

# Production d'haploïdes chez le blé dur et sélection en milieu salin

H. Chlyah<sup>1</sup>      O. Lamsaouri<sup>1</sup>      H. Benkirane<sup>1</sup>  
S. Cherkaoui<sup>1</sup>      M. Mdarhri-Alaoui<sup>1</sup>      O. Amail<sup>1</sup>  
N. Saïdi<sup>1</sup>      O. Chlyah<sup>1</sup>      A. B. Chlyah<sup>1</sup>

## Introduction

Le blé dur, espèce de grande consommation dans le pourtour méditerranéen, n'a pas encore fait l'objet d'amélioration décisive en vue d'augmenter ses capacités de tolérance, particulièrement à la salinité et à la sécheresse. Pourtant, ces deux types de stress sont caractéristiques, voire en augmentation dans cette région.

Les travaux qui pourraient conduire au transfert de gènes à cette espèce ne font que commencer (Korzun *et al.*, 1999). Cependant, la création de lignées homozygotes par l'utilisation des haplométhodes, qui ont déjà contribué à améliorer des espèces comme le riz (Hu *et al.*, 1986) pourrait constituer une méthode efficace chez le blé dur.

En ce qui concerne la culture d'anthères *in vitro* (androgenèse), le blé dur est une plante récalcitrante car les plantes haploïdes obtenues par cette méthode sont souvent albines (Chlyah et Saïdi, 1991 ; Saïdi *et al.*, 1997 ; Cherkaoui *et al.*, 1997). Pour surmonter cet obstacle de l'albinisme, notre laboratoire essaie, depuis plusieurs années, de mettre au point diverses

---

<sup>1</sup> Département de biologie, faculté des Sciences, BP 1014, Rabat, Maroc.

autres haplométhodes dont certaines nous ont permis d'obtenir 100 % de plantes haploïdes chlorophylliennes (Saïdi *et al.*, 1998 ; Mdarhri-Alaoui *et al.*, 1998 ; Cherkaoui *et al.*, 2000).

L'objet du travail que nous présentons ici est de faire la comparaison entre les diverses haplométhodes que nous avons étudiées. La possibilité d'exercer une pression de sélection au sel pour obtenir des plantes plus tolérantes à ce stress est également exposée.

## Matériel et méthodes

Les divers génotypes de blé dur (*Triticum turgidum* var. *durum* = *T. durum*) proviennent de graines fournies par la station Guich de l'Inra à Rabat, qui sont semées dans le jardin expérimental de la faculté des Sciences de Rabat à partir d'octobre chaque année.

### Culture d'anthères

Les épis sont prélevés lorsque les anthères contiennent des microspores au stade uninucléé, vacuolisées. Les épis coupés subissent un prétraitement au froid (5 °C) pour 0, 2, 4-6, 8 et 15 jours avant la mise en culture des anthères.

Plusieurs milieux solides et liquides ont été testés (Saïdi *et al.*, 1997 ; Cherkaoui *et al.*, 1997).

Les embryons androgénétiques qui apparaissent en dehors de l'anthère après environ 3-4 semaines à l'obscurité à 27 °C, sont repiqués sur un milieu R9 (Picard et Debuyser, 1977) additionné de substances organiques et hormonales et maintenus à une photopériode de 16 h à 25 °C.

### Culture d'anthères après croisement blé tendre x blé dur

Les techniques de croisement sont décrites dans l'article de Cherkaoui *et al.*, dans ce même volume. La culture des anthères est décrite ci-dessus.

## *Culture d'ovaires non fécondés (gynogénèse)*

Au moment du prélèvement des épis, les microspores sont au stade bicellulaire. Les épis subissent un prétraitement au froid (5 °C) de 0, 5, 10, 15 ou 20 jours. Divers milieux de culture solides sont utilisés (Mdarhri-Alaoui *et al.*, 1998 ; Mdarhri-Alaoui, 2000) et l'interaction entre l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4-D) et le saccharose est étudiée au cours de la phase callogène. Trois régimes d'éclairement sont testés : obscurité continue ; obscurité pendant 4-5 semaines suivie d'un éclairement quotidien de 16 h ; un éclairement quotidien de 16 h.

## *Croisements éloignés*

Les fleurs sont castrées par l'excision des anthères quelques jours avant l'anthèse, puis pollinisées par le pollen du maïs ou d'orge (*Hordeum bulbosum*). Les procédures ont déjà été détaillées ailleurs (Saïdi *et al.*, 1998 ; Cherkaoui *et al.*, 2000). Les embryons qui se développent depuis environ 14 jours sont transférés *in vitro* sur le milieu B5 (Gamborg *et al.*, 1968) et maintenus à l'obscurité jusqu'à la germination de l'embryon, puis transférés à la lumière (16 h quotidien) pour le développement de la plante.

## *Contrôle de l'haploïdie et doublement chromosomique*

Pour vérifier la ploïdie des plantes chlorophylliennes régénérées, des méristèmes racinaires sont mis dans une solution saturée d' $\alpha$ -bromonaphtalène pendant 16 h à 5 °C, puis, après hydrolyse acide (HCl N pendant 45 mn à 60 °C), ils sont colorés par le réactif de Schiff (2 h) avant rinçage et observation microscopique.

## *Application d'une pression de sélection (NaCl)*

Les embryons obtenus après croisement blé dur x maïs sont placés sur le milieu B5 soit sans NaCl soit avec du NaCl à 2,5, 5 ou 10 g.l<sup>-1</sup>. Après germination, les plantules sont transférées sur un milieu identique mais sans sel pour la régénération.

