



## Effet de prétraitement au froid et au mannitol sur l'androgénèse et la gynogénèse chez des variétés d'orge de printemps (*Hordeum vulgare* L.)

### Effect of cold and mannitol pretreatment on the androgenesis and gynogenesis in spring barley varieties (*Hordeum vulgare* L.).

S. Hentour<sup>1,2\*</sup>, Y. El Goumi<sup>1,2</sup>, M. Fakiri<sup>1,2</sup>, O. Lamsaouri<sup>1,2</sup>, M. Benbachir<sup>3</sup>, M. Benchekroun<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université Hassan I, faculté des sciences et techniques, laboratoire de recherche Agroalimentaire & santé, B.P. 577, 26000 Settat, Maroc

<sup>2</sup> Equipe de recherche Mutagenèse, Toxicogénétique et immunologie, FSTS, Maroc

<sup>3</sup> Laboratoire Biochimie et Neurosciences, FSTS, Maroc

Received 15 Nov 2015 Revised 13 Apr 2016, Accepted 23 Apr 2016

\*Corresponding author. E-mail: [s.hentour@gmail.com](mailto:s.hentour@gmail.com)

#### Résumé

Dans le cadre de l'obtention de plantes haploïdes par culture *in vitro* (CIV) d'anthers (androgénèse) et d'ovaires non fécondés (gynogénèse) chez l'orge (*Hordeum vulgare*) cultivars: Asni et Tamelalt, nous avons étudié l'effet du prétraitement au froid à 4°C pendant 21 jours (effet thermique) et au mannitol à 0.7M pendant 3 jours (effet osmotique). Un ensemble de 5221 anthers et 2379 ovaires a été mis en culture sur milieu d'induction et de régénération Olsen. Les résultats montrent l'effet positif du prétraitement au froid sur l'induction androgénétique de cals et/ou embryons et la régénération de plantes essentiellement chez le cultivar Tamelalt mais avec une proportion élevée de plantes albinos. En gynogénèse, toutes les plantes régénérées issues d'ovaires (sans aucun prétraitement ou prétraités au mannitol) étaient de type chlorophyllien (4 pour Asni et 2 pour Tamelalt). Nous avons montré que seule la voie gynogénétique permet d'obtenir en totalité des plantes haploïdes et vertes. L'androgénèse, par contre, donne beaucoup plus de plantes qui sont albinos, le taux de régénération en plantes vertes est très faible voir nul et le nombre de plantes albinos est très important et avoisine les 100%.

**Mots clés:** Culture *in vitro*, androgénèse, gynogénèse, *Hordeum vulgare*, froid, mannitol.

#### Abstract

In the context of obtaining haploid plants by *in vitro* culture of anthers (androgenesis) and unfertilized ovaries (gynogenesis) in barley (*Hordeum vulgare*) cultivars: Asni and Tamelalt., We studied the effect of cold pretreatment at 4 ° C during 21 days (thermal shock) and 0.7M mannitol for 3 days (osmotic shock). A set of 5221 anthers and 2379 ovaries were cultured on induction medium and regeneration Olsen. The results show the positive effect of cold pretreatment on androgenic induction of calluses and/or embryos and regeneration of plants mostly among the cultivar Tamelalt but with a high proportion of albino plants. In gynogenesis, all plants regenerated from ovaries (without any pretreatment) or pretreated with mannitol were of type chlorophyllous (4 for Tamelalt and 2 of Asni).

**Key words:** androgenesis, gynogenesis, *Hordeum vulgare*, *in vitro* culture, haplodiploidization, cold, mannitol.

## 1. Introduction

L'orge (*Hordeum vulgare* L.) est une céréale à paille à 2 rangs, elle représente 15% de la consommation mondiale après le blé, le riz et le maïs. On distingue deux qualités d'orge : l'orge fourragère, destinée à l'alimentation animale et l'orge brassicole. Après avoir subi quelques transformations, les grains d'orge peuvent faire partie de nos plats en cuisine. Toutefois de nombreuses contraintes, biotiques (pucerons, virus, etc) ou abiotiques (stress salin, sécheresse, etc) menacent la production d'orge.

Le choix du matériel végétal et l'amélioration des techniques de production sont des facteurs déterminants pour confronter cette situation. Les biotechnologies apportent des nouvelles techniques permettant d'augmenter la tolérance à la sécheresse et de réduire le cycle végétatif chez l'orge. D'autres stratégies de sélection basées sur l'amélioration génétique ont ainsi été développées. Elles sont basées sur l'utilisation des haplométhodes par culture *in vitro* d'anthers ou d'ovaires non fécondés ou par croisement interspécifique [3].

L'haplodiploïdisation permet de réduire le nombre de cycles d'autofécondation nécessaires pour la sélection du caractère intéressant par rapport aux méthodes classiques d'amélioration [25].

C'est dans ce contexte que se place notre travail qui consiste à obtenir des plantes haploïdes par application de la CIV d'anthers (androgenèse) et d'ovaires non fécondés (gynogenèse) sur l'orge de printemps de la région de Marrakech *Hordeum vulgare* L, variétés Asni et Tamelalt. Pour un meilleur rendement en taux d'induction et de régénération en plantes chlorophylliennes, nous avons donc étudié l'effet de prétraitement au froid à 4°C pendant 21 jours (effet thermique) et au mannitol à 0.7M pendant 3 jours (effet osmotique) appliqué sur les épis des plantes donneuses.

## 2. Matériel et méthodes

### a) Matériel végétal

Notre travail a porté sur l'étude de deux cultivars d'orge de printemps Tamelalt (résistante à la salinité) et Asni (modérément sensible à la salinité) obtenus par l'INRA du Maroc et inscrits au catalogue officiel depuis 1984.

### b) Semis de plantes mères

Le semis naturel des grains d'orge a été réalisé sur une parcelle expérimentale de 28 m<sup>2</sup> de la Faculté des Sciences et Techniques de Settat. Il a été échelonné du mois de novembre jusqu'au mois de décembre. Dans des sillons profonds de 2 à 3 cm espacés de 10 cm, nous avons déposé et recouvert de terre les caryopses de chaque génotype. Le désherbage manuel a été régulièrement pratiqué pour garder de bonnes conditions de croissance et éviter toute concurrence avec les plantes adventices. Le bon état sanitaire de l'expérimentation a permis de n'avoir recours à aucun traitement anti-fongique ou anti-parasitaire.

