

## Revue bibliographique

# Amélioration de la production des plantes haploïdes et haploïdes doublés utilisant la culture des anthères du blé

F. HENKRAR<sup>1,2,3</sup>, S.M. UDUPA<sup>1</sup>, D. IRAQI<sup>2</sup>, N. BENDAOU<sup>3</sup>

(Reçu le 22/03/2017; Accepté le 22/04/2017)

## Résumé

La production des plantes haploïdes et haploïdes doublés, fournit aux sélectionneurs du blé un moyen très efficace pour accélérer la production des lignées homozygotes. La culture des anthères est un parmi les processus d'induction et de régénération des haploïdes et des haploïdes doublés à partir des gamètes mâles. Son haut potentiel de production des plantes haploïdes et son applicabilité chez nombreuses espèces rendent cette technique remarquablement utilisable dans l'amélioration des plantes et l'exploitation commerciales des haploïdes doublés. De ce fait, l'objectif de cette revue est de discuter les publications les plus récentes sur l'amélioration de la culture des anthères de blé et les comparer aux résultats plus ou moins anciens. Ces publications seront d'une grande utilité dans l'amélioration du rendement des plantes haploïdes et haploïdes doublés et ils vont contribuer à faciliter les prochains travaux sur la culture des anthères.

**Mots clés:** Blé, culture des anthères, haploïdes, haploïdes doublés, amélioration génétique.

## Improvement of haploid and doubled haploid plants using wheat anther culture

### Abstract

The production of haploids and double haploids, are widely used techniques in advanced breeding programs to speed-up the production of homozygote lines. Anther culture is one of the processes of induction and regeneration of haploids and double haploids from male gametic cells. Due to its high effectiveness and applicability in numerous plant species, it has outstanding potential for plant breeding and commercial exploitation of double haploids. Therefore, the objective of this revue is to discuss recent publications on improvement of wheat anther culture and compare it with older literature. Those publications will be of great utility in yield improvement of haploid and double haploid plants and will contribute for future research on anthers culture.

**Keywords:** Wheat, anther culture, haploids, doubled haploids, genetic improvement.

## INTRODUCTION

La production de plantes haploïdes dérivées des hybrides et suivies par un doublement chromosomique, fournit aux sélectionneurs du blé un moyen très efficace pour accélérer la production des nouvelles lignées (Henry et De Buyser, 1990). Les haploïdes doublés peuvent être utilisés comme des lignées recombinantes avec des combinaisons de gènes favorables (Bentolila et al., 1992). Cette technique pourrait ainsi compléter les programmes d'amélioration conventionnelle pour accélérer la production de nouvelles variétés. En plus de son importance dans la production de nouvelles lignées mieux adaptées, la culture des anthères peut être utilisée dans divers buts, notamment dans la transformation génétique où les cals régénérés des anthères peuvent être de bons accepteurs des gènes.

La culture des anthères est une technique extrêmement utilisée pour la production des haploïdes doublés. Chez le blé, la première culture des anthères testée était en Chine en 1973 par Ouyang et al. (1973). Ensuite, l'efficacité de cette technique a été démontrée par Hu et al. (1983, 1988). Deux nouvelles variétés Jinghua n°1 et n°764 ont été réalisées en utilisant des lignées haploïdes doublées. Cette méthode a aussi été mise en pratique en France et en Hongrie, deux nouvelles variétés cultivées Florin (De

Buyser et al., 1987) et Gk Delibab (Pauk et al., 1995) ont été respectivement créées en 1985 et 1995. La variété Florin (De Buyser et al., 1987) est l'une des toutes premières variétés au monde qui provient de cette méthode. Elle a été inscrite en 1985, 7 ans après le croisement de départ entre les deux parents. Le blé Florin est encore cultivé actuellement en Belgique. Il est bien adapté au froid et aux terrains lourds.

Dans cette revue, on discutera les publications les plus récentes afin de découvrir les nouveaux protocoles exploités dans l'amélioration de la culture des anthères et la production des haploïdes doublés.

## COMMENT AMÉLIORER LA CULTURE DES ANTHÈRES DE BLÉ ET OBTENIR LE MAXIMUM DE PLANTES HAPLOÏDES ET HAPLOÏDES DOUBLES ?

La réussite de la culture des anthères comme d'autres techniques est influencé par plusieurs facteurs comme le génotype utilisé (Andersen et al., 1987), les conditions de croissance des plantes mères (Orshinsky et Sadasi-vaiah, 1997), le stade de développement des microspores (Haggag et El-Hennawy, 1996), le prétraitement et la composition du milieu de culture (Lazaridou et al., 2005).

<sup>1</sup> ICARDA-INRA Cooperative Research Project, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), Rabat, Maroc. Email: f.henkrar@cgiar.org

<sup>2</sup> Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), B.P. 415, Rabat, Maroc

<sup>3</sup> Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie Végétale, Faculté des sciences, B.P. 1014, Université Mohammed V - Rabat, Maroc

## Le génotype

Une grande variabilité génétique est présente au sein de la même espèce. Plusieurs études ont prouvé que le génotype a un effet variable sur la production des embryons et la régénération des plantes vertes et albinos ainsi que sur l'obtention des haploïdes doublés. Chez le blé tendre, Andersen *et al.* (1987), sur une collection de près de 200 variétés et lignées scandinaves, ont mis en évidence des fluctuations du rendement androgénétique d'une variété à l'autre. En plus, la translocation 1BL/1RS (Blé/Seigle) est connue pour son effet très positif sur le rendement androgénétique (Henry et De Buyser, 1985). Picard et de Buyser (1977) ont montré que les haploïdes doublés obtenus par androgenèse étaient souvent plus embryogènes que les génotypes mères dont ils étaient issus.