## I Résultats et discussion

Pour chaque haplométhode, nous exposerons les résultats comparatifs concernant les structures morphogénétiques initiales obtenues, les conditions optimales pour leur formation ainsi que pour la régénération des plantes. Nous souhaitons repérer les génotypes de blé dur pour lesquels au moins une haplométhode permet de réaliser l'homozygotie. Une pression de sélection pour tolérer le sel (NaCl) sera ensuite appliquée à l'haplométhode qui permet d'obtenir le plus grand nombre de plantes haploïdes chlorophylliennes.

### *Structures morphogénétiques obtenues*

#### **En androgenèse**

Que ce soit pour les génotypes parentaux ou pour les descendants du croisement blé tendre x blé dur, la morphogenèse observée aux stades initiaux est la même.

Les structures androgénétiques issues des divisions des microspores, formées au niveau des loges polliniques, peuvent être de type embryon ou de type cal ; parfois ces deux structures peuvent être observées sur une même anthère. Seules les formations embryonnaires nous intéressent puisque nous n'avons pas obtenu de régénération à partir de cals.

Les embryons ont une forme ovoïde qui rappelle celle des embryons zygotiques. Ils ont une surface lisse et sont de couleur blanche-jaunâtre (fig. 1 a). Ils peuvent être individuels ou groupés en amas dans une anthère.

#### **En gynogenèse**

Les ovaires qui réagissent *in vitro* augmentent de taille. Après environ cinq semaines, un cal apparaît au niveau d'une ouverture dans la partie basale de l'ovaire (fig. 1 b). Au cours des quatre semaines qui suivent leur apparition, les cals blanchâtres et relativement compacts continuent à croître en se détachant progressivement de la paroi ovarienne. Ces cals sont ensuite repiqués sur un milieu de régénération où ils continuent leur croissance (fig. 1 c). Certains

forment très vite des bourgeons chlorophylliens (fig. 1 d) individuels ou groupés en touffes ; dans ce dernier cas, leur développement s'arrête rapidement. Une formation directe d'un embryon au niveau de l'ovaire cultivé a été observée de façon rare et sporadique.

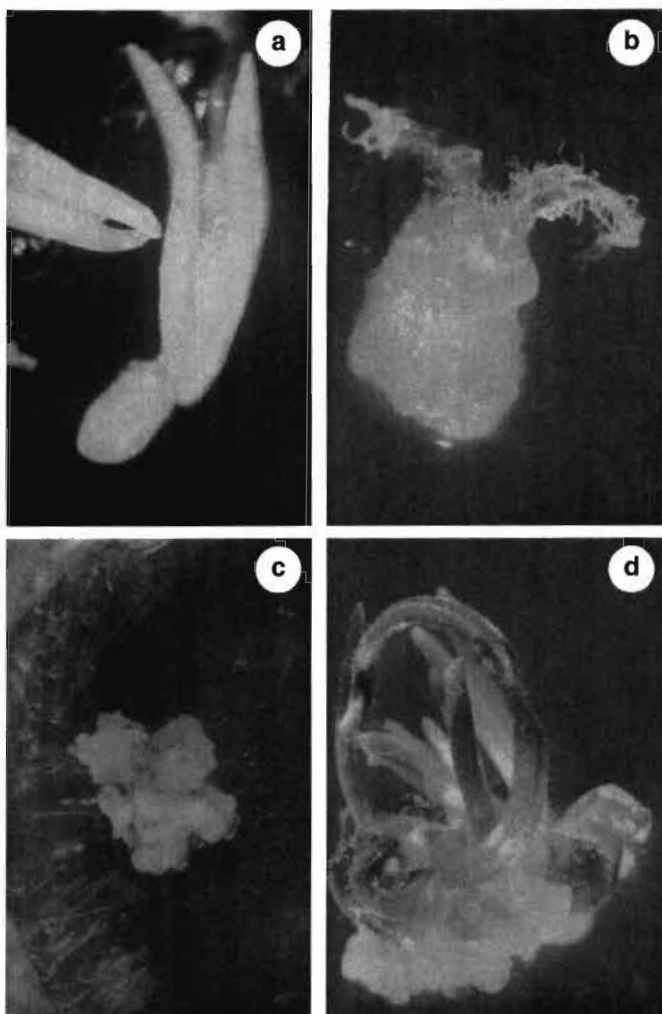


Figure 1

Structures morphogénétiques obtenues en androgenèse et gynogenèse :

a) embryon androgénétique sortant des loges de l'anthere après 1 mois de culture ;

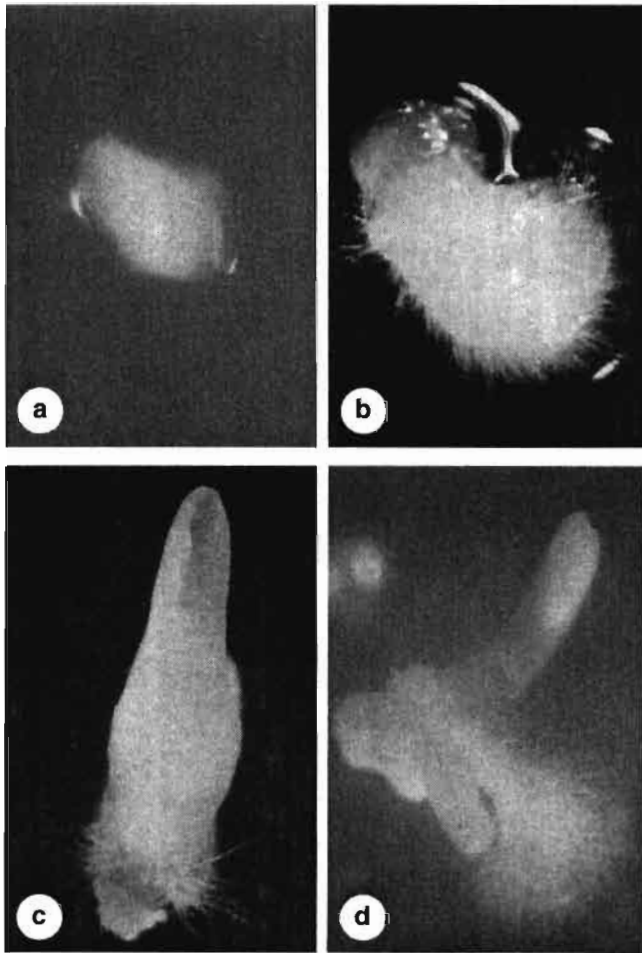
b) cal gynogénétique sortant de la base de l'ovaire après 5 semaines de culture ;

