to reduced callus growth, which therefore affects the regeneration ability [13]. A parallel decrease in PR with increasing *in vitro* osmotic stress has been reported for rice [8], wheat [1] and sugarcane [5]. PR provides an opportunity to screen genotypes for water stress.

### 3.7. Correlation analysis

Trait correlation can be a good criterion for screening the best genotypes and indices used. The results in Table 4 showed that the RT% was positively and highly correlated with CIF ( $r = 0.990$ ), CGS ( $r = 0.897$ ), PR ( $r = 0.955$ ) and RF ( $r = 0.850$ ).

These results indicate that genotypes with a high RT had high CIF, CGS, PR and RF, suggesting that these traits could be selected simultaneously for their positive effects on water stress tolerance in durum wheat. Our results accord with those reported by Farshadfar et al. [19], who found significant correlations among most of the traits and suggested that RT could be recommended as a suitable selection criterion for screening water stress-tolerant genotypes. Significant negative correlation coefficients were found between TCI and CIF ( $-0.833$ ), CGS ( $-0.958$ ), PR ( $-0.746$ ) and RT ( $-0.836$ ).

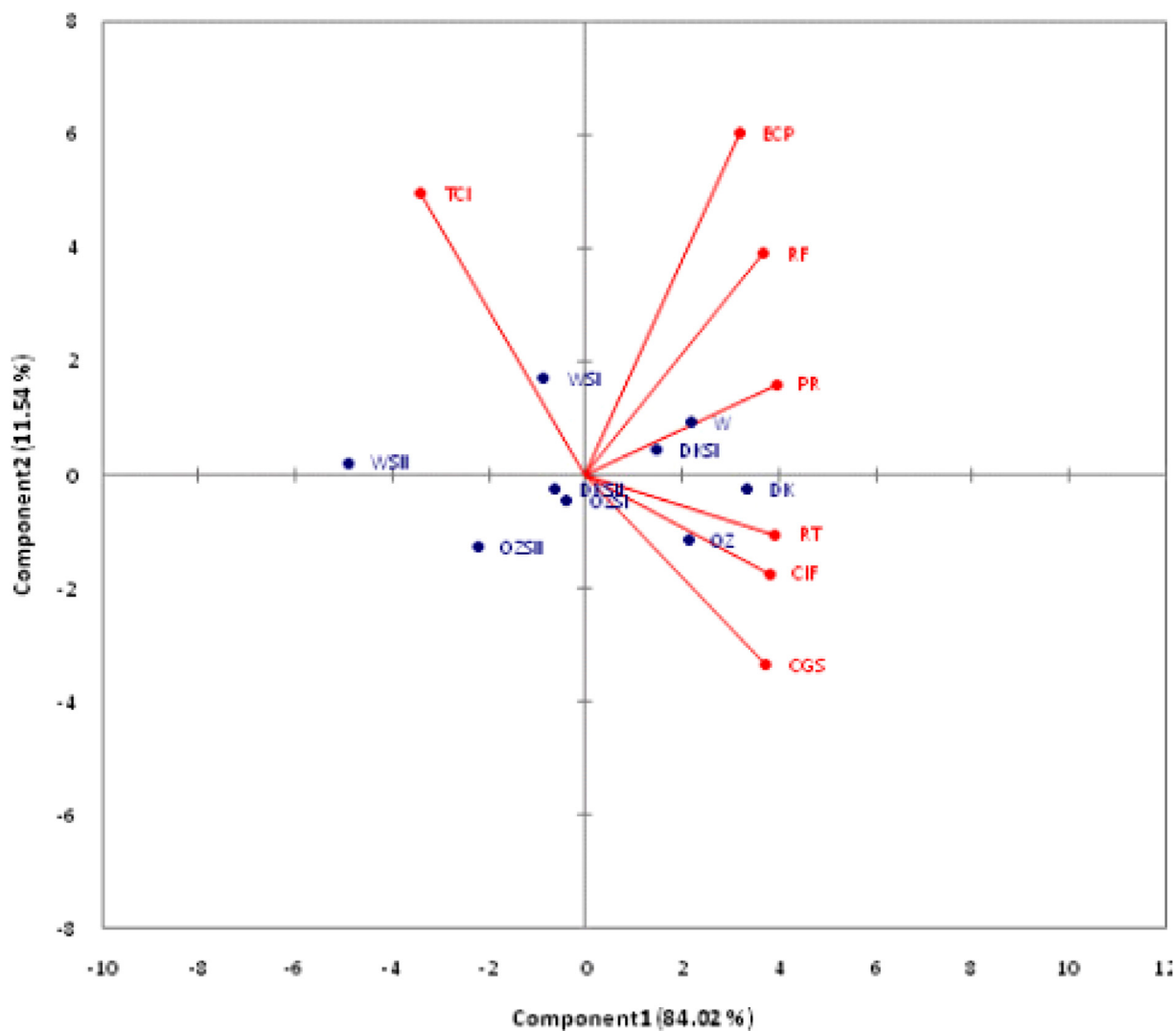
There was no correlation between TCI and ECP, indicating that these variables were not related. It would appear that a variety requiring time to induce calli is not necessarily one with low embryogenic capacity (e.g., Waha), which requires more time to induce calli, but produces the highest rate of embryogenic calli (Table 4).