El-Hennawy *et al.* (2011) ont étudié la réponse androgénétique de 9 génotypes de blé tendre égyptien et leur descendance F1. Ils ont trouvé eux aussi une variabilité génétique considérable, ils ont signalé que le nombre de calcs obtenus était plus élevés pour les croisements que les parents. De même, Lantos *et al.* (2013), ont testé leur protocole de culture des anthères sur deux génotypes d'hiver, un génotype avec un potentiel androgénétique élevé et un autre récalcitrant, ainsi que leurs hybrides F1 dont les croisements ont été faits dans deux années 2010 et 2011. Lantos *et al.* (2013) ont trouvé que le génotype influence le nombre d'embryons que sur la régénération des plantules et le nombre des plantules vertes. En plus, ils ont remarqué que le nombre des plantes albinos est influencé par le génotype, les années et les facteurs environnementaux.

Aussi, dans une étude réalisée par Pershina *et al.* (2013) sur des variétés de blé de printemps Sibérien, certaines de ces variétés possèdent la translocation de seigle (1RS/1BL) et d'autres portent la translocation de l'herbe de blé (7DL/7Ai). En plus, ces auteurs ont inclus une variété très encourageante qui contient la translocation 1RS/1BL et le cytoplasme de l'espèce de l'orge (*Hordeum vulgare* L), sachant que la translocation 1RS/1BL stimule la formation des embryons (Henry et De Buyser, 1985; Agache *et al.*, 1989; Foroughi-Wehr et Zeller, 1990). La présence de la translocation 7DL/7Ai dans le génome du blé conduit à la suppression d'androgenèse et cause la déficience en chlorophylle (Sibikeeva et Sibikeev, 1996; Sibikeeva *et al.*, 2004). Ces auteurs ont trouvé que la variété possédant 1RS/1BL et le cytoplasme de l'orge est la mieux adaptée pour l'androgenèse et le développement des haploïdes doublés. Aussi, ils ont mentionné dans leur discussion que les variétés portant la translocation 1RS/1BL donne les meilleurs résultats par rapport aux variétés qui n'ont pas la translocation, surtout dans le milieu contenant le 2,4-D, alors que pour les variétés portant la translocation 1DL/1Ai, la capacité androgénétique était trop faible et les plantes régénérées étaient albinos. Très récemment, Zhao *et al.* (2015) ont développé un nouveau germoplasm H307 avec une haute capacité en culture des anthères et en régénération des plantes vertes par rapport aux variétés (Yumai68, Yanzhan4110, Bainongaikang58, Zhoumai18, Xinmai18 et Nongda3308) connus pour leur capacité modérée. Ce germoplasm était issu d'un croisement entre Yanfu188 et

Jimai37 dont les épis de la génération F1 étaient irradiés par les rayons Gamma. Ils ont aussi ajouté que cette capacité est héritable et que H307 peut être utilisé dans l'amélioration de la culture des anthères du blé.

## La plante mère

Les conditions physiologiques et développementales des plantes donneuses d'anthères influencent significativement la production des haploïdes. Henry et De Buyser (1990) ont remarqué que l'intensité élevée de la lumière au stade méiotique augmente la formation d'embryons alors que la température élevée diminue leurs inductions. Certaines études ont mentionné que les plantes mères de blé d'hiver plantées dans le champ donnent de meilleurs résultats que celles en serre. De même, pour le blé du printemps, il semble que les plantes donneuses des anthères cultivées dans le champ ou vernalisées puis transférées au champ donnent plus de plantules que celles poussant dans la serre (Ouyang, 1986; Wang et Chen, 1980). Dans d'autres cas, la chambre de culture ou la serre donne des résultats mieux que le champ (Lazar *et al.*, 1984) et en général la croissance des plantes dans la serre est avantageuse puisque la plantation peut être faite tout au long de l'année et le risque de contamination diminue pendant la culture *in vitro*. Cependant, il est très important de gérer la température, l'intensité et la qualité de la lumière pour qu'elles soient plus naturelles.

Récemment, en travaillant avec des génotypes européens, Lantos *et al.* (2013) ont suivi un protocole de croissance utilisé en Europe. La fertilisation a comporté l'addition de 12 g/m<sup>2</sup> de la fumure comme source d'azote, de phosphore et de potassium (1:1:1) en automne et l'ajout de 18 g/m<sup>2</sup> de nitrate d'ammonium en mi-Avril. Les plantes donneuses ont été protégées des insectes par un traitement chimique (Talsar et Bulldock). Les mauvaises herbes ont été contrôlées par un traitement mécanique (avant l'apparition), traitement chimique (début d'apparition des herbes) et traitement manuel durant la période de végétation.

## Stade de récolte

Le stade de développement microsporal lors de la récolte des épis et de l'inoculation est un facteur déterminant de la culture des anthères ou de microspores. La majorité des auteurs ont confirmé que le meilleur stade est juste avant la division mitotique, à partir de mi-stade uninucléé à la fin de stade uninucléé du pollen (Figure 1). Avant la mise en culture des anthères ou des microspores, le stade est déterminé par observation cytologique des microspores dans une goutte de carmin acétique entre lame et lamelle.

## Le prétraitement

Plusieurs travaux ont souligné l'importance des prétraitements et leur rôle dans l'optimisation de la réponse androgénétique, particulièrement au niveau de trois phases: l'induction, la production des embryons et la conversion des embryons en plantes chlorophylliennes. En plus, plusieurs expériences et protocoles améliorés ont été publiés sur cette étape due à son importance et son influence sur l'obtention d'un nombre élevé de plantules.

Les auteurs se concentrent plus sur le pré-traitement thermique et chimique.

Le pré-traitement au froid est le traitement le plus connu et répandu dans la majorité des publications. Les épis récoltés sont mis dans de l'eau puis incubés à 3-4°C pendant 2 à 7 jours et parfois jusqu'à deux mois. Actuellement, ce pré-traitement est devenu une routine dans différents laboratoires. Khibani et al. (2008) ont travaillé sur des variétés de blé iranien et leur ségrégation F3. Ils ont comparé deux types de pré-traitements, le froid et l'irradiation. Les épis sélectionnés pour la culture des anthères ont été soumis à un pré-traitement au froid à 4°C pendant une semaine à un endroit obscur. Pour d'autres épis, ils ont été soumis à la radiation à la place de pré-traitement à froid. Ces auteurs ont trouvé que l'irradiation ne donne pas des différences significatives alors que le pré-traitement à froid donne de meilleurs résultats avec des différences significatives entre les génotypes.