c) cal gynogénétique transféré sur un milieu de régénération ;

d) bourgeons chlorophylliens formés à partir du cal gynogénétique.

## En croisements intergénériques

Provenant du croisement blé dur x maïs ou du blé dur x orge, l'embryon haploïde, qui se développe au sein de l'ovaire, a le même aspect : il ressemble à un embryon diploïde normal mais généralement de taille plus réduite. Environ 14 jours après la pollinisation, l'embryon, encore peu différencié, est excisé et cultivé *in vitro* (fig. 2 a). En général, la germination (apparition d'une racine couverte de poils absorbants (fig. 2 b) puis la croissance du coléoptile (fig. 2 c) sont suivies, après transfert à la lumière, par la formation des premières feuilles chlorophylliennes (fig. 2 d).



**Figure 2**  
 Développement  
 d'un embryon formé  
 à la suite d'un croisement  
 blé dur x maïs :  
 a) embryon haploïde  
 formé à la suite  
 d'un croisement  
 blé dur x maïs  
 14 j après pollinisation ;  
 b) germination  
 de l'embryon à l'obscurité ;  
 c) croissance du coléoptile ;  
 d) jeune plantule haploïde.

## Conditions d'obtention des structures morphogénétiques

Plusieurs facteurs interviennent dans la réussite de chaque haplométhode. Une brève comparaison est faite entre les facteurs les plus significatifs.

### Milieux de culture

#### Androgenèse

Pour l'induction d'embryons par androgenèse (culture d'anthers) en milieu solide (Saïdi *et al.*, 1997), le milieu C<sub>17</sub> (Wang et Chen, 1986) a donné des résultats significativement meilleurs que le milieu N<sub>6</sub> (Chu *et al.*, 1975) et deux autres milieux contenant un extrait de pomme de terre : BPTG (De Buyser et Henry, 1980) et P<sub>2</sub> (Chuang *et al.*, 1978). Dans cette expérience (Saïdi *et al.*, 1997), avec C<sub>17</sub>, 3 à 25 % d'embryons étaient obtenus selon le génotype du blé dur. Un essai préliminaire avec le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962), plus riche, a donné un taux d'induction très faible.

Le saccharose à 9 % et le 2,4-D à 2 mg.l<sup>-1</sup> constituent les facteurs optimaux.

Pour la régénération, la concentration en saccharose a été réduite à 2 % et le 2,4-D est remplacé par l'AIA à 0,5 mg.l<sup>-1</sup> en présence d'une cytokinine (0,5 à 1 mg.l<sup>-1</sup>). L'addition de composés aminés et de l'acide gibbéréllique était favorable mais non indispensables pour la régénération (essentiellement des plantes albinos). La régénération exceptionnelle de plantes chlorophylliennes n'a pas pu être maîtrisée par l'addition d'une quelconque composante du milieu.

D'autres essais en milieu liquide (Cherkaoui *et al.*, 1997) ont montré des pourcentages d'embryons relativement faibles (1,1 à 3,1 %) par rapport à ceux obtenus en milieu solide. Cependant, avec l'emploi d'un milieu BAC 1 (Trottier *et al.*, 1993) en présence d'amidon et plusieurs composés aminés, la régénération totale a atteint un taux de 30 %. Malgré l'obtention de quelques plantes chlorophylliennes, cette régénération chlorophyllienne n'a pas été maîtrisée.

#### Gynogenèse

Les milieux d'androgenèse (C<sub>17</sub>, P<sub>2</sub>, N<sub>6</sub>) utilisés pour la culture d'ovaires ont donné des taux d'induction de cals très faibles

(Mdarhri-Alaoui, 2000). En revanche, les milieux basés sur MS ont donné des taux de 6 à 15 %. Comme pour l'androgénèse, un taux élevé de saccharose (9-12 %) et la présence d'une auxine (par exemple le 2, 4-D : 2-5 mg.l<sup>-1</sup>) sont des conditions optimales requises. Une interaction entre ces deux facteurs (saccharose et 2, 4-D) a été démontrée (tabl. 1) pour l'ensemble des génotypes testés.

Génotypes	Concentration 2,4-D (mg.l <sup>-1</sup> )	Concentration saccharose (g.l <sup>-1</sup> )			
		45	60	90	120
Anwar	2	0	0	0	10,3
	3,5	0	3	4,1	11,1
	5	0	4,7	7,8	14,1
Jawhar	2	0	1,1	1,3	3,8
	3,5	0	3,4	4,3	6,7
	5	0	4,6	8	13,2
Yasmine	2	0	0	0	3,8
	3,5	0	0	0	2,4
	5	0	0	3,5	9,6
Benbachir	2	0	1,9	0	2,2
	3,5	0	0	0	5,2
	5	0	9,3	6,4	7,1
Acsad	2	0	0	0	5,1
	3,5	0	2,1	2	9,9
	5	0	22,4	2,1	0
Sebou	2	0	0	0	0
	3,5	0	0	2,3	0
	5	0	0	0	0
Jori	2	0	0	0	25,8
	3,5	0	0	0	12,5
	5	0	0	0	4,9
Kyperounda	2	0	0	0	4,7
	3,5	0	0	0	4,7
	5	0	17,7	8,3	7,1
Tassaout	2	0	18,5	0	13
	3,5	0	2,2	2,1	7,7
	5	0	0	0	5,5

Tableau I

Action des combinaisons 2,4-D/saccharose sur le pourcentage de cals gynogénétiques de neuf génotypes de blé dur.

