

OBTENTION DE PLANTES HAPLOÏDES DE TRITICUM TURGIDUM SSP  
DURUM A PARTIR DE CULTURES D'ANTHERES IN VITRO.

par K. CHENNOUFI

Section Phytotechnie

Département d'Agronomie Générale

Institut National Agronomique -Alger .-

خلاصة :

ان الغرض من هذه الدراسة هو وصف طريقة الحصول على أجنة  
بطريقة زراعة الانسجة للمأبر المحاصل من مختلف الوراثة  
الجزائية للقمح الصلب (2n = 4s = 28 ص)  
ان التشكيلات المشتلة في وسط تحسين يحتوي على الحامض الجبرلي  
(كثافة المحلول من  $10^{-6}$  الى  $6 \times 10^{-6}$ ) أعطت بعض النباتات الأحادية  
التي خضوية منها و المهقاء.

RESUME

Cette étude a pour objet de décrire l'obtention d'embryons  
d'origine pollinique par culture *in vitro* d'anthers de divers  
génotypes algériens de blé dur (*Triticum turgidum ssp durum*  $2n =$   
 $4x = 28$ ). Les formations repiquées sur un milieu de régénération,  
contenant de l'acide gibberellique (concentration  $10^{-6}$  à  $6 \times 10^{-6}$ ) ont  
donné quelques plantes haploïdes chlorophylliennes et albina.

## INTRODUCTION

Dans un programme de sélection, le gain de temps, d'espace et de moyens est primordial. Aussi, la sélection de plantes d'intérêt agronomique comme les céréales par la méthode de l'androgénèse *in vitro* est-elle intéressante. (CHASE; COLLINS; RILEY; GRIFFING). On sait par exemple que 50 génotypes haploïdes provenant du pollen d'une plante  $F_1$  donneraient une information génétique plus claire que les 2500 plantes d'une  $F_2$  qu'il est nécessaire d'analyser en sélection généalogique classique (DEMARLY). Les expériences de simulation (WALSCH) montrent qu'en tout état de cause cette méthode a des chances de faire gagner plusieurs années.

Elle permettrait donc, non seulement d'obtenir très rapidement des lignées homozygotes, mais d'augmenter les possibilités de choix des génotypes et d'éviter les problèmes rencontrés au cours d'une sélection généalogique (GRIFFING).

De nombreuses recherches sur l'androgénèse *in vitro* chez les graminées ont été entreprises. Les auteurs obtiennent dans plusieurs cas des plantes qui sont souvent albina et de niveau de ploïdie variable (ASSELIN DE BEAUVILLE, NIIZEKI et al, THOMAS et al, CLAPHAM).

Appliquée plus particulièrement au genre *Triticum* cette méthode a permis d'obtenir des plantes haploïdes et des lignées homozygotes uniquement chez *Triticum aestivum* L. (PICARD et al, OUYANG et al).

Les travaux de **KIMATA** et **SAKAMOTO** sur divers **Triticum** n'ont permis que l'apparition de cals haploïdes et la néoformation de racines. Ces auteurs signalent cependant l'obtention d'une plante haploïde albinos ( $n = 2 \times = 14$ ) chez l'hybride amphiploïde  $ccc^4 c'^U (2n \times = 28)$  obtenu à partir du croisement de synthèse artificielle de **Aegylops Caudata** x **Aegylops umbellulata**.

Récemment **HADWIGER** et al ont communiqué des résultats concernant l'androgénèse du blé dur et notent l'obtention de 2 plantes chlorophylliennes et quelques plantes albina. Leurs conditions de cultures sont différentes de celles utilisées par nous et le nombre d'anthères cultivées n'est pas mentionné.

Les résultats présentés ci-dessous concernent l'obtention de cals et d'embryoïdes d'origine pollinique ainsi que la régénération à partir de ces derniers de plantes haploïdes dans le cas de plusieurs géotypes fixés de **Triticum durum Desf.** cultivés en Algérie et de plantes  $F_1$  de ces mêmes variétés croisées par des **Triticum durum** d'origines diverses.

### MATERIEL ET METHODES

Le matériel végétal, cultivé en serre, est constitué d'une part des cultivars suivants : **Triticum Polonicum** x **Zenati Bouteille** ; **I.N.R.A.T. 69** ; **Montpellier 37856** ; **Oued Zenati 368** ; **Bidi 17** et **Hedba 3** qui sont tous communément cultivés en Algérie.