Lantos et al. (2013) ont aussi appliqué le pré-traitement au froid. Les épis récoltés ont été mis dans 200 ml d'eau et protégés du dessèchement puis incubés à 2-3°C pendant 10 à 14 jours. En revanche, d'autres publications remarquent que le pré-traitement au froid n'était pas suffisant pour certaines plantes mères cultivées au champ (Henry et De Buyser, 1990). Aussi, Karimzadeh et al. (1995) ont démontré que le pré-traitement au froid n'est pas essentiel pour tous les génotypes. Dans cette étude, un pré-traitement au froid à 4°C durant une semaine n'avait pas d'effet significatif sur la régénération de plantes chlorophylliennes.

D'autres expériences ont combiné les pré-traitements au froid avec d'autres pré-traitements. Hu et Kasha (1999) ont rapporté que chez le blé, le pré-traitement des épis dans une solution du mannitol à 0,4 M et maintenus au froid pendant 4 jours, retarde la division mitotique des noyaux et maintient toutes les microspores au même stade durant le pré-traitement, conduisant ainsi à la formation d'un très grand nombre d'embryons. L'utilisation d'un pré-traitement au froid pendant 6 ou 7 jours dans une solution de mannitol à 0,4 M, en présence des macroéléments du milieu FHG (Hunter, 1988), présentait un effet bénéfique

sur l'embryogenèse et la production d'embryons et sur la régénération des plantes chlorophylliennes chez le blé par culture de microspores isolées (Hu et al., 1995).

Un nouveau pré-traitement chimique pour microspores isolées chez le blé tendre a été mis en application par Liu et al. (2002). Les talles prélevées de la serre au stade uninucléé moyen à tardif ont été placées dans une fiole stérile contenant 50 ml du mélange 2-HNA (0-1 g/L) du 2,4-D (10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) et du BAP (10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>). Ensuite, les talles ont été placées dans une étuve régulée à 33°C pour une durée allant de 48 heures à 72 heures. Ils ont démontré l'efficacité du nouveau pré-traitement chimique non seulement sur l'induction et la production d'embryons, mais aussi au niveau de la régénération des plantes chlorophylliennes et la production des plantes haploïdes doublées. Dans ces conditions optimales, Liu et al. (2001) ont obtenu des résultats très intéressants. En effet, le nouveau pré-traitement chimique a induit une forte production embryonnaire.

Avec le même principe, Liu et al. (2002) ont amélioré le nouveau protocole par l'addition d'un milieu NPB98 (10%) et l'acide gibbérellique dans la solution du pré-traitement. 50 ml de l'eau distillée stérile avec 0.01% de 2-acide hydroxy-nicotinique (2HNA), 10 mg/l de 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2 mg/l de 6-benzylaminopurine (BAP), 3 mg/l d'acide gibbérellique (l'inducteur chimique), avec ou sans 10% de NPB98 (milieu d'induction). Ce milieu contient (232 mg/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,415 mg/L KNO<sub>3</sub>, 83 mg/L CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O, 200 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 93 mg/L MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 5 mg/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,0125 mg/L CoCl-6H<sub>2</sub>O, 0,0125 mg/L CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O, 0,4 mg/L KI (Iodure de Potassium), 5 mg/L MnSO<sub>4</sub>-4H<sub>2</sub>O, 0,0125 mg/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O, 5 mg/L ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 37,3 mg/L Na<sub>2</sub>EDTA, 27,8 mg/L FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 50 mg/L myo-inositol, 0,5 mg/L acide nicotinique, 0,5 mg/L pyridoxine-HCl, 5 mg/L thiamine-HCl, 500 mg/L glutamine, 1 mg/L acide phénylacétique, and 9% (w/v) maltose, le pH a été ajusté à 7 et le milieu a été stérilisé par filtration. Puis, les talles ont été incubées à 33°C pendant 69 h. En testant ce pré-traitement sur un génotype

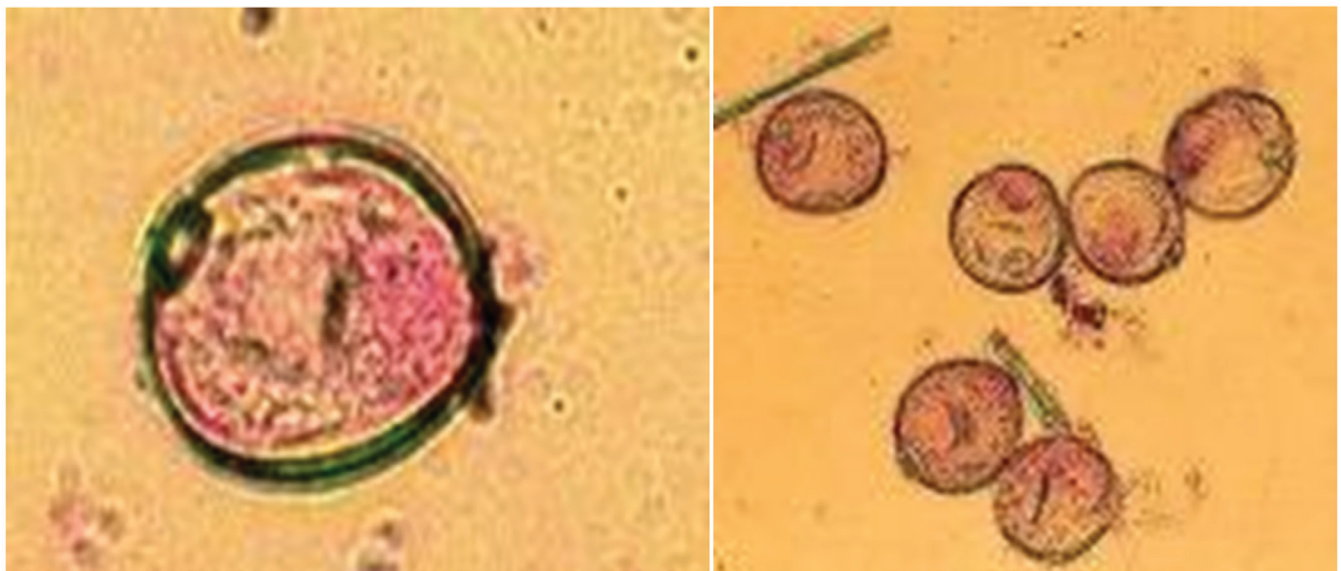


Figure 1: Observation microscopique des microspores uninucléées colorées avec le carmin acétique



connu pour sa production modérée en plante albinos, Liu et al. (2002) ont obtenu 15% d'augmentation en plantes régénérées et 27% d'augmentation en plantes vertes. Ces nouveaux protocoles développés par Liu et al. (2001 et 2002) peuvent être considérés comme une contribution efficace à l'amélioration de l'androgénèse de blé.