### c) Prélèvement des épis

Le prélèvement des épis et la mise en CIV doit se faire quand les grains de pollen sont au stade uninucléés à noyau centré pour l'androgenèse et binucléés ou trinucléés avant l'anthèse pour la gynogenèse.

En androgenèse comme en gynogenèse, sur un épi récolté, un épillet central est prélevé. Les trois étamines sont fixées et colorées dans le mélange du carmin acétique, elles sont ensuite écrasées modérément entre lame et lamelle afin de dissocier les cellules les unes des autres et libérer les microspores. Cette technique présente l'avantage d'être rapide et permet de repérer facilement les différents stades de la microsporogenèse.

Pour faire le repérage de ce stade, des critères phénotypiques en relation avec le stade du gamétophyte mâle ou femelle, ont pu être définis telles la longueur des barbes émergeant de la gaine de la dernière feuille [1, 11, 16] ou la distance entre les deux dernières feuilles [6]. En fonction des conditions de culture des plantes mères, ces critères sont très variables d'un génotype à un autre.

### d) Prétraitement des épis

Les talles des épis ont été prélevées et ont subi par la suite les prétraitements suivants :

- Prétraitement au froid : Les épis sont prélevés, non dégagés de la gaine de la dernière feuille, enroulés dans du papier filtre imbibé d'eau et du papier aluminium et mis au réfrigérateur à 4°C pendant 21 jours à l'obscurité
- Prétraitement au mannitol : Incubation en milieu mannitol à 0.7M pendant 3 jours.

Pour le témoin, anthères et ovaires ont été directement extraits et mis en culture sans aucun prétraitement préalable.

*e) Culture in vitro d'anthères et d'ovaires*

Les épis des deux variétés étudiées Asni et Tamelalt, délicatement débarrassés de leur gaine, puis de leurs barbes sont stérilisés sous hotte à flux laminaire par l'éthanol pur.

Après enlèvement des glumes et glumelles, les anthères et les ovaires de chaque épi sont déposés dans des boîtes de Pétri de 55 mm de diamètre, à raison d'un épi par boîte, à la surface du milieu d'induction [6]. Ce milieu riche en hormone de croissance ANA (2mg/l) et BAP (1mg/l) permet l'induction des divisions des microspores ou des cellules du sac embryonnaire aboutissant ainsi à la formation d'embryons ou de cals.

Pour l'androgénèse, les boîtes sont mises pendant 4 à 8 semaines à l'obscurité à 25°C. Pour la gynogénèse, les boîtes ensemencées sont gardées au laboratoire à température ambiante et à la lumière du jour pendant 4 à 6 semaines.

Les cals et les embryons formés à partir d'anthères ou ovaires ainsi que les plantules directement formées à partir d'ovaires après 4 à 8 semaines sont repiqués sur milieu de régénération (milieu Olsen gélosé) additionné d'hormone de croissance BAP (0.4mg/l) et du sucrose (35 g/l).

Seules les plantules chlorophylliennes obtenues avec ou sans prétraitement repiquées sur milieu de régénération sont transférées sur milieu Olsen d'enracinement de façon à permettre leur développement en plantes bien enracinées haploïdes (7ch) ou parfois doublé spontanément (14ch). Pour l'orge, le doublement spontané des chromosomes est fréquent soit 70 à 90 % d'haploïdes doublés [7, 12].

*f) Acclimatation*

Les plantules chlorophylliennes enracinées, présentant des talles de 5 à 10 cm de hauteur et un enracinement correct (de 2 à 6 racines de 3 à 5 cm de longueur) [10, 21] ont été transférées dans des gobelets (2/3 terreau et 1/3sable) et placées dans une mini serre fabriquée au laboratoire pour assurer leur développement jusqu'au stade floraison.

*g) Le test statistique*

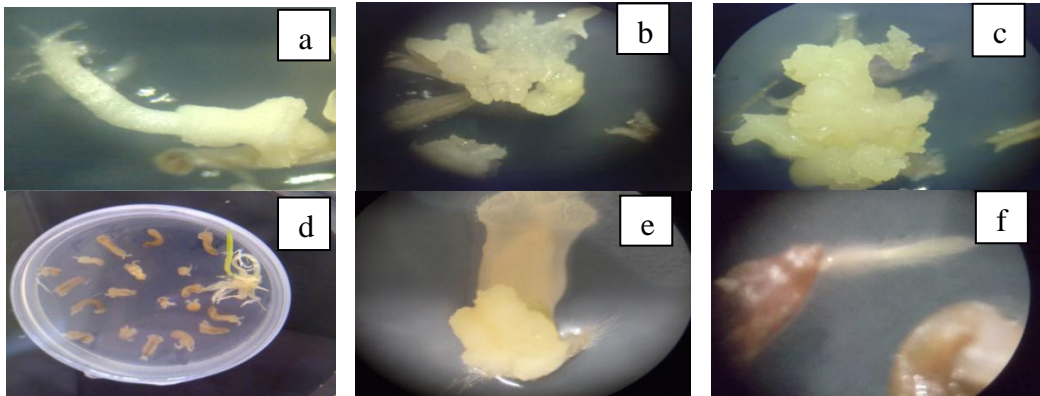
Nous avons analysé nos résultats par le test  $\chi^2$  (khi carré ou khi deux) pour démontrer l'existence d'interactions entre les différents paramètres étudiés.

### 3. Résultats

Après 4 à 8 semaines de mise en CIV d'anthères et d'ovaires non fécondés des deux génotypes, des structures bien différenciées embryogènes et/ou callogènes apparaissent. L'observation sous loupe binoculaire, nous a montré que la formation de ces structures a eu lieu dans les lobes supérieurs des anthères qui ne sont pas en contact direct avec le milieu. Pour les ovaires, les parois verdissent en présence de lumière et la taille des ovaires augmente. Ensuite les parois de l'ovaire se nécrosent et ce n'est qu'après environ 6 semaines de culture que des embryons ou plantes vertes éclatent.

*A : Capacité d'induction*

En androgénèse, la morphogénèse observée d'embryons ou de cals chez les deux génotypes Asni et Tamelalt, est semblable aux stades initiaux. Ensuite, ces structures évoluent en embryons (Figure 1, a) ou cals (Figure 1, b). Dans certains cas, nous avons observé des cals embryogènes constitués de cellules de type embryogène évoluant en embryon d'origine unicellulaire (Figure 1, c). En gynogénèse, (Figure 1, e), les cals blanchâtres et relativement compacts obtenus après 6 semaines, continuent à croître en se détachant progressivement de la paroi ovarienne et certains forment très vite des bourgeons chlorophylliens (Figure 1, d). La formation de racines couvertes de poils absorbants peut être observée (Figure 1, f).