Après transfert des cals sur un milieu de régénération contenant du saccharose à 2 %, les meilleurs résultats de régénération de bourgeons chlorophylliens sont obtenus avec l'addition d'AIA à 1 mg.l<sup>-1</sup>



et de BAP à 1 mg.l<sup>-1</sup>. Ce milieu qui permet l'initiation de bourgeons chlorophylliens est assez proche de celui employé en androgenèse pour la régénération de plantules à partir d'embryons.

#### *Croisements intergénériques*

La pollinisation intervient *in vivo*, donc sans milieu de culture, mais un traitement au 2,4-D est indispensable au développement embryonnaire.

Le facteur milieu intervient lors du sauvetage par culture *in vitro* de l'embryon formé naturellement *in vivo* et âgé de 12-14 jours. Trois milieux de base ont été testés (Cherkaoui *et al.*, 2000) : MS, MS/2 et B5 (Gamborg *et al.*, 1968) additionnés dans chaque cas d'AIA (1 mg.l<sup>-1</sup>), de kinétine (1 mg.l<sup>-1</sup>) et du saccharose (2 %) ; les deux derniers donnent de meilleurs résultats.

### **Facteurs physiologiques en haplométhode**

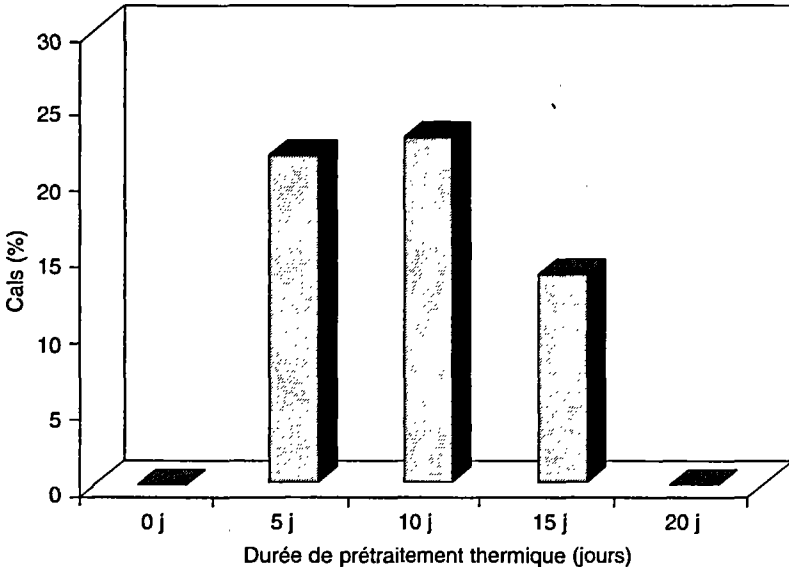
L'expérimentation a montré que la réussite de l'haplométhode dépend de facteurs physiologiques, particulièrement ceux dus à l'environnement. Nous traitons ici les facteurs thermique et d'éclairement.

#### *Choc thermique (prétraitement au froid)*

Un prétraitement au froid, bénéfique pour l'androgenèse chez de nombreuses espèces (Malhotra et Maheshwari, 1997 ; Genovesi et Magill, 1979 ; Huang et Sunderland., 1982) s'est révélé également favorable pour le blé dur (Chlyah et Saïdi, 1991 ; Saïdi *et al.*, 1997). En absence de tout prétraitement, les embryons peuvent se former à des taux relativement bas (4,2 à 7 %) selon qu'il s'agit du milieu P<sub>2</sub> ou C<sub>17</sub>. Un prétraitement de 2 à 8 jours au froid (5 °C) améliore significativement les résultats ; on peut obtenir jusqu'à 10,8 à 13,9 % (milieux P<sub>2</sub> ou C<sub>17</sub>) pour un traitement au froid de 8 jours. Lorsque la durée atteint 15 jours, le taux d'embryons se réduit nettement.

En gynogenèse, un prétraitement au froid est parfois appliqué, mais peu d'études concernent la durée optimale du traitement (Sibi et Fakiri, 1994 ; Keller et Korzum, 1996). Dans nos expériences, les prétraitements des épis détachés pendant 0, 5, 10, 15 et 20 jours à 5 °C ont montré que non seulement le froid stimule le processus de formation des cals gynogénétiques, mais qu'il est indispensable à toute réponse positive *in vitro* (fig. 3). Les durées de 5 à 10 jours sont les

plus favorables à la fois pour l'induction des cals gynogénétiques et la régénération de plantes (Mdarhri-Alaoui *et al.*, 1998).



■ Figure 3

Variation du taux d'induction de cals gynogénétiques en fonction de la durée de prétraitement thermique à 5 °C (moyenne pour neuf génotypes).

### Éclaircissement

Pour l'androgénèse, l'incubation des anthères en culture *in vitro* se fait à l'obscurité jusqu'à la formation des embryons. C'est après leur transfert sur un milieu de régénération qu'on les place à la lumière (photopériode de 16 h/24 h) pour le développement de la plante.