Toujours avec l'utilisation des pré-traitements chimiques, Broughton (2011) a réalisé une nouvelle expérience sur la culture des anthères de deux variétés australiennes de blé tendre. L'expérience était une combinaison de deux traitements, soumettre les anthères à un pré-traitement au mannitol avec l'addition du calcium et des macronutriments dans le milieu de mannitol traité avec 0,1% ou 0,2% de n-butanol. Selon cette étude, ces deux traitements augmentent significativement le nombre d'embryons obtenus, le nombre de plantes vertes et les haploïdes doublés. Aussi, ils ont trouvé qu'il existe un effet positif sur l'interaction génotype et traitement.

Chez le blé dur, sachant que cette espèce est récalcitrante, et dans le but d'améliorer le rendement de la régénération des plantes vertes, Ayed (2010) a testé l'effet de différents pré-traitements sur des épis de variétés tunisiennes. Sept types de pré-traitements avec témoin ont été appliqués (témoin = sans pré-traitement, pré-traitement au froid à 4°C pour une durée de 5 semaines, 0,3 M mannitol incubé à 4°C pendant 12 jours, 0,3 M mannitol incubé à 4°C pendant 7 jours, 0,7 M mannitol incubé à 4°C pendant 5 jours, PEG4000 1,5% à 4°C pendant 5 jours, PEG4000 1% à 4°C pendant 10 jours, PEG4000 1% à 4°C pendant 15 jours). Ils ont démontré que le pré-traitement au froid pendant 5 semaines a donné les meilleurs résultats, et qu'il améliore significativement l'induction d'embryons et la régénération des plantes vertes. En plus, le pré-traitement au PEG 1% pendant 10 jours semble être intéressant comme pré-traitement. De même, Labbani et al. (2007) ont combiné deux traitements, le mannitol et le froid. Ils ont trouvé que les épis de blé dur (*Triticum turgidum* L. 'Jennah Khetifa') pré-traité avec une solution 0,3 M de mannitol et incubé à 4°C pendant 7 jours avaient un fort effet sur le nombre d'embryons produit et sur le nombre des plantes vertes régénérées. Ils ont démontré que la combinaison des deux pré-traitements donne les meilleurs résultats par rapport aux autres études publiées.

Un nouveau traitement a été réalisé et publié par Redha et Suleman (2013). Ils ont soumis les microspores extraites à deux traitements (Polyamines et tréhalose). Les polyamines (PAs) contenant trois substances séparées et en combinaison: putrescine (Put), spermidine (Spd) et spermine (Spm) dans l'ordre de 0,5 à 1 mM et les tréhaloses. Ils ont trouvé que les polyamines ont un impact significativement positif sur l'embryogenèse et taux des plantes vertes contrairement au tréhalose. Redha et Suleman (2013) ont mentionné que l'efficacité des polyamines dépend de la durée du traitement et de la concentration utilisée puisque la durée 30 min a donné meilleurs résultats par rapport à 60 min. Ils ajoutent que les polyamines augmentent non seulement le rendement des plantes régénérées mais aussi le rendement en haploïdes doublés et le taux en graines et que ce traitement peut être utilisé pour accélérer le programme d'amélioration génétique de blé.

## Le milieu de culture

L'androgénèse *in vitro* est divisée en trois étapes principales: 1) formation d'embryons, 2) régénération des plantules et 3) développement des plantes haploïdes chlorophylliennes. Dans chacune de ces étapes, la composition du milieu de culture est primordiale pour obtenir un rendement acceptable de plantes haploïdes et haploïdes doublés. Les recherches dans ce contexte sont très variées, chaque auteur travaille avec une composition différente de l'autre en essayant des nouveaux éléments et des nouvelles concentrations.

En discutant la culture des anthères du blé, et selon Henry et de Buyser (1990), le milieu N6 développé par Chu et al. (1975) est le milieu synthétique basal le plus efficace pour les céréales, surtout le blé, dont la concentration en azote est faible et la concentration en phosphore est élevée comparé avec le milieu MS (Murashige and Skoog, 1962). Ils ont aussi proposé de réduire plus la concentration en azote pour augmenter l'induction de pollen en embryon. L'addition de la glutamine améliore aussi l'embryogenèse ainsi que l'addition de  $10^{-4}$ M de Fe-EDTA. En outre, Ils ont confirmé que le sucrose était le sucre le plus efficace pour la culture des anthères du blé, avec une concentration optimale de 9% dans le milieu d'induction et de 2% dans le milieu de régénération des plantes. En plus, ils ont ajouté que le sucrose de contenant moins d'impuretés interagis plus avec le 2,4-D donnant des plantules de bonne qualité. Henry et De Buyser (1990) ont trouvé que le milieu avec 10 à 20% d'extrait de pomme de terre était le mieux utilisé pour la culture des anthères des céréales. Pour les hormones de croissance, ces auteurs ont noté que le 2,4-D et la Kinétine constituaient les hormones les plus favorables à une bonne induction et qualité d'embryons. La concentration de ces hormones est respectivement de l'ordre de 1 à 3 mg/L et 0,5 à 1 mg/L alors que pour les agents gélifiants, ils ont démontré que l'agarose était le mieux adapté pour la culture des anthères par rapport à l'agar et le milieu liquide (Tableau 1).