D'autre part, les hybrides  $F_1$  introduits par la suite dans nos expériences ont été réalisés à la Station de Sélection des Céréales d'EL-HARRACH (ALGERIE). Il s'agit de :

•  $F_{1A}$  : (Flamingo "S" x Hedba 3) ;

F<sub>1B</sub> : (VZ 324 . CP x VZ 576 / Hourani ADS-77) x Hedba 3

F<sub>1C</sub> : (Flamingo "S" x Oued Zenati 368 )

F<sub>1D</sub> : (Pelicano x Bidi 17 ).

Les anthères dont le pollen est au stade uninucléé sont mises en culture sur un milieu de base M.B. dont la composition est :

- Macro et micro-éléments de MILLER\* , FER EDTA  $10^{-4}$  M.  
Vitamines de Fuji\*\* , Agar 10g/litre , 2,4 D\*\*\*  $2.10^{-6}$  ,  
PH 5,8.

Ce milieu de base est identique à celui utilisé sur *Triticum aestivum* (PICARD et al). Seuls la concentration en saccharose et le PH pour les expériences décrites ci-dessous ont été modifiées.

Suivant la méthode utilisée chez le blé tendre :

1. Nous avons soumis le matériel à un choc thermique (3°C en chambre noire) pendant des temps variant de 2 jours à 15 jours.
2. Nous avons apprécié le stade de la gamétogénèse mâle en calculant pour chaque épi le rapport R suivant :

$$R = \frac{\text{Longueur du dernier entre-noeud} + \text{longueur de l'épi}}{\text{Longueur graine}}$$

Ce critère a été corrélé de façon satisfaisante avec le stade du pollen.

3. La disposition des anthères sur le milieu de culture nous a permis enfin de repérer constamment leur place d'origine sur l'épi.

---

\* in (NIIZEKI et OONO)

\*\* Vitamines de Fuji + glycine  $10^{-6}$

\*\*\* 2,4 D : acide 2,4 dichlorophenoxy acétique.

Les embryons sont transférés dès leur apparition sur l'un des deux milieux de repiquage suivants :

**MR** : Macro et micro éléments de MILLER, Fer EDTA  $10^{-4}$  M, vitamines de Fujii, Saccharose 20g/litre ; Agar 8g/litre .

AIA  $1 \times 10^{-6}$  , Kinetine  $5 \times 10^{-7}$  , PH 5,9.

**Ga<sub>2</sub>** : Macro et micro éléments de MILLER, Fer EDTA  $10^{-4}$  M, vitamines de Fuji, Saccharose 20g/litre, Agar 8g/litre, Acide Gibberellique  $6 \times 10^{-6}$  , PH 6,1.

L'ensemble de ces milieux après ajustement à leurs PH respectifs , ont été autoclavés à 115°C pendant 20 mn. Cultures et repiquages sont maintenus entre 24° et 27°C et soumis à une photopériode de 16 heures sous tubes **GROLUX** . (12000 Lux).

## RESULTATS

### A.- Influence de la concentration en saccharose du milieu de culture.

Nous avons pu vérifier comme pour d'autres graminées, que chez le blé dur il est nécessaire d'utiliser des milieux à hautes concentrations en sucre, nous avons fait la gamme de concentration en saccharose suivante :

**K<sub>1</sub>** : MB + 20 g/l ; **K<sub>2</sub>** : MB + 40 g/l ; **K<sub>3</sub>** / MB + 60 g/l,

**K<sub>4</sub>** : MB +120 g/l à pH constant (5,8).

Les résultats pour la seule variété **Montpellier 37856** (**Tableau I**) nous permettent de conclure que les meilleurs rendements sont obtenus significativement à 120g/l de saccharose.

**Tableau I.- Influence de la concentration en saccharose dans le milieu de culture (Génotype : Montpellier 37856) pH = 5,8.**

Milieux	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>	K <sub>4</sub>
[C] en saccharose g/l	20	40	60	120
Nbre d'anthères mises en culture	5940	19360	6985	12485
Nbre d'embryons obtenus	3	4	11	40
$\frac{\text{Nbre d'embryons} \times 100}{\text{Nbre d'anthères}}$	0,051	0,021	0,15	0,32

Des résultats identiques ont été trouvés pour les autres génotypes. Par la suite seul le milieu K<sub>4</sub> a été utilisé.

**B.- Influence du génotype sur la production d'embryons**

Sur les six génotypes dont les anthères ont été cultivées sur le milieu K<sub>4</sub> nous montrons dans le **tableau II** une influence marquée du génotype de la plante-mère. Par exemple **Montpellier 37856** donne 4 fois plus d'embryons que **Bidi 17**. Cependant sur ce milieu les pourcentages moyens restent faibles.