La formation de cals par gynogénèse est également favorisée par une période d'obscurité au début de la culture. Cependant, si une période d'obscurité de 2 à 5 semaines est suivie par un éclaircissement quotidien de 16 h, la production de cals est nettement améliorée et la régénération de plantes est obtenue (Mdarhri-Alaoui *et al.*, 1998). Ainsi, la formation de bourgeons, à la différence des embryons androgénétiques, semble nécessiter la présence de lumière de façon plus précoce.

Lors du sauvetage des embryons après croisement intergénérique, les embryons, peu différenciés, sont maintenus à l'obscurité, condition optimale pour leur germination, puis sont placés à la lumière en photopériode de 16 h par jour.

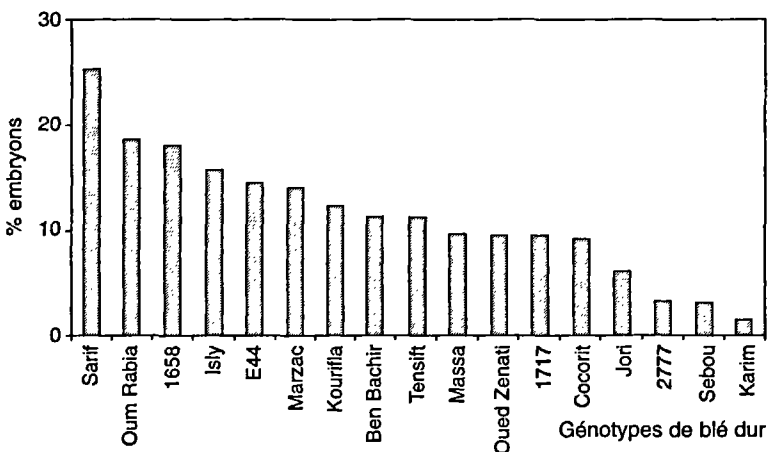
Ainsi la formation de l'embryon n'a pas les mêmes exigences que celle des bourgeons vis-à-vis de la lumière.

### Effet du génotype

L'expression morphogénétique exprimée au cours de toutes les méthodes d'haplodiploïdisation étudiées dépend du génotype.

#### *En androgenèse*

D'après l'étude de 17 génotypes de blé dur, on peut conclure sur l'importance du facteur génotype en ce qui concerne l'induction des embryons (fig. 4). D'après les résultats, cette capacité varie de 1,5 % à 25,4 %, donc aucun génotype n'a manifesté une récalcitrance totale. La régénération est également obtenue pour la grande majorité des génotypes, mais ces plantes sont, sauf cas exceptionnel, albinos (une plante chlorophyllienne obtenue pour « Marzac », deux plantes chlorophylliennes pour « Massa »). Ainsi, chez le blé dur, les embryons haploïdes issus de division de microspores sont généralement dépourvus de la capacité génétique de régénérer des plantes chlorophylliennes.



■ Figure 4

Action du génotype sur la capacité androgénétique du blé dur.

Après croisement interspécifique blé tendre x blé dur puis un à trois rétrocroisements avec le blé dur, la capacité de régénérer des plantes chlorophylliennes par androgenèse s'améliore nettement (Cherkaoui *et al.*, dans ce volume) ; ceci serait dû à l'introgression de matériel génétique du blé tendre, et, dans le cas où le parent blé tendre est le génotype « Verry's » portant la translocation 1BL/1RS, celle-ci pourrait avoir une influence favorable prépondérante.

Cependant, même lorsque le parent blé tendre ne porte pas la translocation (cas du génotype « Nesma »), une régénération régulière de plantes chlorophylliennes est observée, au moins dans la génération R<sub>1</sub>.

#### *En gynogenèse*

La capacité de gynogenèse est également très dépendante du génotype. Dans des conditions de milieu standards (MS avec 2,4-D à 2 mg.l<sup>-1</sup> en présence ou non de kinétine à 1 mg.l<sup>-1</sup>), trois génotypes sur huit ne forment aucun cal et quatre génotypes sont incapables de régénération (Mdarhri-Alaoui *et al.*, 1998). Cependant, une étude plus récente (Mdarhri-Alaoui, 2000) montre une corrélation entre le génotype, d'une part, et l'interaction 2,4-D-saccharose dans le milieu, d'autre part. En étudiant douze combinaisons de ces deux éléments portant sur la variation de leurs concentrations, l'obstacle génotype a pu être surmonté puisque tous les génotypes ont exprimé des capacités callogènes plus ou moins prononcées (tabl. 1).

#### *En croisements intergénériques*

Dans la réussite des croisements blé dur x maïs, les génotypes des deux parents sont des facteurs à effet significatif (Saïdi *et al.*, 1998). L'interaction entre les génotypes des deux espèces est également significative (Cherkaoui *et al.*, 2000). Pour un génotype donné de blé dur, des croisements avec plusieurs variétés de maïs peuvent aboutir à la formation d'embryons mais ce nombre est souvent nettement plus réduit pour la régénération de plantes chlorophylliennes (tabl. 2). Cependant, en utilisant une gamme relativement large de huit variétés de maïs, les embryons et les plantes haploïdes ont été obtenus pour tous les génotypes de blé dur testés (Cherkaoui *et al.*, 2000).

Le croisement blé dur x orge, comparé au croisement blé dur x maïs, est beaucoup plus dépendant du facteur génotype (Chlyah *et al.*, 1999). D'après les résultats obtenus (tabl. 3), les 9 génotypes de blé étudiés forment des embryons dans le cas du croisement blé dur x

maïs, mais seulement 5 génotypes sur 9 expriment cette capacité dans le cas du croisement blé dur x orge. Pour la régénération, cette tendance est encore plus marquée : tous les génotypes de blé ont régénéré des plantes dans le premier cas alors que seulement deux ont régénéré dans le second.