Dans certaines études, les auteurs ont concentré leurs intérêts sur diverses composantes de milieu de culture en aboutissant au même but qui était l'amélioration du rendement en plantes haploïdes vertes. C'est le cas notamment de Hassawi et al. (2004) qui ont travaillé sur des génotypes de l'orge et du blé. Dans leur étude, ils ont principalement exploité l'effet du génotype et des hormones de croissance sur la culture des anthères. Chez le blé, ils ont testé deux milieux d'induction (Tableau 2); M1 contenant 2mg/L de 2,4-D + 1mg/L de kinétine, et M2 contenant 2mg/L de ANA + 1mg/L de kinétine. Selon ces auteurs, les deux milieux ont produit des cals, mais le milieu M1 était plus performant et a produit plus de cals et plus de plantes vertes. Ils ont ajouté que seuls les cals produits par le milieu M1 ont donné des plantes vertes et elles sont arrivées au stade mature tandis que les cals du milieu M2 n'ont pas régénéré des plantules. Leur étude confirme que les hormones de croissance utilisées pour la culture des anthères ont un effet considérable sur l'obtention des plantes haploïdes. Ghaemi et al. (1994) ont essayé 10 milieux d'induction sur les anthères du blé dur (*Triticum turgidum*). Tous les milieux utilisés étaient

à base d'extrait de pomme de terre selon Chuang et al. (1978) et modifiés par l'ajout de 0,5 g/L de glutamine ainsi que 0,4 g/L du gelrite. Alors, l'expérience était l'addition de trois éléments, le nitrate d'argent avec trois concentrations de 1; 2,5 et 5 mg/L; la colchicine à 10, 100 et 200 mg/L et le sulfate de cuivre à 2, 5 et 10 mg/L. Ghaemi et al. (1994) ont trouvé que la présence de 2,5 et 5 mg/L de nitrate d'argent et de 10 mg/L de sulfate de cuivre augmente la formation des embryons pour 3 génotypes sur 4. En revanche, la colchicine diminue significativement l'embryogenèse dans 3 génotypes sur 4.

**Tableau 1: Composants du milieu d'extrait de pomme de terre II (P), du milieu de régénération (MSR) et le milieu de croissance (GM) (Henry et De Buyser, 1990)**

Composition	P (mg.l <sup>-1</sup> )	MSR (mg.l <sup>-1</sup> )	GM (mg.l <sup>-1</sup> )
KNO <sub>3</sub>	1000	950	1000
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	100	-	500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200	85	300
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100	185	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	825	1000
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	-	220	-
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	125	-	71,5
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27,8	13,9	13,9
Na <sub>2</sub> . EDTA	37,3	18,6	18,6
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	-	22,3	4,9
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	-	8,6	2,7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	-	6,2	1,6
KI	-	0,83	0,75
KCl	35	-	65
Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	-	0,25	-
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	-	0,025	0,025
Glycine	-	2	20
Glutamine	500-1000	-	-
Thiamine-HCl	1	0,1	1
Pyridoxine-HCl	-	0,5	5
Acide Nicotinique	-	0,5	5
Myo-Inositol	-	100	100
2,4-D	1,5	-	-
NAA	-	0,5	-
IAA	-	-	1
Kinétine	0,5	0,5	-
Sucrose	90000	20000	20000
Extrait de pomme de terre	70-100	-	-
Agarose	6000	6000	-
Gelrite	-	-	3000
Agar	-	-	3000
pH	5,8	5,8	5,8

**Tableau 2: Composition du milieu d'induction (Hassawi et al., 2004)**

Composition	Concentration (mg.l <sup>-1</sup> )
KNO <sub>3</sub>	1400
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	150
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	150
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	300
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27,8
Na <sub>2</sub> . EDTA	37,3
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	11,2
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
KI (Iodure de Potassium)	0,83
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,025
Glycine	2,0
Thiamine-HCl	1,0
Pyridoxine-HCl	0,5
Acide Nicotinique	0,5
Biotine	1,5
2,4-D ou NAA	2,0
Kinétine	1,0
Sucrose	90000
Difco agar	6000
pH	5,8-6,0

Une étude très intéressante a été réalisée par Navarro-Alvarez et al., (1994) sur l'effet du sucre sur la culture des anthères du blé tendre. Les anthères du blé tendre de trois génotypes différents ont été mises en culture dans des milieux d'inductions avec sept types de sucres (galactose, mannose, maltose, fructose, sucrose, glucose et maltose + glucose) dont la concentration était 0,26 M. Le milieu de culture a été aussi supplémenté par l'amidon du blé (5%) comme une source potentielle en sucre et comme agent gélifiant. 2,4-D (2 mg/L), ANA (1 mg/L), et glutamine (254 mg/L) ont été aussi ajoutés. Ils ont trouvé dans 42 répétitions des 3 génotypes que le maltose était le meilleur sucre (105 embryons /100 anthères) suivi de glucose (47 embryons /100 anthères) et maltose + glucose (37 embryons /100 anthères) alors que sucrose (24 embryons /100 anthères) et le fructose (12 embryons /100 anthères) ont été moins efficaces.

Lashermes et al. (1992) ont amélioré la composition du milieu d'induction (Tableau 3) en utilisant le milieu MS modifié (Lashermes et al., 1991). Ils ont supplémenté ce milieu avec l'amidon de l'orge, le maltose et le nitrate d'argent dans la première expérience et ont joué sur la solidification du milieu en utilisant l'agarose ou polyester et

Ficoll. Dans la deuxième expérience, ils ont ajouté 5 mg/L de nitrate d'argent et 10 mg/L du charbon dans les milieux d'induction et de développement. D'après Lashermes *et al.* (1992), l'amidon de l'orge a affecté l'induction et la régénération particulièrement dans le milieu contenant l'agarose. Le polyester n'a pas amélioré les résultats et le Ficoll, au contraire a donné un rendement plus faible. Ces auteurs ont remarqué que l'amidon de l'orge augmente le nombre de plantes régénérées directement dans les milieux d'induction sans passer par le milieu de régénération. La supplémentation du milieu d'induction par le nitrate d'argent et le charbon affecte aussi l'embryogenèse. Et comme dans le cas d'amidon de l'orge, ils ont noté que la présence du nitrate d'argent et du charbon multiplie la régénération des plantes directement dans le milieu d'induction par 2 à 5 fois.