Also, no significant correlation was observed between CIF and ECP. This indicated that callus induction and embryogenic capacity might be controlled by different mechanisms. Our results were consistent with those reported by Moon and Park [28], who found that more than 90% of explants formed calli, but only 2.5% formed embryogenic calli. There was a highly positive correlation between PR and CIF ( $r = 0.915$ ), CGS (0.863), ECP ( $r = 0.844$ ), RT ( $r = 0.955$ ) and RF ( $r = 0.962$ ), which might indicate that these traits are controlled by the same mechanisms. Viertel et al. [43] reported that the high correlation observed between the ability of cultivars to produce embryogenic calli and their PR capacity indicates that ECP percentages constitute a good index for callus ability to regenerate later on plantlets.

### 3.8. Cluster and principal component analysis

Another approach such as a biplot is needed to identify superior genotypes for both stressed and non-stressed conditions. The relationships among different indices are shown in the biplot in Fig. 2, which explained 95.56% of the total variation of the standardized data. PC1 explained 84.02% of the total obtained variation, with the first dimension essentially defined by CIF, CGS, PR, RF, RT and TCI. PC2 explained 11.54% of total obtained variation, with the second dimension essentially defined by the ECP capacity of genotypes. PC1 alone should be a good indicator of drought tolerance.

Based on the results given above, the most prominent relationships revealed by the biplot were a strong negative associ-



**Figure 2** Biplot graph based on the main components PC1, PC2. The symbols combined the durum wheat genotypes (DK, OZ, and W; see “Section 2”) with the moderate (SI: 10% PEG) and severe (SII: 20% PEG) water stress.

ation between TCI and all the other parameters (CGS, ECP, RT, CIF, PR, RF), as indicated by the large obtuse angles between their vectors. There was a highly significant positive association among RT, CIF and CGS and among PR, RF and ECP, as indicated by the acute angles (Fig. 2). These traits could be used to select and identify genotypes with high tolerance to water stress and/or good competence under *in vitro* culture. Cluster analysis was performed in order to assess the level of dissimilarity among the genotypes under stress or non-stress conditions (Fig. 3).

Group 1 included Djenah Khetifa, Oued Zenati and Waha varieties under non-stress conditions; all these genotypes had high production rates under non-stress conditions only. Group 2 included Djenah Khetifa SII, Djenah Khetifa SI, Oued Zenati SI and Waha SI; Djenah Khetifa genotype had a stable performance in all conditions, but Oued Zenati and Waha were stable at the 10% PEG level only. Group 3 comprised Oued Zenati SII. Group 4 comprised Waha SII and differed greatly from the other groups; Waha is water-stress susceptible