Génotype de maïs	Génotype de blé dur									
	Belbachir	Cocorit	Isly	Karim	Marzak	Massa	O. Rabia	Sarif	Sebou	Tensift
Kamla	E, PI	E, PI	E	E	E, PI	E, PI	E, PI	E	E, PI	E
Guich	E, PI	E	E	E, PI	E, PI	E, PI	E, PI	E	E, PI	E, PI
Berrechid	E	E	E, PI	E	E	E, PI	E, PI	E	E	E
El Bourya	E, PI	E	E, PI	E	E, PI	E, PI	E, PI	E	E	E, PI
VL 90	E, PI	0	E	E	E	E, PI	E, PI	0	E	0
Mabchoura	E	0	0	E	E	E, PI	E	0	E, PI	E, PI
V5	E, PI	E, PI	0	E	E	E, PI	E	0	E	0
Doukkala	E	E	E	E	0	E	E, PI	E, PI	E	E

0 = Pas de réponse

■ Tableau 2

Influence de l'interaction entre les génotypes de blé dur et de maïs lors des croisements intergénériques sur la formation d'embryons (E) et de plantes chlorophylliennes (PI).

Génotype blé dur	Parent pollinisateur			
	Maïs		<i>H.bulbosum</i>	
	% Embryon	% Plantes	% Embryon	% Plantes
Massa	10,3	4,2	5,7	0
Oum Rabia	10,2	2,3	0	0
Benbachir	7,9	2,1	0	0
Isly	5,3	0,1	6,7	2,9
Marzak	5,2	0,5	2,2	0
Sebou	5,2	0,4	0	0
Karim	3,9	0,1	0	0
Sarif	3	0,1	3,3	1,1
Cocorit	2,6	0,4	6,3	0

■ Tableau 3

Production différentielle d'embryons et de plantules lors de croisements intergénériques blé dur x maïs et blé dur x *H.bulbosum*.

Les génotypes de blé dur qui ne réagissent pas après croisement avec *H. bulbosum* pourraient contenir des gènes dominants Kr qui

contrôlent la compatibilité de croisement (Snape *et al.*, 1979 ; Falk et Kasha, 1983). Comme cela a été démontré chez le blé tendre, l'élongation du tube pollinique serait freinée ou arrêtée et ainsi il n'atteindrait que rarement le sac embryonnaire pour permettre la fécondation (Snape *et al.*, 1980 ; Sitch et Snape, 1987)).

Le maïs serait insensible à ces gènes (Laurie et Bennett, 1987) et les différences observées entre génotypes de blé dans les réponses seraient dues à d'autres effets.

### *Rendement en plantes chlorophylliennes par des diverses haplométhodes*

Par androgenèse, la régénération de plantes haploïdes albinos est généralement observée. Des cas exceptionnels et aléatoires de régénération chlorophyllienne ont été obtenus mais aucun facteur étudié n'a pu augmenter de façon systématique leur fréquence extrêmement basse ( $3 \times 10^{-4}$ ) (tabl. 4).

Haplométhode	Expression du rendement	Rendement moyen	Rendement optimal
Androgenèse (17 génotypes)	plantes/100 anthères	0,0003	0,003
Androgenèse R1 (9 génotypes)	plantes/100 anthères		
Nesma x blé dur		0,28	0,77
Verry's x blé dur		1,05	1,9
Gynogenèse (8 génotypes)	plantes/100 ovaires	1,4	3,5
Blé dur x maïs (10 x 8 génotypes)	plantes/100 nouaisons	1,09	12

■ Tableau 4  
Rendement en plantes chlorophylliennes pour les diverses haplométhodes testées chez le blé dur.

Après croisement du génotype « Nesma » (blé tendre) avec 9 génotypes de blé dur, à la génération R1, le pourcentage moyen de plantes haploïdes chlorophylliennes obtenu est 0,28 % (le pourcen-

tage optimal pour un génotype de blé dur est 0,77). Avec le parent blé tendre « Verry's » et les mêmes 9 génotypes de blé dur, 1,09 plantes pour 100 anthères sont obtenues en moyenne avec un optimum à 1,9 pour un génotype de blé dur. Ces rendements, bien que faibles, sont positifs et régulièrement obtenus.

En gynogenèse (8 génotypes étudiés), 1,4 plantes ont été obtenues pour 100 ovaires cultivés, avec un optimum à 3,5 plantes pour l'un des génotypes.

Pour les croisements blé dur (10 génotypes) x maïs (8 génotypes) 1,09 plantes pour 100 nouaisons ont été obtenues en moyenne, avec, pour la combinaison optimale de génotypes, 12 % de plantes chlorophylliennes.

### *Résultats comparés des diverses haplométhodes appliqués à 14 génotypes de blé dur*

Pour cette comparaison, le plus grand nombre d'haplométhodes a été appliqué à 14 génotypes. Pour chacun de ces génotypes testés, au moins une haplométhode a permis la formation de plantes haploïdes chlorophylliennes (tabl. 5).

Génotype Blé dur				Croisements éloignés	
	Androgenèse génotypes	Androgenèse R1 à R3	Gynogenèse	x maïs	x bulbosum
Anouar	0	+	+	+	0
Benbachir	0	+	+	+	0
Cocorit	0	+		+	0
Isly	0	+		+	+
Jawhar	0	+	+	+	0
Jori	0	0	+	+	
Karim	0			+	0
Kyperounda	0		+	+	+
Massa	0+	0		+	0
Marzak	0+	0		+	0
Sebou	0+	0	+	+	0
Tensift	0	+		+	
Tassaout	0		+	0	+
Yasmine	0	+	0	0	0

Réponses (en plantes vertes) : 0 = aucune ; 0+ = très rare ; + = positive ; case vide = génotype non testé.