**Tableau 3: Milieu d'induction utilisé pour la culture d'anthère (Lashermes *et al.*, 1992).**

Composition	Concentration (mg.l <sup>-1</sup> )
KNO <sub>3</sub>	1900
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	370
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27,9
Na <sub>2</sub> . EDTA	37,3
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
KI (Iodure de potassium)	0,83
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,025
AgNO <sub>3</sub>	10,0
Glutamine	750
Hydrolysate de Caséine	250
Pyridoxine-HCl	0,4
Acide Nicotinique	0,4
Biotine	0,4
Ascorbic acid	0,4
Myo-inositol	100
Sucrose	85500
Agarose	6000
pH	5,8

Un simple protocole a été utilisé par Broughton *et al.* (2008) qui ont inclus des ovaires dans le milieu d'induction. Ils ont trouvé que 5 ovaires inclus dans le milieu d'induction améliore significativement le nombre d'embryons produits et le nombre de plantes vertes et albinos. Ils ont aussi comparé l'effet de la combinaison des hormones de croissance 2,4 D avec Kinétine et AIA avec BA. Ils alors pas trouvé de différence significative pour le nombre d'embryons produits et moins de plantes vertes avec la combinaison AIA – BA. De même, Zheng *et al.* (2002) ont inclus des ovaires dans cultures des microspores de blé. Et selon leurs résultats, les ovaires ont amélioré le rendement en embryons alors

que ce n'était pas le cas des génotypes récalcitrants. Asif *et al.* (2014) ont travaillé sur la culture des microspores de blé et des Triticales. Ils ont supplémenté le milieu d'induction par des concentrations différentes en mannitol. Ils ont trouvé que l'ajout du mannitol dans le milieu d'induction a un effet sur l'embryogenèse et la production des plantes vertes et que la concentration 9 g/L de mannitol donne les meilleurs résultats. Grauda *et al.* (2010 et 2014) ont rapporté que l'utilisation du milieu d'induction AMC, en ajoutant le cuivre, donne des résultats favorables due au rôle du cuivre dans synthèse chlorophyllienne et donc son effet sur la réduction des plantes albinos et la production élevée des plantes vertes.

Immonen et Robinson (2000) ont testé l'effet de la composition du milieu avec l'effet de conditions de croissance et de pré-traitement. Ils ont étudié dix variétés de triticales de différentes origines. Les conditions de croissance des plantes mères, dont les graines de triticales, ont été semées en serre et dans le champ. Différents pré-traitements ont été aussi appliqués sur les épis récoltés dont la combinaison du pré-traitement au froid avec choc thermique ou stress au mannitol et pré-traitement au froid prolongé. En plus, différents milieux d'induction et de régénération ont été testés, tous les milieux réalisés étaient liquides et supplémentés avec 100 g/L de Ficoll. L'effet des conditions de croissance des plantes mères varie selon les variétés et les pré-traitements. Le pré-traitement au froid suivi de la chaleur augmente la réponse androgénétique. Le prolongement au froid augmente le rendement en plantes vertes et le doublement spontané. Le remplacement du milieu solide par un milieu liquide supplémenté du Ficoll améliore l'induction chez certaines variétés et l'effet du mannitol dépend des variétés. Selon les résultats d'Immonen et Robinson (2000), les différents pré-traitements appliqués et accompagnés du milieu liquide/Ficoll donnent une réponse différentielle et améliorent significativement la culture des anthères des triticales.

Shirdelmoghanloo *et al.*, (2009) ont également exploité différents traitements et différents milieux d'induction et de régénération des plantes. En appliquant des pré-traitements froids avec mannitol et une combinaison de pré-traitement froid, mannitol et chaleur, ils ont trouvé que le premier pré-traitement donne des résultats plus importants. Ainsi, les milieux C17, NPB-99 et W14 produisent plusieurs embryons par épis tandis que le milieu CHB-2 régénère plus de plantes vertes.

Des initiatives réalisées pour améliorer la culture des anthères étaient d'ajouter des éléments minéraux dans les milieux de cultures. Kang *et al.* (2011) ont testé un nouvel élément REE (rare earth elements) ou éléments terrestres rares afin d'améliorer la productivité en plantes vertes d'une variété nommée 'Huapei 8' et ces éléments ont été ajoutés dans le milieu de différenciation. Ils ont montré que l'utilisation de 1,5 mg/L de REE augmente le pourcentage de la régénération des plantes vertes de 13,7% à 27,5%. Sur l'orge (*Hordeum vulgare* L.) Echavarri *et al.* (2008) ont étudié la réaction des microspores aux différentes concentrations de ZnSO<sub>4</sub>. L'addition du ZnSO<sub>4</sub> à une concentration 90-300 µM dans le milieu d'induction a amélioré le rendement en embryons et en plantes de 40 à 53%.



## Traitement par colchicine

Contrairement à l'orge, les plantes de blé régénérées de la culture des anthères sont stériles. Elles ne donnent pas ou rarement des plantes diploïdes de façon spontanée. Les plantes homozygotes fertiles et stables peuvent être produites par doublement chromosomique. Il existe trois techniques pour le doublement chromosomique par colchicine. Ces trois méthodes ont été décrites par Henry et De Buyser (1990). La première était de traiter les embryons avant de les transférer dans le milieu de régénération par la solution de colchicine (0,01% à 0,04%) pour une durée de 72 h (Zhuang et Jia, 1980). La deuxième était de traiter les petites plantules dans les conditions aseptiques avec la solution de colchicine (0,25%) pendant 3h. Selon Henry et De Buyser (1980), cette méthode ne donne pas des résultats satisfaisants. La troisième technique était de traiter les plantules au stade 3 feuilles mises dans les pots avant leur vernalisation. Dans ce dernier cas, les racines sont rincées et coupées pour réduire leurs tailles. Ensuite, on les traite avec une solution construite de (0,5-1% de colchicine, 1,5% de DMSO) pendant 5 h. 70 à 90% de plantes doublent leurs chromosomes.