**Tableau II.- Influence du géotype sur la production d'embryons (Milieu K<sub>4</sub>n pH 5,8)**

Géotype	Tr.polonicum Zenati Bou- teille	Bidi 17	Oued Zenati 368	INRAT	Montpel- lier 37256	Hedba 3
Nbre d'anthères	7315	9790	9405	11110	12485	1485
Nbre d'embryons	3	9	13	6	40	4
Nbre d'embryons x100 Nbre d'anthères	0,04	0,092	0,13	0,05	0,32	0,26

**C.- Influence du stade de prélèvement des anthères**

**Repères morphologiques**

L'étude des rapports R pour 170 épis de **Montpellier 37856** prélevés à des stades morphologiques différents (R compris entre 0,40 et 1) et dont les anthères (9330) ont été mises en culture permet d'établir le meilleur stade de prélèvement des épis. Ainsi 70% des épis ayant fourni au moins un embryon se situent dans la classe correspondant à  $R = 0,4 - 0,6$ . Soulignons d'autre part que ce critère morphologique R doit être défini ainsi pour chaque géotype.

L'observation cytologique des anthères des épis de **Montpellier** prélevées dans la meilleure classe (0,4 - 0,6) montre que toutes leurs microspores sont au stade uninucléé.

#### D. Position de l'anthère sur l'épi et production d'embryons

La place de l'anthère sur l'épi a une influence considérable sur la production d'embryons. Ainsi 94,92% des embryons ont été obtenus à partir des anthères localisées dans les fleurs du 3ème au 6ème épillets (Tableau III).

**Tableau III.- Production d'embryons par rapport à la position de l'anthère sur l'épi (génotype Montpellier 37856 - Milieu K<sub>4</sub>, pH 5,8)**

Place de l'épillet	Nombre de cals	$\frac{\text{Nombre d'embryons} \times 100}{\text{Nbre total d'embryons}}$
1er et 2è	non prélevés (anthères atrophiées)	
3è et 4è	39	66,10%
5è et 6è	17	28,82%
7è et 8è	3	5,09%
9è et 10è	0	0

#### E. Durée d'apparition et aspect des embryons

Le temps d'apparition des embryons est nettement plus court chez *Triticum durum* (génotype **Montpellier 37856**) : 50% des embryons obtenus apparaissent au bout de la seconde semaine de culture, tandis que chez *Triticum aestivum* les premiers n'apparaissent qu'au bout de la 4ème semaine (PICARD E. et DE BUYSER J. )

Les embryons obtenus de couleur blanc-jaunâtre ou bien translucide présentent une structure soit lisse soit granuleuse. Repiqués sur des milieux de régénération **MR**, ils développent uniquement des racines. Le comptage chromosomique de ces néoformations a été

fait : plusieurs plaques métaphasiques à  $n = 14$  ont été observées. Celles-ci prouvent l'origine pollinique des embryons.

**F. Amélioration du rendement en embryons par modification du pH.**

Nous avons tenté une expérience sur le milieu  $K_4$  modifié pour le pH égal non plus à 5,8 mais à 6,5 avant l'autoclavage du milieu. Sur ce milieu nous avons mis en culture des anthères d'une part de **Hedba 3**, d'autre part de divers hybrides afin de comparer leur comportement à celui de cultivars fixés.

Ces résultats sont nettement meilleurs que les précédents (voir **Tableau II**) : ainsi pour la variété **Hedba 3** le rendement est multiplié par 7 par la seule élévation du pH. Cependant nous ne pouvons exclure pour les hybrides une manifestation d'un hétérosis en culture *in vitro*.

**Tableau IV.- Amélioration du rendement en embryons milieu  $K_4$ , pH 6,5**

Génotypes	Hedba	F <sub>1</sub> A	F <sub>1</sub> B	F <sub>1</sub> C	F <sub>1</sub> D
Nombre d'anthères	1686	438	528	132	702
Nombre d'embryons obtenus	35	6	11	17	31
<u>Nombre d'embryons x100</u> Nombre d'anthères	2,07	1,37	2,08	12,8	4,42

**G.- Obtention de plantes haploïdes chlorophylliennes et albina**

Le milieu de régénération utilisé pour le blé tendre s'étant révélé inefficace ; nous avons testé un nouveau milieu **Ga<sub>2</sub>** où l'acide gibbirellique est la seule substance de croissance. Ce nouveau milieu nous a permis d'obtenir des régénérations de plantes entières. Sur 105 embryons de génotypes différents repiqués sur **Ga<sub>2</sub>** nous avons obtenu 7 plantes : 3 chlorophylliennes et 4 albina.