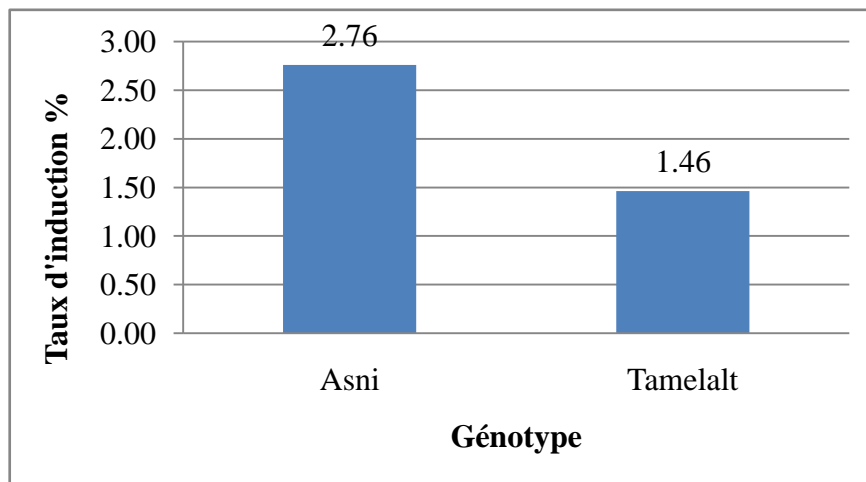


**Photo 1:** Structures morphogénétiques obtenues en androgénèse et gynogénèse :

- |  |   |
|--|---|
| <p>a: embryon androgénétique<br/>                 b: cal androgénétique<br/>                 c : cal embryogène androgénétique<br/>                 d: bourgeon chlorophyllien formé à partir du cal gynogénétique</p> | <p>e : cal gynogénétique sortant de la base de l’ovaire après six semaines de culture<br/>                 f: racine couverte de poils absorbants</p> |
|--|---|

*a) Effet du génotype*

L'observation de la figure 1, met en évidence l'effet du génotype sur l'induction de formation d'anthers callogènes et/ou embryogènes (ACE). Les taux obtenus varient de 1.46% pour Tamelalt à 2.76 % pour Asni. Le test de  $\chi^2$  donne une valeur très significative à 5%,  $\chi^2_{0,05} = 3,841$ ,  $\chi^2$  (Témoin) = 7,481\*\* et confirme que les deux variétés répondent différemment sur le milieu d'induction. Il y'a donc un effet du génotype chez l'orge [24]. Cette différence génotypique est liée à des facteurs génétiques en relation avec le processus de déroulement de l'androgénèse [5].



**Figure 1:** Taux d'induction (%) de la culture d'anthers par génotype sur milieu Olsen(I) (tous prétraitements confondus)

Pour la culture d'ovaire, la variété Tamelalt a donné 9 ovaires réactifs soit un taux de 0.79%, et 7 pour Asni avec un taux de 0.56 %. Le test de  $\chi^2$  est non significatif au seuil de 5%,  $\chi^2_{0,05} = 3,841$ ,  $\chi^2$  (Témoin) = 3.119<sup>ns</sup>.

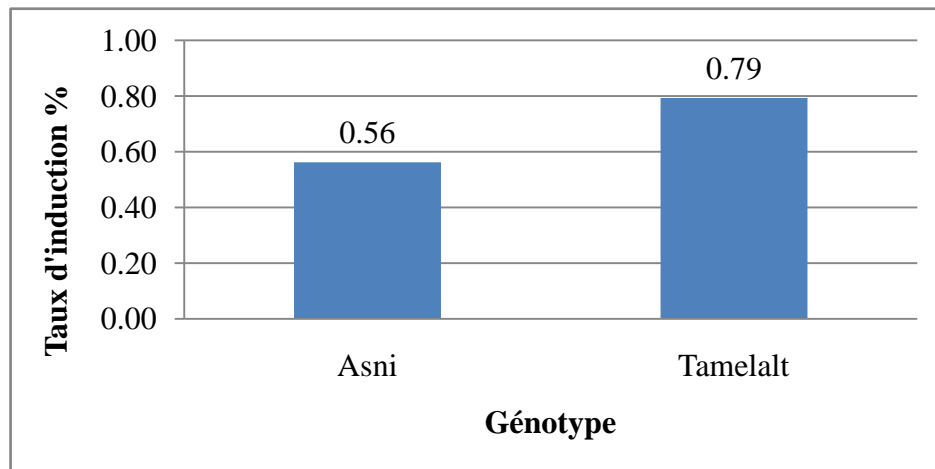
*b) Effet du prétraitement*

*i. En androgénèse*

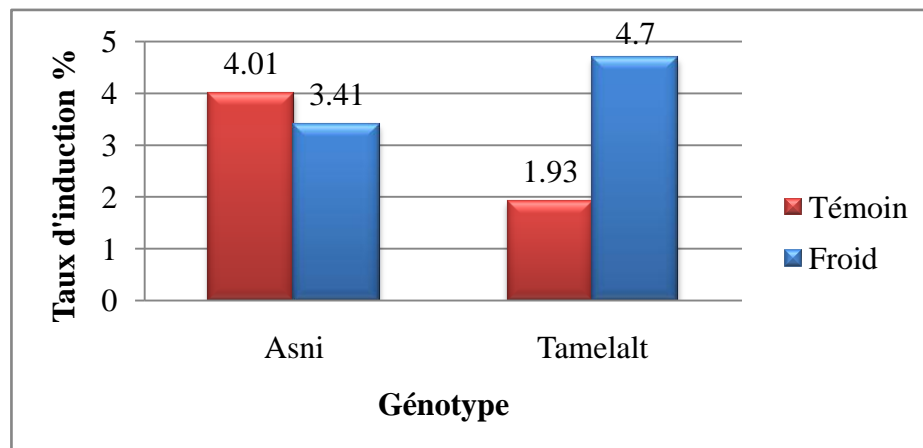
➤ *Prétraitement au froid*

Les résultats portés sur la figure 3, montrent qu'il y a un effet du prétraitement au froid et du génotype sur l'induction embryogène et/ou callogène. Les taux obtenus sont variables en fonction du génotype. Lorsque les épis du génotype Tamelalt sont prétraités au froid, nous avons remarqué que le taux d'induction est passé de

1.93% à 4.70%. Par contre, pour Asni les taux enregistrés sont respectivement pour le témoin et le prétraitement de 4.01% et 3.41%.