Une étude importante a été réalisée par Soriano et al. (2007) sur l'utilisation de la colchicine dans les premières étapes de la culture des anthères et des microspores de blé. Ils ont ajouté la colchicine dans la solution de pré-traitement des épis avec le mannitol. Ils ont aussi appliqué la colchicine dans le milieu d'induction pendant les premières 48 h de la culture. Ils ont noté qu'une concentration de 300 mg/L de la colchicine était la meilleure et elle a significativement augmenté le nombre des plantes haploïdes doublées. Dans une autre étude, Soriano et al. (2008) a rapporté que l'addition de n-butanol dans le milieu d'induction, améliore à la fois la production d'embryon et la production des haploïdes doublés.

## CONCLUSION

La production des haploïdes doublés a une importance considérable dans l'amélioration génétique du blé. L'obtention des lignées homozygotes en une seule étape permet un gain de temps appréciable pour la sélection et le développement de nouvelles variétés.

Les différentes publications discutées dans cette revue seront d'une grande utilité dans l'amélioration du protocole pratiqué au laboratoire de biotechnologie. En jouant sur les facteurs affectant le rendement en plantes haploïdes et haploïdes doublés, comme le pré-traitement, les milieux de culture et le traitement par la colchicine on pourra découvrir le protocole le mieux adapté à nos génotypes, afin de réduire le nombre des plantes albinos et augmenter le nombre de plantes haploïdes doublées.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agache S., Bachelier B., de Buyser J., Henry Y., Snape J. (1989). Genetic analysis of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines. *Theor. Appl. Genet.* 77: 7-11.
- Andersen S.B., Due I.K., Olesen A. (1987). The response of anther culture in a genetically wide material of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Breed.* 99: 181-186.
- Asif M., Eudes F., Randhawa H., Amundsen E., Spaner D. (2014). Induction medium osmolality improves microspore embryogenesis in wheat and triticale. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 50: 121-126.
- Ayed O.S., De Buyser J., Picard E., Trifa Y., Amara H.S. (2010). Effect of pre-treatment on isolated microspores culture ability in durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum* Desf.). *J. Plant Breed. Crop Sci.* 2: 30-38.
- Bentolila S., Hardy T., Guitton C., Freyssient G. (1992). Comparative genetic analysis of F2 plants and anther culture derived plants of maize. *Genome* 35: 575-582.
- Broughton S. (2008). Ovary co-culture improves embryo and green plant production in anther culture of Australian spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 95: 185-195.
- Broughton S. (2011). The application of n-butanol improves embryo and green plant production in anther culture of Australian wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Crop Pasture Sci.* 62: 813-822.
- Chu C.C., Wang C.C., Sun C.S., Hsu C., Yin K.C., Chu C.Y., Bi F.Y. (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 18: 659-668.
- Chuang C.C., Ouyang J., Chia H., Chou S.M. et Ching C.K. (1978). A set of potato media for wheat anther culture. In: Proc China-Australia Plant tissue culture Symp, Peking, 51-66.
- De Buyser J., Henry Y., Lonnet P., Hertzog R., Hespel A. (1987). Florin; A doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method. *Plant Breed.* 98: 53-56.
- El-Hennawy M.A., Abdalla A.F., Shafey S.A., Al-Ashkar I.M. (2011). Production of doubled haploid wheat lines (*Triticum aestivum* L.) using anther culture technique. *Ann. Agric. Sci.* 2: 63-72.
- Echavarrri B., Soriano M., Cistué L., Vallés M.P., Castillo A.M. (2008). Zinc sulphate improved microspore embryogenesis in barley. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 93: 295-301.
- Foroughi-Wehr B., Zeller F.J. (1990). In vitro microspore reaction of different German wheat varieties. *Theor. Appl. Genet.* 79: 77-80.
- Ghaemi M., Sarrafi A., Alibert G. (1994). The effects of silver nitrate, colchicine, cupric sulfate and genotype on the production of embryoids from anthers of tetraploid wheat (*Triticum turgidum*). *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 36: 355-359.
- Grauda D., Lepse N., Strazdiņa V., Kokina I., Lapīņa L., Miķelsone A., Ļubinskis L., Rashal I. (2010). Obtaining of doubled haploid lines by anther culture method for the Latvian wheat breeding. *Agronomy Research* 8: 545-552.