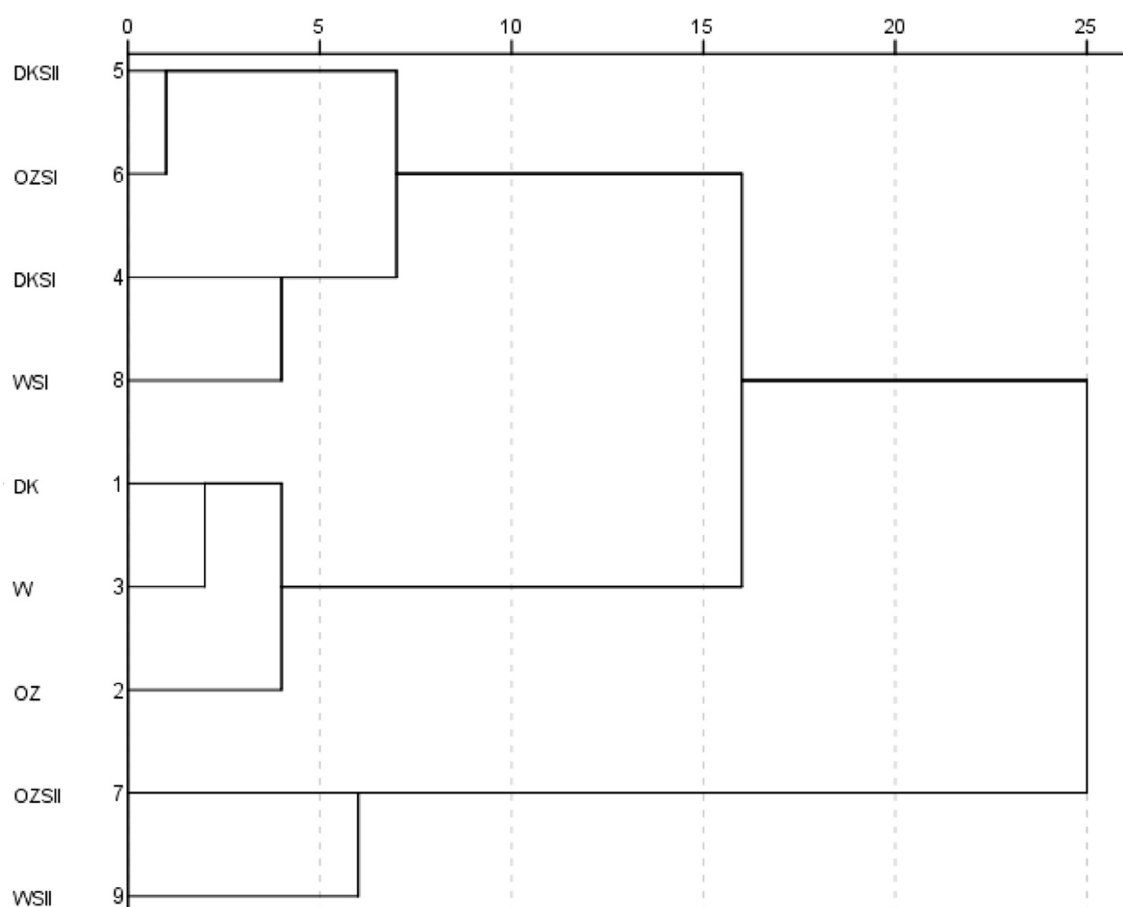
with low capacity at 20% PEG. This classification showed the direct effect of water stress on genotypes and confirmed all previous results and previous classification based on field trials.

This procedure was also employed in bread wheat [15,17,18] and durum wheat [35] for screening selection criteria of drought tolerance. Farshadfar et al. [18] reported that superior genotypes showed drought tolerance at the callus culture level together with their high potential for callus induction and these authors suggested that *in vitro* selection can be used as an effective tool to screen a large number of genotypes to water deficit. However, more investigations such as field and hydroponic conditions studies are needed to corroborate this thought.

#### 4. Conclusion

With regard to all the studied traits, Djenah Khetifa was selected as the most water-stress tolerant genotype under





**Figure 3** Hierarchical cluster analysis of three wheat genotypes under stress and non-stress conditions (Ward's Method).

*in vitro* conditions, followed by Oued Zenati. Waha appeared to be the most sensitive, but also the most embryogenic, under non-stress conditions. The results verified a remarkable variation for callus induction ability in genetic materials under water stress condition that can be used in durum wheat breeding program. These genotypes should be tested in a field trial and then looking for the association or correlation between *in vitro* and *in vivo* conditions. The selected cells and plants will provide a tool for determining the mechanisms involved in tolerance to water stress. We suggest that *in vitro* screening method for drought tolerance would be an appropriate route to develop drought-tolerant lines in durum wheat.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria and Walloon Agricultural Research Centre in Belgium. We thank the both institutions for their assistance.