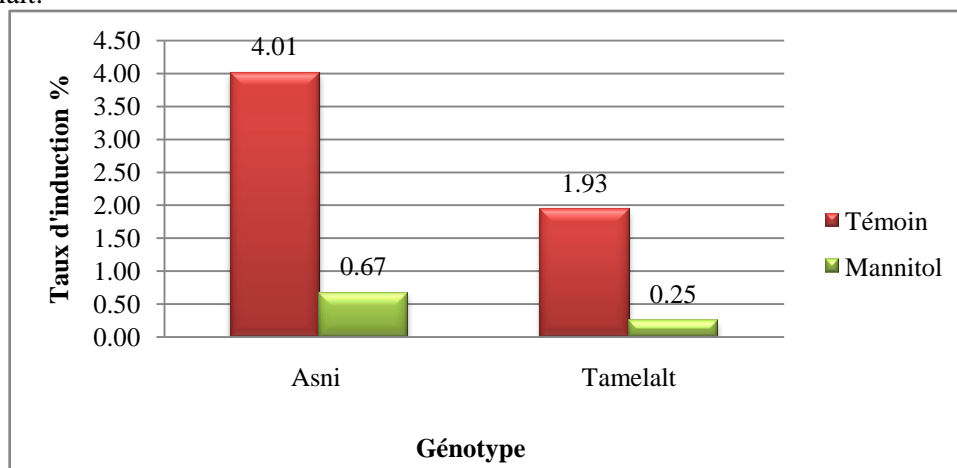
**Figure 2:** Taux d'induction (%) de la culture d'ovaires par génotype sur milieu Olsen(I) (tous prétraitements confondus)



**Figure 3:** Taux d'induction (%) par génotype en fonction de prétraitement au froid pour la culture d'anthères

➤ *Prétraitement au mannitol*

La figure 4 montre l'effet du prétraitement des anthères au mannitol pendant 3 jours. Les taux d'induction pour les deux génotypes ont chuté de 4.01% à 0.67% pour Asni et de 1.93% à 0.25% pour Tاملalt.



**Figure 4:** Effet du prétraitement au mannitol sur l'induction embryogène ou callogène pour les deux génotypes

Le test de  $\chi^2$  met en évidence une différence hautement significative à 5% du prétraitement sur la production d'anthères callogène et /ou embryogène. On peut donc déduire pour Tamelalt qu'il y'a interaction génotype/ prétraitement au froid.

➤ Comparaison par calcul des  $\chi^2$  (Induction, androgenèse)

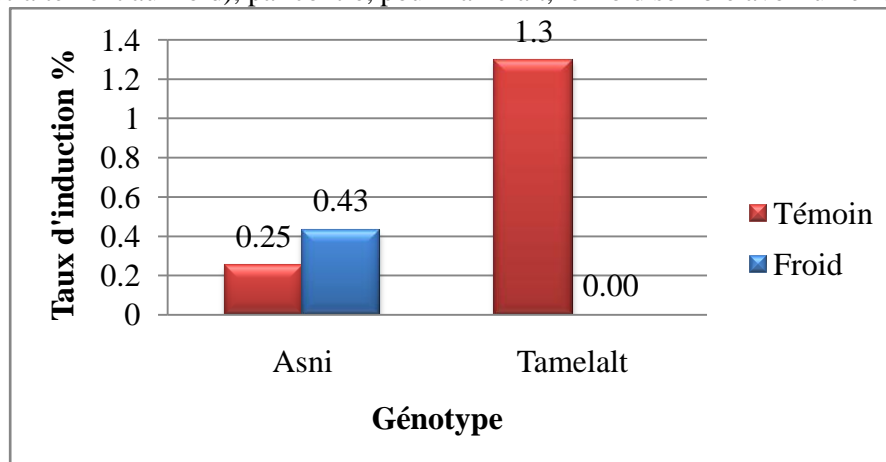
Effet du génotype pour chaque prétraitement	Effet du prétraitement pour chaque génotype
$\chi^2_{0,05} = 3,841$ $\chi^2$ (Témoin) = 7,481** $\chi^2$ (Mannitol) = 2,085 <sup>ns</sup> $\chi^2$ (Froid) = 0,906 <sup>ns</sup>	$\chi^2_{0,05} = 5,991$ $\chi^2$ (Tamelalt) = 36,735*** $\chi^2$ (Asni) = 22,824***

ns : non significatif, \*significatif, \*\* : très significatif ; \*\*\* : hautement significatif

ii. En gynogenèse

➤ Prétraitement au froid

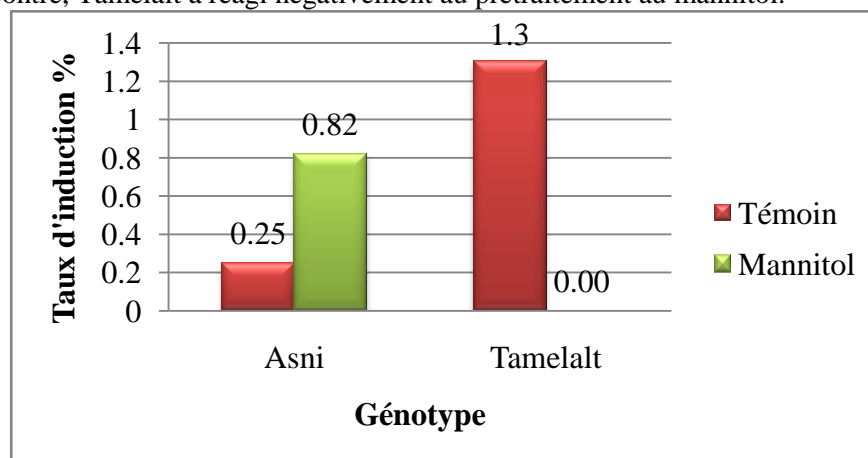
La figure 5 montre une hétérogénéité de réponse. Pour Asni, le taux d'induction est passé de 0.25% (témoin) à 0.43% (prétraitement au froid), par contre, pour Tamelalt, le froid semble avoir un effet négatif.



**Figure 5:** Effet du prétraitement au froid sur l'induction embryogène ou callogène pour les deux génotypes

➤ Prétraitement au mannitol

Pour le prétraitement au mannitol, une légère amélioration du taux d'induction a été enregistrée chez la variété Asni. Par contre, Tamelalt a réagi négativement au prétraitement au mannitol.