**Tableau V.- Régénération d'embryons sur Ga<sub>2</sub> ; pH 6,1**

Génotypes	Montpellier 37856	F <sub>1</sub> A	F <sub>1</sub> B	F <sub>1</sub> C	F <sub>1</sub> D	total
Nombre d'embryons	40	6	11	17	31	
Nombre de plantes régénérées	1 albinos	1 albinos 1 Chloro.	1 albinos	1 chloro.	1 Chloro. 1 Albin	7

**CONCLUSION**

Les résultats obtenus par la technique d'angrogénèse "**in vitro**" sont encore insuffisants malgré la maîtrise des conditions de cultures. Nous avons pu mettre en évidence les effets du milieu de culture, du génotype, du stade de prélèvement ainsi que des conditions de repiquage des embryons. En ce qui concerne l'amélioration des rendements en embryons et leurs potentialités de régénération nous travaillons actuellement sur la prolongation du temps d'apparition de ces formations.

Parallèlement à ce travail nous engageons une étude de l'haploïdisation par gynogénèse "in vitro".

Enfin les résultats obtenus sur "**Triticum aestivum**" comparés à ceux obtenus sur "**Triticum durum**" pourraient clarifier le rôle joué par le génome D qui est le complément des génomes A et B contenus dans la garniture chromosomique de **Triticum durum**.

#### BIBLIOGRAPHIE

- AÏSSA-CHENNOUFI K., 1977.** - Obtention de plantes haploïdes à partir de cultures d'anthers in vitro de "**Triticum durum** Desf.  
Thèse 3ème Cycle Université PARIS XI Mai 1977.
- ASSELIN DE BEAUVILLE M., 1976.** - Androgénèse "in vitro" chez **Oryza sativa** (variété **Cygalon**) **Agronomie Tropicale** XXX1-1, p.50-57.
- CHASE S.S., 1974.** - Utilization of haploids in Plant Breeding : Breeding Diploid species.  
"Haploids in Higher plants ;  
**Advances and Potential** ", Guelph, p. 211-230.
- CLAPHAM D., 1971.** - Development of Callus from the pollen of **Lolium** and **Hordum**.  
**Z. Pflanzenzüchtg**, 65 , 285-292.

- CLAPHAM D.,1973.- Haploïd *Hordeum* plants from anthers *in vitro*  
Z. Pflanzenzüchtg,69, 2, 142-155.
- COLLINS G.B. and LEGG PD,1974.- The use of haploïds in Breeding  
allopolyploid species. Haploïds in Haploïds in Higher  
plants.  
Advances and Potential Guelph p. 231-247.
- DEMARLY Y.,1975.- Anther and pollen for production of Haploïds.  
Their utilization in plant Breeding.  
Nuësch Congrès Eucarpia - Munich.
- GRIFFING B.,1975.- Efficiency changes due to use of doubled  
Haploïds in recurrent selection methods.  
Theoretical and applied genetics 46 , 367-386.
- HADWIGER M.A. and HEBERLE-BORS E.,1985.- Pollen plant production  
in *Triticum turgidum* ssp *durum*.  
Colloque sur les HAFLOIDES - Vienne - Août 1985.  
Publication de IAFA-SM 282/17 p. 31-32.
- KIMATA M., SAKAMOTO S.,1972.- Production of haploïd albino plants of  
*Aegilops* by anther culture.  
JAPANESE J. Genet. Vol. 47, 1 , 61-63 /G/.
- NIIZEKI H. and OONO K.,1968.- Induction of Haploïd rice plant from  
anther culture .  
Proc. Japan Acad., 44 , p. 554-559.
- OUYANG T.W., HU H., CHUANG C.C., ISNEG C.C.,1973.- Induction of Pol-  
len plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in*  
*vitro*.  
Scientia Sinica, 16, 1, 79-95.

PICARD E., 1973.- Influence de modification dans les corrélations internes sur le devenir du gametophyte mâle de *Triticum aestivum* L. in situ et en culture in vitro.  
C.R. Acad.Sci.Ser.D, 277-780 + planches.

PICARD E., DE BUYSER J., 1973.- Obtention de plantules haploïdes de *Triticum aestivum* L à partir de cultures d'anthères in vitro.  
C.R. Acad.Sc. Paris Série D, 1463-1466/G.

PICARD E.- Mise au point de l'androgénèse in vitro chez "*Triticum aestivum* pour l'obtention de plantes haploïdes.  
Thèse 3è Cycle, Université Paris XI, Juin 1974.

PICARD E., DE BUYSER J., 1975.- Nouveaux résultats concernant la culture d'anthères in vitro de blé tendre (*Triticum aestivum* L.). Effets d'un choc thermique et de la position de l'anthère dans l'épi.  
C.R. Acad. Sci. Paris, série D, 127-130.

WALSH E.J., 1974.- Efficiency of the haploïd method of Breeding Autogamous diploïd species. A computer simulation Study . Haploïds in higher plants.  
Advances and Potential Guelph, p.195-209.