#### References

- [1] A. Abdelsamad, O.E. El-Sayed, F. Ibrahim, Development of drought tolerance haploid wheat using biochemical genetic markers on *in vitro* culture, *J. Appl. Sci. Res.* 3 (2007) 1589–1599.
- [2] T. Ali Dib, P. Monneveux, E. Acevedo, M.M. Nachit, Evaluation of proline analysis and chlorophyll fluorescence quenching measurements as drought tolerance indicators in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum), *Euphytica* 79 (1994) 65–73.
- [3] O. Alikina, M. Chernobrovkina, S. Dolgov, D. Miroshnichenko, Tissue culture efficiency of wheat species with different genomic formulas, *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 16 (2016) 307–314.
- [4] S.M. Attree, D. Moore, V.K. Sawhney, L.C. Fowke, Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce (*Picea glauca* [Moench.] Voss) somatic embryos: effects of a nonplasmolysing water stress and abscisic acid, *Ann. Bot.* 68 (1991) 519–525.
- [5] M.K. Begum, M.O. Islam, M.A.S. Miah, M.A. Hossain, N. Islam, Production of somaclone *in vitro* for drought stress tolerant plantlet selection in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), *The Agriculturists* 9 (2011) 18–28.
- [6] M. Berhan, M. Firew, A. Eyasu, *In vitro* screening of cactus [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] genotypes for drought tolerance, *Am. J. Plant Sci.* 7 (2016) 1741–1758.
- [7] R. Bi, H. Wang, Primary studies on tissue culture from mature embryos in diploid and tetraploid wheat, *Front. Agric. Chin.* 2 (2008) 262–265.
- [8] J. Biswas, B. Chowdhury, A. Bhattacharya, A.B. Mandal, *In vitro* screening for increased drought tolerance in rice, *Vitro Cell Dev. Biol.* 38 (2002) 525–530.
- [9] R.A. Bressan, P.M. Hasegawa, A.K. Handa, Resistance of cultured higher plant cells to polyethylene glycol-induced water stress, *Plant Sci. Lett.* 21 (1981) 23–30.