- Grauda D., Miélsone A., Īisina N., Pagata K., Ornicāns R., Fokina O., Lapiņa L., Rashal I., (2014). Anther culture effectiveness in producing doubled Haploids of cereals. *Proc. Latv. Acad. Sci.* 68: 142–147.
- Haggag M.E., El-Hennawy M.A. (1996). Anther culture of Egyptian wheat varieties. *Annals. Agric. Sci.* 41: 739–759.
- Hassawi D.S. (2004). Evaluation of Jordanian wheat and barley genotypes for anther culture response. *Food Agric. Environ.* 2: 193-197.
- Henry Y., De Buyser J. (1980). Androgénese sur des blés tendres en cours de sélection. 2. L'obtention des grains. *Z. Pflanzenzuchtg* 84: 9-17.
- Henry Y., De Buyser J. (1985). Effect of 1B/1R translocation on anther culture ability in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports* 4: 307-310.
- Henry Y., De Buyser J. (1990). Wheat anther culture: agronomic performance of doubled haploid lines and the release of a new variety "Florin". In: Bajaj Y.P.S., ed. *Biotechnology in agriculture and forestry, wheat*. Springer, Berlin Heidelberg, New York, 13: 285–352.
- Hu D., Tang Y., Yuan Z., Wang J. (1983). The induction of pollen sporophytes of winter wheat and the development of the new variety Jinghua No1. *Sci. Agric. Sin.* 1: 29–35.
- Hu T., Kasha K.J. (1999). A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. *Genome* 42: 432- 441.
- Hu T.C., Ziauddin A., Simion E., Kasha K.J. (1995). Isolated microspore culture of wheat *Triticum aestivum* L. in a defined media. I. Effects of pretreatment, isolation methods and hormones. *In Vitro Cell Dev. Bio.* 31: 79-83.
- Hu Y., Bao R.R., Xue X.Y. (1988). The new strain '764' of spring wheat by pollen haploid technique from anther culture Genet. *Manip Crops Newslett*, 4: 70–85
- Hunter C.P. (1988). Plant regeneration from microspores of barley, *Hordeum vulgare*. Ph D thesis. Wye College, University of London (United Kingdom).
- Immonen S., Robinson J. (2000). Stress treatments and ficoll for improving green plant regeneration in triticale anther culture. *Plant Sci.* 150: 77 – 84.
- Kang M.H., Hai Y., Huang B.Y., Zhao Y.Y., Wang S.J., Miao L.J., Zhang X.Y. (2011). Breeding of newly licensed wheat variety Huapei 8 and improved breeding strategy by anther culture. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 19701-19706.
- Karimzadeh G., Kovács G., Barnabás B. (1995). Effects of cold treatment and different culture media on the androgenic capacity of two winter wheat genotypes. *Cereal Res. Commun.* 23: 223-227.
- Labhani Z., De Buyser J., Picard E. (2007). Effect of mannitol pretreatment to improve green plant regeneration on isolated microspore culture in *Triticum turgidum* ssp. *durum* cv. *Plant Breed.* 126: 565–568.
- Lantos C., Weyen J., Gnad H., Schlieter B., Lein V., Kontovski S., Jacobi A., Mihaly R., Broughton S., Pauk J. (2013). Efficient application of in vitro anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes. *Plant Breed.* 132: 149–154.
- Lashermes P., Engin G., Ortiz-Ferrara G. (1991). Anther culture of wheat (*Triticum aestivum*) adapted to dry areas of West Asia and North Africa. *J. Genet. et Breed.* 45: 33-38.
- Lashermes P. (1992). Improved anther culture method for obtaining direct regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Genet. et Breed.* 46: 99-102.
- Lazar M.D., Schaeffer G.W., Baenziger P.S. (1984). Variété and variété x environment effects on the development of callus and polyhaploid plants from anther cultures of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 67: 273-277.
- Lazaridou T.B., Lithourgidis A.S., Kotzamanidis S.T., Roupakias D.G. (2005). Anther culture response of barley genotypes to cold pretreatments and culture media. *Russ. J. Plant Physiol.* 52: 696–699.
- Liu W., Zheng M.Y., Polle E.A., Konzak C.F. (2001). Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. *Crop Sci.* 42: 686-692.
- Liu W., Zheng M.Y., Konzak C.F. (2002). Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep.* 20: 821–824.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Navarro-Alvarez W., Baenziger P.S., Eskridge K.M., Shelton D.R., Gustafson V.D., Hugo M. (1994). Effect of Sugars in Wheat Anther Culture Media. *Plant breed.* 112: 53-62.
- Orshinsky B.R., Sadasivaiah R.S. (1997). Effect of plant growth conditions, planting density, and genotype on anther culture response of soft white spring wheat hybrids. *Plant Cell Rep.* 16: 758–762.
- Ouyang T.W., Hu H., Chuang C.C., Tseng C.C. (1973). Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured in vitro. *Sci. Sinica* 16: 79-95.
- Ouyang J.W. (1986). Induction of pollen plants in *Triticum aestivum*. In: H. Hu, Y. Yang, ed, *Haploids of higher plants in vitro*, Springer-Verlag, New York, p. 26–41.
- Pauk J., Kertesz Z., Beke B., Bona L., Csosz M., Matuz J. (1995). New winter wheat variety: 'GK Delibab' developed via combining conventional breeding and in vitro androgenesis. *Cereal Res. Commun.* 23: 251–256.
- Pershina L.A., Osadchaya T.S., Badaeva E.D., Belan I.A., Rosseeva L.P. (2013). Androgenesis in anther cultures of cultivars and a promising form of spring common wheat of West Siberia differing in the presence or absence of wheat-alien translocations. *Russ. J. Genet.: App. Res.* 3: 246-253.
- Picard E., De Buyser J. (1977). High production of embryoids in anther culture of pollen derived homozygous spring wheats. *Ann. Amélior. Plantes* 27: 483–488.
- Redha A., Suleman P. (2013). Assessment of Polyamines and Trehalose in Wheat Microspores Culture for Embryogenesis and Green Regenerated Plants. *Am. J. Plant Sci.* 4: 2218-2226.
- Shirdelmoghanloo H., Moieni A., Mousavi A. (2009). Effects of embryo induction media and pretreatments in isolated microspore culture of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Falat). *Afr. J. Biotechnol.* 8: 6134-6140.



- Sibikeeva Y.E., Sibikeev S.N. (1996). Genetic analysis of anther culture response in wheat carrying alien translocations. *Theor. Appl. Genet.* 92: 782-785.
- Sibikeeva Y.E., Sibikeev S.N., Krupnov V.A. (2004). The effect of Lr19-translocation on in vitro androgenesis and inheritance of leaf-rust resistance in DH3 lines and F2 hybrids of common wheat. *Russ. J. Genet.* 40: 1003-1006.
- Soriano M., Cistué L., Vallés M.P., Castillo A.M. (2007). Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 91: 225-234.
- Soriano M., Cistué L., Castillo A.M. (2008). Enhanced induction of microspore embryogenesis after n-butanol treatment in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Plant Cell. Rep.* 27: 805–811.
- Zhao L., Liu L., Wang J., Guo H., Gu J., Zhao S., Li J., Xie Y. (2015). Development of a new wheat germplasm with high anther culture ability by using a combination of gamma-ray irradiation and anther culture. *J. Sci. Food Agric.* 95: 120–125.
- Zheng M.Y., Weng Y., Liu W., Konzak C.F. (2002). The effect of ovary-conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep.* 20: 802–807.
- Zhuang J.J., Jia X. (1980). Studies on the differentiation of pollen calli of wheat. *Ann. Rep. Inst. Genet. Acad. Sin.*, Beijing, p. 70-71.