**Figure 6:** Effet du prétraitement au mannitol sur l'induction embryogène ou callogène pour les deux génotypes

Vues les faibles valeurs enregistrées, le calcul de  $\chi^2$  pour la gynogenèse est non significatif.

➤ Comparaison par calcul des  $\chi^2$  (Induction, gynogenèse)

Effet du génotype pour chaque prétraitement	Effet du prétraitement pour chaque génotype
$\chi^2_{0,05} = 3,841$ $\chi^2$ (Témoin) = 3.119 <sup>ns</sup> $X^2$ (Mannitol) = 0.769 <sup>ns</sup> $X^2$ (Froid) = 1.503 <sup>ns</sup>	$\chi^2_{0,05} = 5,991$ $\chi^2$ (Tamelalt) = 5.838 <sup>ns</sup> $X^2$ (Asni) = 1.512 <sup>ns</sup>

B. Capacité de régénération

Au cours de cette phase, la transformation des embryons et/ou cals issus de la culture d'anthers ou d'ovaires en plantes chlorophylliennes ou albinos est observée. Toutefois certains cals que nous avons repiqué du milieu d'induction sur milieu de régénération Olsen n'ont donné que des racines.



Plantule gynogénétique



Racine androgénétique

Photo 2: Régénération des anthers et des ovaires

Il est important de signaler qu'il est difficile d'interpréter correctement les résultats obtenus, et ceci pour deux raisons; d'une part l'effectif mis pour chaque génotype n'est pas équilibré, vu la faible productivité en épis des deux variétés étudiées et surtout de la variété Tamelalt et d'autre part le nombre de plantes régénérées est très faible.

De même le test  $\chi^2$  effectué ne donne qu'une valeur indicative des effets significatifs ou non pour le facteur testé car le nombre de plantes régénérées est très faible.

a) L'effet du génotype

Les résultats portés sur la figure 7, ne montrent aucun effet de génotype sur la régénération de plantes androgénétiques quel que soit le prétraitement utilisé. Le test  $\chi^2$  le prouve au seuil 5%,  $\chi^2_{0,05} = 3,841$ ,  $\chi^2$  (Témoin) = 7,481<sup>\*\*</sup>. La capacité de régénération diffère d'un génotype à un autre [13].

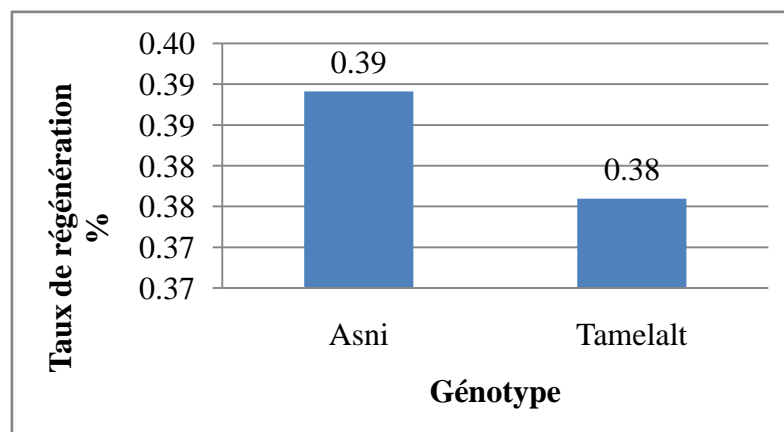


Figure 7: Effet du génotype sur le taux de régénération de plantes androgénétiques.

Les résultats de l'étude de l'effet du génotype sur la culture d'ovaires non fécondés portés sur la figure 8 montrent que pour la gynogenèse le génotype Asni donne un taux de régénération maximal de 0.38% et un taux de 0.18% pour Tamelalt. Le calcul  $\chi^2$  donne une valeur non significative de l'effet du génotype au seuil de 5%,  $\chi^2_{0,05} = 3,841$ ,  $\chi^2$  (Témoin) = 3.119<sup>ns</sup>.

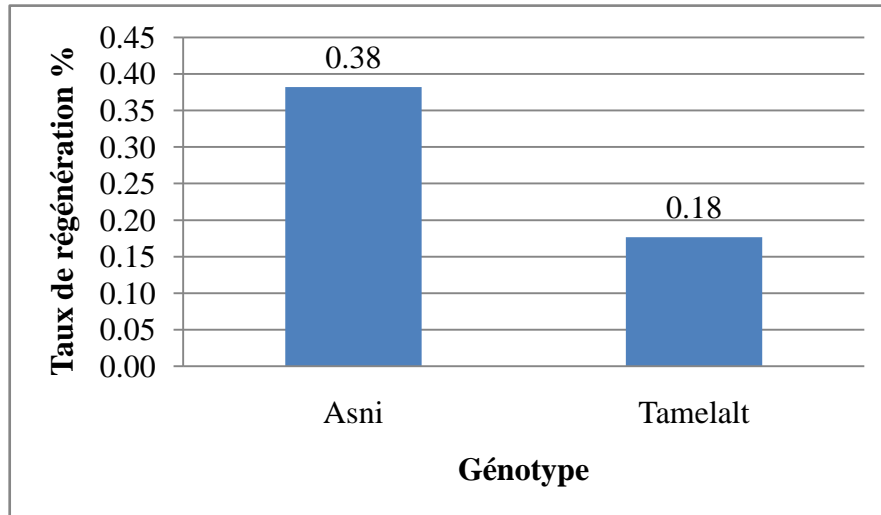


Figure 8: Effet du génotype sur le taux de régénération de plantes gynogénétiques.

b) L'effet du prétraitement

i. En androgenèse

➤ Prétraitement au froid

L'observation de la figure 9, montre une variabilité des réponses des génotypes en présence ou en absence du prétraitement au froid. L'effet positif du prétraitement au froid est seul observé pour la variété Tamelalt dont le taux passe de 0.68% à 0.94%, par contre pour la variété Asni le prétraitement au froid a un effet négatif sur la régénération.