- [10] H. Chauhan, S.A. Desai, P. Khurana, Comparative analysis of the differential regeneration response of various genotypes of *Triticum aestivum*, *Triticum durum* and *Triticum dicoccum*, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 91 (2007) 91–199.
- [11] F. Delporte, O. Mostade, J.M. Jacquemin, Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 67 (2001) 73–80.
- [12] S.S. Dhanda, G.S. Sethi, R.K. Beh, Indices of drought tolerance in wheat genotypes at early stages of plant growth, *J. Agron. Crop Sci.* 190 (2004) 6–12.
- [13] A.A. Ehsanpour, A. Razavizadeh, Effect of UV-C on drought tolerance of alfalfa (*Medicago sativa*) callus, *Am. J. Biochem. Biotech.* 1 (2005) 107–110.
- [14] M.A. El Siddig et al, Preliminary screening for water stress tolerance and genetic diversity in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars from Sudan, *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 11 (2013) 87–94.
- [15] P. Elyasi, E. Farshadfar, M. Aghae, Response of bread wheat genotypes to immature embryo culture, callus induction and drought stress, *Curr. Res. J. Biol. Sci.* 4 (2012) 372–380.
- [16] M. Farooq, A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita, S.M.A. Basra, Plant drought stress: effects, mechanisms and management, *Agron. Sustain. Dev.* 29 (2009) 185–212.
- [17] E. Farshadfar, R. Amiri, In vitro application of integrated selection index for screening drought tolerant genotypes in common wheat, *Acta Agric. Slovenica* 107 (2016) 335–344.
- [18] E. Farshadfar, B. Jamshidi, M. Chehri, Assessment of immature embryo culture to select for drought tolerance in bread wheat, *Int. J. Bio-Sci.* 4 (4) (2014) 194–203.
- [19] E. Farshadfar, S. Kianifar, R. Chaghakabodi, GT biplot analysis of genetic diversity in bread wheat using *in vitro* indicators of drought tolerance, *Int. J. Biol. Sci.* 7 (2015) 1439–1447.
- [20] H. Gandonou, T. Errabii, J. Abrinii, M. Idaomar, F. Chibi, N. Skali Senhaji, Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane, *Afr. J. Biotech.* 4 (2005) 1250–1255.
- [21] A.S. Heringer, E.M. Vale, T. Barroso, C. Santa-Catarina, V. Silveira, Polyethylene glycol effects on somatic embryogenesis of papaya hybrid UENF/CALIMAN 01 seeds, *Theor. Exp. Plant Physiol.* 25 (2013) 116–124.
- [22] Z. Hossain, A.K.A. Mandal, S.K. Datta, A.K. Biswas, Development of NaCl-tolerant line in *Chrysanthemum morifolium* Ramat through shoot organogenesis of selected callus line, *J. Biotechnol.* 129 (2007) 658–667.
- [23] N.S. Kacem, S. Mauro, Y. Muhovski, F. Delporte, J. Renaut, A. Djekoun, B. Watillon, Diagonal two dimensional electrophoresis (D-2DE): a new approach to study the effect of osmotic stress induced by polyethylene glycol in durum wheat (*Triticum durum* Desf.), *Mol. Biol. Rep.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-016-4028-5>.
- [24] A.G.A. Khaled, M.H. Motawea, A.A. Said, Identification of ISSR and RAPD markers linked to yield traits in bread wheat under normal and drought conditions, *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 13 (2015) 243–252.
- [25] J. Levitt, in: *Responses of Plants to Environmental Stresses: Water, Radiation, Salt and Other Stresses*, second ed., Academic Press, New York, 1980, pp. 365–402.
- [26] I. Mahmood, A. Razaq, I.A. Hafiz, S. Kaleem, A.A. Khan, A. Qayyum, et al, Interaction of callus selection media and stress duration for *in vitro* selection of drought tolerant callus of wheat, *Afr. J. Biotech.* 11 (2012) 4000–4006.
- [27] N.P. Money, Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols: relationship between molecular weight and vapor pressure deficit, *Plant Physiol.* 91 (1989) 766–769.
- [28] H.K. Moon, S.Y. Park, Somatic embryogenesis and plantlet production using rejuvenated tissues from serial grafting of a mature *Kalopanax septemlobus* tree, *Vitro Cell Dev.-Pl.* 44 (2008) 119–127.
- [29] L.C. Morey, R.K. Blashfield, H.A. Skinner, A comparison of cluster analysis techniques within a sequential validation framework, *Multivariate Behav. Res.* 18 (1983) 309–329.
- [30] T. Murashige, F. Skoog, A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* 15 (1962) 473–479.
- [31] C.D. Oneto, M.E. Otegui, I. Baroli, A. Beznec, P. Faccio, E. Bossio, E. Blumwald, D. Lewi, Water deficit stress tolerance in maize conferred by expression of an isopentenyltransferase (IPT) gene driven by a stress and maturation-induced promoter, *J. Biotechnol.* 220 (2016) 66–77.
- [32] M. Özgen, M. Türet, S. Özcan, C. Sancak, Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes, *Plant Breeding* 115 (1996) 455–458.
- [33] M. Özgen, M. Türet, S. Altinok, C. Sancak, Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes, *Plant Cell Rep.* 18 (1998) 331–335.
- [34] S. Rao, F.T.Z. Jabeen, *In vitro* selection and characterization of polyethylene glycol (PEG) tolerant callus lines and regeneration of plantlets from the selected callus lines in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), *Physiol. Mol. Biol. Plants* 19 (2013) 261–268.
- [35] M. Razmjoo, R. Mohammadi, L. Shoostari, *In vitro* evaluation of durum wheat genotypes for drought tolerance, *J. New Biol. Rep.* 4 (2015) 33–40.
- [36] A.R. Reddy, K.V. Chaitanya, M. Vivekanandan, Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants, *J. Plant Physiol.* 161 (2004) 1189–1202.
- [37] D. Sharma, N. Kumar, V. Pandey, S.C. Shankhdhar, D. Shankhdhar, In vitro evaluation of antioxidant potential under drought stress in endangered drought stress in endangered *Withania somnifera*, *The Bioscan* 11 (2016) 93–99.
- [38] B. Simane, P.C. Struik, M.M. Nachit, J.M. Peacock, Ontogenic analysis of yield stability of durum wheat in water-limited environments, *Euphytica* 71 (1993) 211–219.
- [39] C. Stasolla, L. Van Zyl, U. Egertsdotter, D. Craig, W. Liu, R.R. Sederoff, The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos, *Plant Physiol.* 131 (2003) 49–60.
- [40] S. Trivedi, G. Galiba, N. Sankhla, L. Erdei, Responses to osmotic and NaCl stress of wheat varieties differing in drought and salt tolerance in callus cultures, *Plant Sci.* 73 (1991) 227–232.
- [41] I. Turkan, M. Bor, F. Ozdemir, H. Koca, Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress, *Plant Sci.* 168 (2005) 223–231.
- [42] M. Vachon, D. Beaulieu-Prévost, A. Ouellette, M. Achille, Analyse de classification hiérarchique et qualité de vie, *Tut. Quant. Meth. Psychol.* 1 (2005) 25–30.
- [43] K. Viertel, A. Schmid, M. Iser, D. Hess, Regeneration of German spring wheat varieties from embryogenic scutellar callus, *J. Plant Physiol.* 152 (1998) 167–172.
- [44] Y. Yu, Z.M. Wei, Influences of cefotaxime and carbenicillin on plant regeneration from wheat mature embryos, *Biol. Plant.* 52 (2008) 553–556.