#### ■ Tableau 5

Obtention ou non de régénérations haploïdes vertes selon la méthode d'haplodiploïdisation employée.

En androgenèse, 12 des 14 génotypes n'ont donné que des plantes albinos et les deux autres ont produit une ou deux plantes chlorophylliennes chacun.

L'androgenèse à partir des descendants de croisements interspécifiques ( $R_1$  à  $R_3$ ) a donné des plantes chlorophylliennes pour 7 des 11 génotypes testés ce qui est encourageant. Cependant, cette méthode, qui nécessite 2 à 4 ans pour l'obtention des plantes-mères fournissant les anthères, serait difficilement applicable dans un schéma de sélection.

La gynogenèse a donné des résultats positifs pour 7 des 8 génotypes testés. Ainsi, c'est une méthode à large champ d'application. Cependant, les plantes régénérées à partir de bourgeons sont frêles et le sevrage s'avère relativement difficile.

La méthode de croisement intergénérique blé dur x maïs s'est montrée la plus efficace : 12 génotypes sur 14 ont donné des plantes haploïdes chlorophylliennes. Cette méthode, bien que relativement difficile à mener (les floraisons des deux espèces doivent coïncider *in vivo* ; la deuxième étape *in vitro* est délicate), est rapide (une génération) et la plus sûre. En effet, l'embryon se développe au sein de l'ovaire de façon presque naturelle avant le sauvetage *in vitro*. Après germination, la plantule est toujours haploïde et chlorophyllienne. Par contre, la réussite des croisements avec *H. bulbosum* est trop dépendante du génotype de blé dur ; les gènes d'incompatibilité Kr constituent un grand handicap pour cette méthode.

### *Application d'une pression de sélection au sel (NaCl)*

La présence de sel à des concentrations croissantes dans le milieu de sauvetage des embryons formés après croisement blé dur x maïs provoque une diminution progressive du pourcentage des plantes régénérées (tabl. 6). Pour les six génotypes étudiés, cinq ont pu régénérer des plantes à 2,5 g.l<sup>-1</sup> de NaCl, trois à 5 g.l<sup>-1</sup>. Aucune régénération n'a été observée en présence de 10 g.l<sup>-1</sup> de sel.

Après doublement chromosomique, les plantes obtenues ont produit des graines qui ont subi un cycle de multiplication pour disposer d'un matériel abondant afin d'effectuer des tests de tolérance.



Génotype blé dur	Concentration en NaCl (g.l <sup>-1</sup> )							
	0		2,5		5		10	
	Nb. emb	% pl. reg	Nb. emb	% pl. reg	Nb. emb	% pl. reg	Nb. emb	% pl. reg
Massa	44	10,4 b	38	9,0 c	40	2,3 b	39	0
Oum Rabia	28	5,5 b	30	4,2 b	27	1,3 ab	26	0
Tensift	24	1,5 a	22	0,9 a	25	0,4 a	25	0
Sebou	19	0,9 a	20	0,9 a	18	0 a	17	0
Marzak	19	1,1 a	18	0,4 a	17	0 a	20	0
Cocorit	9	0,5 a	10	0 a	9	0 a	8	0

Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de  $p = 0,05$

Nb emb. = Nombre d'embryons

% pl. reg = % de plantes régénérées

### Tableau 6

Régénération de plantes chlorophylliennes après sauvetage d'embryons sur des milieux salins suite aux croisements blé dur x maïs.

## Conclusions

Deux formes morphogénétiques se manifestent à travers les différentes haplométhodes : la forme embryon, qui apparaît *in vitro* lors d'androgénèse et *in vivo* lors des croisements intergénériques, et la forme bourgeon qui apparaît au sein du cal dans le cas de la gynogénèse.

Le génotype est un facteur important commun à toutes les méthodes. Même la méthode la moins dépendante (croisements blé dur x maïs) montre de grandes différences entre génotypes. On note également qu'un génotype qui réagit avec une haplométhode ne réagit pas forcément avec d'autres.

Concernant le milieu de culture, diverses combinaisons de ses composantes ont été adaptées à chaque haplométhode. Ces dernières réagissent de façon spécifique à un régime particulier d'éclaircissement et au prétraitement au froid des explants mis en culture.

Pour les croisements éloignés, l'induction de l'embryogénèse se fait *in vivo* dans les conditions de température et de lumière naturelles. Cependant, un traitement des épis au 2,4-D, 24 h après la pollinisation est indispensable au développement des nouaisons et des embryons haploïdes.

La méthode des croisements blé dur x maïs donnent des meilleurs taux de formation de plantes chlorophylliennes haploïdes pour le plus grand nombre de génotypes de blé dur. Cette méthode devrait ainsi être employée sur les hybrides F1 de parents ayant des caractères de résistance aux stress ou des qualités agronomiques intéressantes.

### Remerciements

Nous remercions chaleureusement l'AUF (Agence universitaire francophone) pour leur soutien sous la forme d'une action de recherche concertée financée par le FFR (Fond francophone de la recherche).