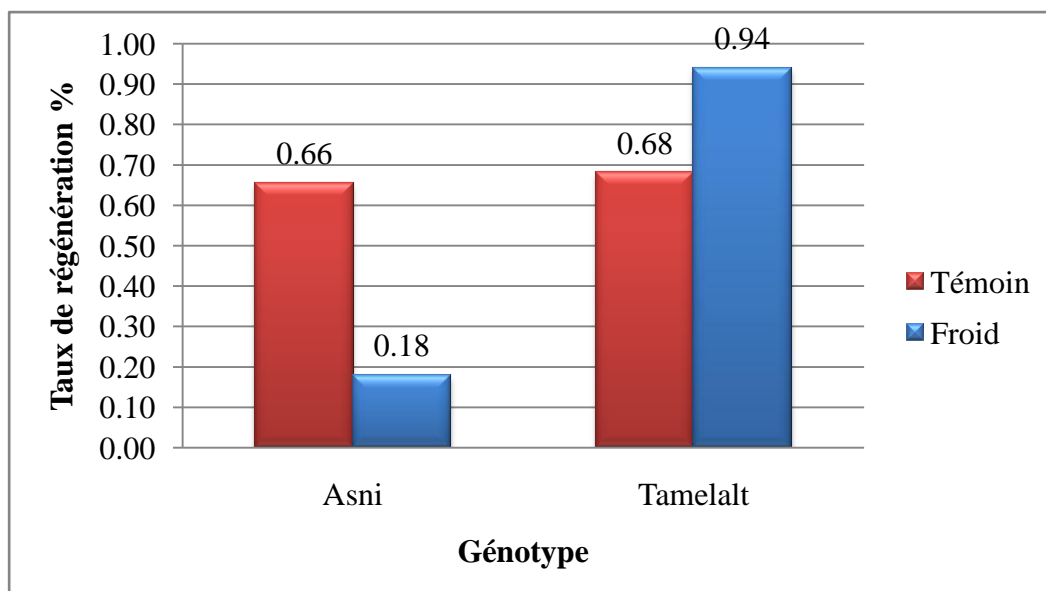
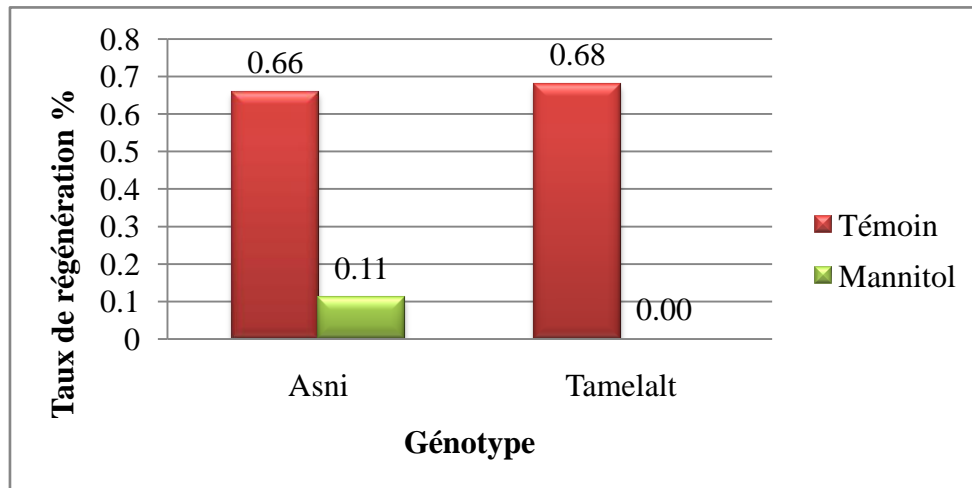


Figure 9: Effet du prétraitement au froid sur la régénération androgénétique pour les deux génotypes.

➤ Prétraitement au mannitol

Pour l'androgenèse la figure 10 révèle des taux de régénération très faibles voir nuls ce qui montre que ce prétraitement aurait un effet négatif sur la régénération.





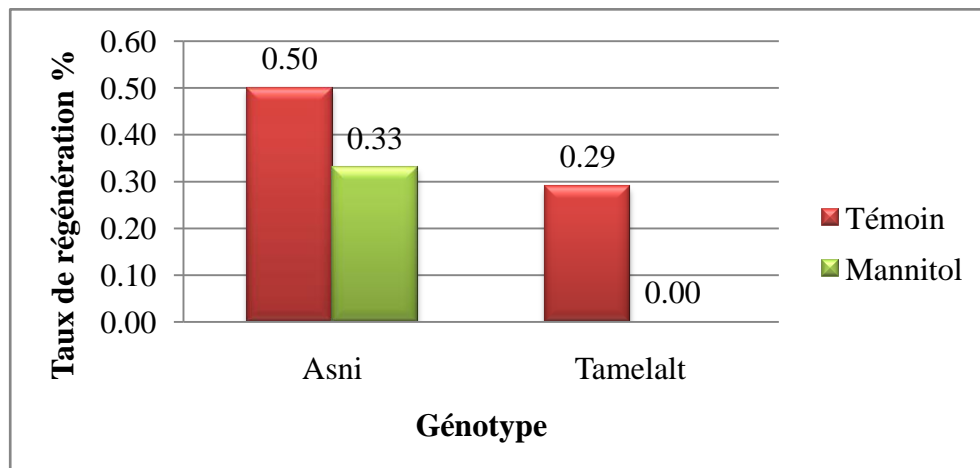
**Figure 10:** Effet du prétraitement au mannitol sur la régénération androgénétique pour les deux génotypes

Le test  $\chi^2$  montre une différence très significative de l'impact du prétraitement pour le génotype Tamelalt.

Effet du génotype pour chaque prétraitement	Effet du prétraitement pour chaque génotype
$\chi^2_{0,05} = 3,841$ $\chi^2$ (Témoin) = 0.005 <sup>ns</sup> $\chi^2$ (Mannitol) = 1.330 <sup>ns</sup> $\chi^2$ (Froid) = 2.555 <sup>ns</sup>	$\chi^2_{0,05} = 5,991$ $\chi^2$ (Tamelalt) = 9.334 <sup>**</sup> $\chi^2$ (Asni) = 4.890 <sup>ns</sup>

ii. *En gynogenèse*

Quant à la gynogenèse la figure 11 illustre les résultats de l'effet du prétraitement au mannitol. Ces résultats suggèrent que la culture d'ovaires non fécondés dépend fortement de la variété, la variété Asni a eu un taux de régénération le plus élevé (0.50%). Le test  $\chi^2$  est non significatif.



**Figure 11:** Effet du prétraitement au mannitol pour les deux génotypes en gynogenèse.

**Remarque :** Pour la gynogenèse le prétraitement au froid n'est pas pris en considération.

Effet du génotype pour chaque prétraitement	Effet du prétraitement pour chaque génotype
$\chi^2_{0,05} = 3,841$ $\chi^2$ (Témoin) = 0.298 <sup>ns</sup> $\chi^2$ (Mannitol) = 0.305 <sup>ns</sup>	$\chi^2_{0,05} = 5,991$ $\chi^2$ (Tamelalt) = 1.139 <sup>ns</sup> $\chi^2$ (Asni) = 1.286 <sup>ns</sup>

### C. Albinisme

Le tableau ci-dessous exprime le nombre de plantes albinos obtenues par rapport au nombre total de plantes régénérées. Il montre que l'albinisme est très fréquent. Le pourcentage de plantes albinos produites par les deux génotypes reste considérable et atteint 100% pour la variété Tamelalt quelque soit le prétraitement. Alors que la variété Asni a donné une seule plante verte chez le témoin.