<b>Nom et prénom : KACEM Nadia Sandra</b>		<b>Date de soutenance</b>
<b>Thème :</b> Sélection <i>in vitro</i> pour la tolérance au stress hydrique chez le blé dur ( <i>Triticum durum</i> Desf): approche protéomique, transcriptomique et génétique.		
<b>Nature du diplôme :</b> Doctorat en Sciences, <b>Option</b> Biotechnologie Végétale		
<b>Résumé</b>		
<p>L'évaluation de l'aptitude de trois génotypes de blé dur (Djenah Khetifa, Oued Zenati et Waha) à la tolérance au stress hydrique simulé <i>in vitro</i> par différentes concentrations de PEG 6000 a indiqué des différences significatives entre les génotypes, les niveaux de stress PEG et leurs interactions pour tous les caractères étudiés, indiquant une variabilité génétique en réponse au stress hydrique. Les concentrations de PEG entravent négativement tous les paramètres étudiés. En revanche, la survie de quelques lignées cellulaires après un stress osmotique élevé démontre la sélection de cals tolérants au stress hydrique. Le criblage <i>in vitro</i> pour la tolérance au stress isole la variété Djenah Khetifa comme la plus tolérante et Waha comme la plus sensible. Les paramètres étudiés peuvent constituer des critères de sélection appropriés pour le criblage de génotypes tolérants à la sécheresse. Trois locus (<i>gwm331</i>, <i>gwm335</i> et <i>gwm427</i>) amplifiables et reproductibles ont été retenus. Ces loci ont fourni au total 78 loci monomorphes dont 69 ont été détectés chez les somaclones. Cinq variants somaclonaux ont été obtenus (DKR<sub>1</sub>-S1, DKR<sub>1</sub>-S2, OZR<sub>1</sub>-S2, WR<sub>1</sub>-C3 et WR<sub>1</sub>-S1) avec deux marqueurs SSR seulement. Le taux de variation génétique s'élève à 21.74%. La présence de la forte pression osmotique dans le milieu de culture peut être à l'origine de ces variations génétiques. Les marqueurs étudiés pourraient servir pour l'étude de l'uniformité de plantules issues de culture de tissus et l'identification des variétés chez le blé dur. La variation somaclonale ne peut pas toujours être détectée au niveau morphologique. L'analyse des protéines par une nouvelle approche nommée électrophorèse diagonale bidimensionnelle (D-2DE) puis par spectrométrie de masse MALDI-TOF a permis d'identifier six protéines différenciellement exprimées. Parmi les protéines candidates identifiées nous avons déterminé le niveau d'expression des ARNm de trois gènes (globuline, GAPDH et peroxidase) et d'un gène ubiquitaire (actine) par qRT-PCR pour chaque variété. Les quantités d'ARNm des trois gènes étaient partiellement corrélées aux quantités de protéines identifiées. L'analyse par immunoblot a confirmé l'accumulation différentielle des protéines (globuline et GAPDH) en réponse au stress hydrique. Les protéines identifiées grâce à cette technique mettent en évidence des composantes originales de la réponse de cals au stress osmotique. Notre méthode d'étude fournit une approche originale et pertinente permettant de contribuer de manière significative à une meilleure compréhension des liens possibles pouvant exister entre l'abondance de protéines spécifiques et l'acclimatation du blé dur au stress hydrique à l'échelle cellulaire.</p>		
<b>Mots clés :</b> Blé dur, électrophorèse diagonale bidimensionnelle, marqueur moléculaire, PEG 6000, sélection <i>in vitro</i> , stress hydrique, variation somaclonale, qRT-PCR, Western blot.		
<b>Laboratoire de recherche :</b> Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale-UFM		
<b>Membre de jury :</b>		
<b>Président</b>	YKHLEF Nadia.	Professeur Université des Frères Mentouri Constantine
<b>Directeur de thèse</b>	DJEKOUN Abdelhamid.	Professeur Université des Frères Mentouri Constantine
<b>Co-directeur de thèse</b>	MUHOVSKI Yordan.	Dr. Centre Wallon de Recherche Agronomique Gembloux
<b>Examinateur</b>	KHELIFI Douadi.	Professeur Université des Frères Mentouri Constantine
<b>Examinateur</b>	BENDERRADJI Laid.	M.C.A Université Mohamed Boudiaf M'sila
<b>Examinateur</b>	GAOUAR B.S.Souheil	M.C.A Université Abou Bekr Bêlkaid Tlemcen