## Bibliographie

- Cherkaoui S, Lamsaouri O, Chlyah A, Chlyah H 2000 — Durum wheat x maize crosses for haploid wheat production: Influence of parental genotypes and various experimental factors. *Plant Breed* 119 : 31-36.
- Cherkaoui S, Lamsaouri O, Saidi N, Chlyah B, Chlyah H 1997 — Regeneration of haploid green plants through anther culture in durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) using liquid media. *Actes Inst Agron Vet (Maroc)* 17 : 201-208.
- Chlyah H, Saidi N 1991 — Analyse des capacités androgénétiques de génotypes marocains de *Triticum durum*. In *Amélioration des plantes pour adaptation aux milieux arides*. Aupelf-Uref edit. John Libbey Eurotext, Paris, 135-148.
- Chlyah O, Amail O, Saidi N, Cherkaoui S, Lamsaouri O, Chlyah AB, Chlyah H 1999 — Haplodiploïdisation chez le blé dur par croisements intergénériques : blé dur x *Hordeum bulbosum* et blé dur x maïs. *Cahiers Agricultures* 8 : 330-333.
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY 1975 — Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sinica* 18 : 659-668
- Chuang CC, Ouyang TW, Chia H, Chou SM, Ching CK 1978 — A set of potato media for wheat anther culture. In *Proc Symp Plant Tissue Culture*, Science Press, Beijing, 51-56.
- De Buyser J, Henry Y 1980 — Induction of haploid and diploid plants through *in vitro* anther culture of haploid wheat. *Theor Appl Genet* 57 : 57-58.
- Falk DE, Kasha KJ 1983 — Genetic studies of the crossability of hexaploid wheat with rye and *Hordeum bulbosum*. *Theor Appl Genet* 64 : 303-307.

- Gamborg OL,  
Miller RA, Ojima K 1968 —  
Nutrient requirements of suspension  
cultures of soybean root cells.  
*Exp Cell Res* 50 : 151-158.
- Genovesi AD, Magill CN 1979 —  
Improved rate of callus and green  
plant production from rice anther  
culture following cold shock.  
*Crop Sci* 19 : 662-664.
- Hu D, Yuan Z, Tong Y, Liu J 1986 —  
"Jinghua 1", a winter wheat variety  
derived from pollen sporophyte.  
*Sci Sin* 29 : 733-745.
- Huang B, Sunderland N 1982 —  
Temperature-stress pretreatment in  
barley anther culture. *Ann Bot* 49 : 77-88.
- Keller ERJ, Korzun L 1996 —  
Ovary and ovule culture for haploid  
production. *In In vitro* haploid  
production in higher plants vol 1.  
SM Jain, SK Sopory, RE Veilleux eds.  
Kluwer Academic Publishers,  
Pays-Bas, 217-235.
- Korzun V, Roder MS,  
Wendehake K, Pasqualone A,  
Lotti C, Ganal MW, Blanco A 1999 —  
Integration of dinucleotide  
microsatellites from hexaploid bread  
wheat into a genetic linkage  
map of durum wheat.  
*Theor Appl Genet* 98 : 1202-1207.
- Laurie DA, Bennett MD 1987 —  
The effect of the crossability loci Kr1  
and Kr2 on fertilization frequency  
in hexaploid wheat x maize crosses.  
*Theor Appl Genet* 73 : 403-409.
- Malhotra K, Maheshwari SC 1977 —  
Enhancement by cold treatment  
of pollen embryoid development  
in *Petunia hybrida*.  
*Z Pflanzenphysiol* 85 : 177-180.
- Mdarhri-Alaoui M 2000 —  
Nouvelles voies d'haploïdie  
chez le blé dur : androgenèse après  
croisement interspécifique avec le blé  
tendre et gynogenèse *in vitro*  
par culture d'ovaires non fécondés.  
Thèse doctorat, faculté des Sciences,  
Rabat, 121 p.
- Mdarhri-Alaoui M, Saidi N,  
Chlyah A, Chlyah H 1998 —  
Obtention par gynogenèse  
*in vitro* de plantes haploïdes  
chlorophylliennes chez le blé dur.  
*CR Acad Sci Paris* 321 : 25-30.
- Murashige T, Skoog F 1962 —  
A revised medium for rapid growth  
and bioassays with tobacco tissue  
cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
- Picard E, De Buyser J 1977 —  
High production of embryoids  
in anther culture of pollen derived  
homozygous spring wheats.  
*Ann Améli Plant* 27 : 483-488.
- Saidi N, Chlyah O, Chlyah H 1998 —  
Production of green haploid durum  
wheat plants by pollination of wheat  
with maize. *Can J Bot* 76 : 652-656.
- Saidi N, Cherkaoui S,  
Chlyah A, Chlyah H 1997 —  
Embryo formation and regeneration  
in *Triticum turgidum* ssp. *durum*  
anther culture.  
*Plant Cell Tiss Org Cult* 51 : 27-33.
- Sibi ML, Fakiri M 1994 —  
Gynogenèse chez des génotypes  
marocains d'orge (*Hordeum vulgare*).  
*In* Quel avenir pour l'amélioration  
des plantes ? Aupelf-Uref édit. John  
Libbey Eurotext, Paris, 329-336.
- Sitch LA, Snape JW 1987 —  
Factors affecting haploid  
production in wheat using the  
*Hordeum bulbosum* system:  
I-Genotypic and environmental effects  
on pollen grain germination,  
pollen tube growth, and the frequency  
of fertilization. *Euphytica* 36 : 483-496.
- Snape JW,  
Bennett MD, Simpson E 1980 —  
Post-pollination events in crosses  
of hexaploid wheat with tetraploid  
*Hordeum bulbosum*.  
*Z. Pflanzenzücht.* 85 : 200-204.

Snape JW, Chapman V, Moss J,  
Blanchard CE, Miller TE 1979 —  
The crossabilities of wheat varieties  
with *Hordeum bulbosum*.  
Heredity 42 : 291-298.

Trottier MC,  
Collin J, Comeau A 1993 —

Comparison of media for their  
aptitude in wheat anther culture.  
Plant Cell Tiss Org Cult 35 : 59-67.

Wang P, Chen YR 1986 —  
A study on the application of C17  
medium for anther culture.  
Acta Bot Sin 28 : 41-45.