**Tableau 1** : Taux d'albinisme en fonction du génotype et de prétraitements

Prétraitement	Témoin sans prétraitement			Froid			Mannitol			$\Sigma$		
	P	Palb	TA	P	Palb	TA	P	Palb	TA	$\Sigma$ P	$\Sigma$ Palb	$\Sigma$ TA
Asni	9	8	88,89	1	1	100	1	1	100	11	10	90,91
Tamelalt	6	6	100	3	3	100	0	0	0	9	9	100

P : plantes régénérées ; P alb : plantes albinos ; TA : taux d'albinisme (%) ;  $\Sigma$  : somme ou moyenne

Signalons que vu le nombre de plantes obtenues, aucune interprétation valable ne peut être énoncée. Même le test statistique donne des valeurs non significatives pour l'effet du génotype et du prétraitement.

Effet du génotype pour chaque prétraitement	Effet du prétraitement pour chaque génotype
$\chi^2_{0,05} = 3,841$ $\chi^2$ (Témoin) = 0.714 <sup>ns</sup>	$\chi^2_{0,05} = 5,991$ $\chi^2$ (Asni) = 0.244 <sup>ns</sup>

**Remarque** : Les prétraitements et le génotype Tamelalt n'ont pas été pris en considération puisqu'ils ont présenté des résultats nuls.

## 4. Discussion

Les résultats présentés dans cette étude sur l'application chez l'orge *Hordeum vulgare* de deux techniques d'haplodiploïdisation par CIV d'anthers et d'ovaires non fécondés, montrent les potentialités des variétés Asni et Tamelalt à produire des cals et/ou embryons et à régénérer des plantes vertes sous l'effet de prétraitement (froid et mannitol.).

Dans ce travail l'effet du génotype a été bien marqué tant pour l'androgenèse que pour la gynogenèse. Ceci se traduit par des taux d'induction androgénétique obtenus, soit 2.76% pour le cultivar Asni et 1.46% pour Tamelalt. Alors qu'en gynogenèse, la différence des réponses embryogènes n'a pas été significative.

Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par plusieurs auteurs qui ont décrit l'effet du génotype, avec des taux nettement supérieurs aux nôtres. En effet, les travaux de [10] chez l'orge montrent des taux d'induction de 56,1% pour le cultivar Asni et 38.6% pour Tamelalt. Quant aux travaux de [8] ils ont révélé, chez le blé, un taux de 1.63% pour le cultivar Aguilal (blé tendre) et 0.14% pour le cultivar Karim (blé dur) et le cas de la culture des microspores chez le blé dur [19], avec un impact de génotype enregistré dès le début de l'androgenèse [9]. Cet auteur, ajoute que le temps optimal de transfert des cals pour la régénération est aussi très important, il est défini entre 40-60 jours. En effet, les cals les plus âgés ont tendance à ne produire que des plantes albinos, tandis que les plus jeunes ne régénèrent pas.

L'effet du génotype sur le taux de régénération demeure aussi important. Dans notre expérimentation, les taux de régénération enregistrés pour les deux cultivars sont très faibles voire nuls.

Pour mieux définir les conditions optimales d'obtention d'embryons et plantes vertes, nous avons testé, l'effet du prétraitement au froid (4°C) pendant 21 jours et l'effet du mannitol à 0.7M pendant 3 jours par rapport au témoin sans prétraitement. Les résultats suggèrent que le froid a un impact positif pour le cultivar Tamelalt, qui fait apparaître un taux d'induction et de régénération respectif de 4.7% et de 0.94%. Cependant, la réactivité des anthers chez le cultivar Asni, semble affaiblit quand les épis sont prétraités au froid. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par [17], qui ont démontré que le prétraitement au froid n'a pas toujours un effet bénéfique pour tous les génotypes.

Par ailleurs, [23] rapportent que le prétraitement des épis au froid à 4°C, pendant 14 jours ou 21 jours, permet une amélioration considérable de la réponse des anthers à produire des plantes vertes. Un prétraitement

au froid prolongé augmente généralement la proportion des cals et de plantes vertes et peut induire un doublement de stock chromosomique [9].

Contrairement à la culture d'anthères où le froid améliore le taux d'induction et de régénération chez le génotype Tamelalt, dans le cadre de la gynogenèse et dans notre étude le prétraitement à 4°C semble néfaste à la culture d'ovaires non fécondés pour les deux génotypes.

Concernant le prétraitement au mannitol, nous avons constaté que les anthères et les ovaires sont particulièrement sensibles à l'emploi du mannitol. Les résultats obtenus montrent un effet négatif du mannitol chez les 2 génotypes. Toutefois, il faut noter que le témoin sans prétraitement se distingue nettement du prétraité au mannitol par la régénération de 9 plantes pour environ 1373 anthères mises en culture soit un taux de 0.66% pour Asni et 6 plantes pour environ 881 soit 0.68% pour Tamelalt. En gynogenèse, le mannitol a eu un impact positif uniquement sur l'induction embryonnaire chez le cultivar Asni en passant d'un taux de 0.25% pour les ovaires sans prétraitement à un taux plus élevé de 0.82% pour ceux traités au mannitol.

Asni a donné 2 plantes vertes pour 402 ovaires mis en culture sans aucun prétraitement et on a obtenu 2 plantes vertes pour 690 ovaires mis en culture pour Tamelalt.

Nos résultats sont en contradiction avec ceux publiés par d'autres auteurs. En effet, chez l'orge, par culture de microspores isolées, plusieurs auteurs ont rapporté qu'un prétraitement direct des anthères au mannitol allant de 0,1 à 1,5M pendant 3 à 4 jours à la place d'un prétraitement de 4 semaines au froid augmente considérablement aussi bien l'embryogenèse que la régénération chlorophyllienne [28, 14, 15, 2, 4, 18].

Sur des cultures d'anthères effectuées sur l'orge, [15] concluent, après une comparaison avec le prétraitement au froid de longue durée, que le mannitol utilisé à une concentration optimale de 0.3 à 0.4M améliore la production d'embryons et de plantes.

D'autres suggèrent la substitution du prétraitement des anthères au froid à 4°C pendant 28 jours, par leur immersion dans une solution de mannitol 0.3M pendant 3 jours [20].

Quant à la gynogenèse, les prétraitements au froid ou au mannitol semblent n'avoir aucun effet pour les deux génotypes. Soulignons que la variété Asni a donné, 2 plantes vertes pour 609 ovaires mis en culture soit un taux de régénération de 0.33% pour le prétraitement au mannitol. [25] ont montré qu'un prétraitement dans une solution du mannitol 0.3 M à 4°C n'a pas un effet significatif sur la productivité de la culture des ovaires non fécondés, en outre, l'addition de 2,4-D, vitamines, glutamine et du maltose comme source de carbone dans le milieu de culture améliore la CIV des ovaires.

Les faibles résultats obtenus pourraient être liés aux conditions de croissance des plantes mères, ces dernières étaient cultivées au champ à la FSTS dont les conditions de température, d'éclairage et d'humidité n'étaient pas contrôlées.

L'albinisme constitue un obstacle et une limite certaine à l'exploitation de l'androgenèse chez les céréales. En effet, il dépasse 70% chez certaines variétés d'orge [13]. Dans notre étude, le taux d'albinisme atteint 100% en androgenèse, par contre, il est nul en gynogenèse. L'obtention de plantes totalement chlorophylliennes en gynogenèse, par rapport à l'androgenèse peut s'expliquer par une embryogenèse directe plus fréquente par la voie gynogénétique que par la voie androgénétique. Chez les génotypes qui ne produisent que des plantes albinos, les plastides dépourvus de membranes internes sont pauvres en ADN par rapport aux plastides des cultivars produisant des plantes vertes. [27].

## **Conclusion**

Les faibles réponses des anthères et d'ovaires enregistrées dans notre étude peuvent être imputées aux conditions de culture de plantes mères en plein champ et donc sous des conditions climatiques naturelles et en absence de fertilisants et pesticides dont l'utilisation améliorent la productivité des céréales. De plus, à cause du gel hivernal du mois de décembre et de la sécheresse des mois de février et mars 2012, les cultivars ont présenté, une vigueur végétative plus faible que la normale, un faible tallage et les épis prélevés étaient chétifs. Certes, les stress au début ou au milieu de saisons peuvent se traduire chez les plantes par des changements morphologiques, physiologiques et moléculaires affectant ainsi, leur croissance et leur productivité, ainsi il baisse leur réponse en CIV.

## Références

1. Blanc S., DAA Génétique, et Amélior. Plantes, DEA Sc. Agro, INPL Nancy. (1990).
2. Caredda S., Devaux P., Sangwan R.S., Clément C., *Protoplasma* 208 (1999) 248-256.
3. Chlyah H., Cherkaoui S., Saidi N., Lamsaouri O., Mdarhi-Alaoui M., Chlyah O., Benkirane H., Amail O., Chlyah A.B., In : Hamon Serge (ed.). Paris (FRA) ; Journées Scientifiques du Réseau AUF : Biotechnologies Végétales : Amélioration des Plantes et Sécurité Alimentaire, 7., Montpellier (FRA), ISBN 2-7099-1472-7 (2001) 235-254
4. Cistué L., Ramos A., Castillo AM., *Plant Cell Tiss Org*, 55 (1999) 159-166.
5. Demarly Y., Sibi M.L., Amélioration des plantes et biotechnologies. AUPELF-UREF, éd., collection Universités Francophones, Rome, London, Paris, John Libbey Eurotext, 2ème édition, (1996) 151 p.
6. Devaux P., *Plant Breed*, 98 (1987) 215–219.
7. Devaux P., (Thèse doctorale), Université de Lille 1, Villeneuve-d'Ascq, France, 1998.
8. El Goumi y., Fakiri M., Lamsaouri O., Benchekroun M., Hassani M.F., *Leb. Sci. J.*, 15 (2014).
9. Eudes F., Chugh A., *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, (2009) 87-96.
10. Fakiri M., (Thèse Doctorale) INPL Sciences agronomiques, av. de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre, (1995) 132 p
11. Forest C., DEA Sc. Agro, INPL Nancy, 1988.
12. Foroughi-Wehr B., Wenzel G., *Plant Breed*, (1993) 261-277.
13. Guasmi F., Elfalleh W., Marzougui N., Triki T et Ferchichi., *Acta Bot Gallia*, 3 (2010) 445-450.
14. Hoekstra S., van Zijderveld M.H., Louwerse J.D., Heidekamp F., Van der Mark F., *PLANT SCI*, (1992) 89-96.
15. Hoekstra S., Van Bergen S., Van Brouwershaven I.R., Schilperoort R.A., Heidekamp F., *J. PLANT PHYSIOL*, 148 (1996) 696–700.
16. Kandil M., (Thèse doctorale en Sciences agronomiques). *Génétique*, Vandoeuvre-lès-Nancy, INPL, 1990.
17. Karimzadeh G., Kovács G., Barnabás B., *CEREAL RES*, 23 (1995) 223-227.
18. Kasha K.J., Hu T.C., Oro R., Simion E., Shim Y.S., *J. Exp. Bot.* 52 (2001) 1227-1238.
19. Labbani Z., Richard N., De Buyser J., Picard E., *C.R. Biologies*, 328 (2005) 691-772.
20. Liming H., Steven E., Ullrich SE., Kleinhofs A., Carol M., Stiff C.M., *Plant Cell Rep*, 12 (1993) 334-338.
21. Mansouri S., Kobaissi A., Nziengui H., Fakiri M., Shekafandeh A., Sibi M.L., *Geo-Eco-Trop*, 29 (2005) 77-88.
22. Olsen F., *Carlsberg Res Commun*, 52 (1987) 393-404
23. Powell W., *Génome*, 30 (1988) 152-157, 10.1139/g88-026.
24. Sibi M.L., Fakiri M., *Sécheresse*, 11(2000) 125-32.
25. Slama-Ayed O., Slim-Amara., *Plant Cell Tiss Org*, 91 (2007) 125-133.
26. Turcotte P., St-pierre C.A., Ming Ho K., *Can. J., Plant Sci.*, 60 (1980) 79-85.
27. Varnier A.L., Jacquard C., Clément C., *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, (2009) 147-154.
28. Ziauddin A., Simion E., Kasha K.J., *Plant Cell Rep*, 9 (1990) 69-72.

(2016) ; <http://www.jmaterenvironsci.com/>