

Haplodiploïdisation chez le blé dur par croisements intergénériques : blé dur x *Hordeum bulbosum* et blé dur x maïs

Omar Chlyah, Omar Amail, Najia Saidi, Souad Cherkaoui, Ouafae Lamsaouri, Averil Bouchra Chlyah, Hassan Chlyah

L'obtention de plantes haploïdes de blé dur puis le doublement de leurs chromosomes avec formation de plantes diploïdes homozygotes peuvent être d'une grande utilité dans les programmes d'amélioration variétale pour obtenir des lignées homozygotes en général et plus scientifiquement pour améliorer la tolérance à la salinité et à la sécheresse.

La technique de culture d'anthères (androgénèse) permet la formation de plantes haploïdes vertes (entre 20 et 30 %) chez le blé tendre [1] alors que, chez le blé dur, elle conduit à des plantes albinos dans plus de 90 % des cas. En effet, une seule plante verte après la mise en culture de milliers d'anthères de 20 cultivars de blé dur adaptés aux conditions du Maroc a été obtenue malgré un taux de formation d'embryons haploïdes qui pouvait atteindre 22,4 % [2]. Ni le changement de milieu solide [3] et liquide [4], ni la variation de plusieurs facteurs physiologiques et d'environnement n'ont permis de réduire le taux d'albinisme.

Pour surmonter ce handicap, diverses méthodes d'haplodiploïdisation ont été expérimentées : la culture d'anthères pro-

venant de plantes issues de croisements interspécifiques (blé tendre x blé dur) [5], la culture d'ovaires (gynogénèse) [6] et des croisements intergénériques (blé dur x *Hordeum bulbosum*, blé dur x maïs). Cette technique a été mise au point sur l'orge cultivé à la suite de croisements avec *H. bulbosum* ; elle a ensuite été adaptée au blé tendre [7, 8]. Son application au blé tendre est limitée par la présence d'allèles Kr à l'état dominant dans certains génotypes qui sont à l'origine d'une incompatibilité entre les deux espèces : la progression du tube pollinique est soit ralentie, soit bloquée à la base du style ou dans les parois de l'ovaire, ce qui empêche la fécondation [9]. Son application au blé dur par O'Donoghue et Bennett [10] n'a pas permis d'obtenir des plantes haploïdes. Le remplacement du parent mâle *H. bulbosum* par le maïs dans un croisement avec le blé tendre a permis de surmonter cette incompatibilité [11, 12] et divers travaux ont montré qu'il était possible d'adapter cette technique au blé dur [13-15].

Matériels et méthodes

Dans une première série d'expériences, 8 cultivars de *Triticum turgidum* var. *durum* (Acsad 65, Anouar, Belbachi, Jawhar, Jori, Yasmine, Kyperounda et Isly) ont été croisés soit avec *H. bulbosum* cv. SY21, soit avec 2 cultivars de *Zea mays* : Kamla et Guich (résultats groupés). Dans une deuxième série d'expérience, 4 culti-

vars du blé dur (Sarif, Isly, Massa et Tensift) ont été croisés avec 4 cultivars de maïs (Guich, Kamla, Elabdia et Pool 34).

Les plantes de blé dur sont cultivées au champ. Les épis sont castrés de 1 à 4 jours avant l'anthèse et couverts par des sachets en cellophane. Lorsque les stigmates sont réceptifs, du pollen fraîchement récupéré d'orge ou de maïs y est déposé à l'aide d'un pinceau ; 24 heures plus tard, une solution d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) à 100 mg/l est injectée dans le dernier entre-nœud et une goutte de la même solution est déposée sur chaque fleur.

Pour tous les croisements (blé dur x maïs), les épis sont coupés 3 ou 4 jours après la pollinisation et maintenus, dans une solution de 2,4-D (100 mg/l), d'éthanol (10 ml/l) et de saccharose (de 40 à 60 g/l), dans une salle de culture à 22 °C-10 °C (jour-nuit), à 80 % d'humidité relative et en photopériode journalière de 16 heures.

Environ 15 jours après pollinisation, les ovaires formés sont stérilisés dans de l'hypochlorite de sodium (3 %) avant l'excision des embryons et leur culture aseptique sur le milieu B5 [16] additionné d'AIA (1 mg/l), de kinétine (1 mg/l) et de saccharose (2 %). Les boîtes de Pétri sont maintenues dans l'obscurité jusqu'à la germination des embryons qui sont ensuite transférés dans des tubes à essai sur le même milieu. Après un développement suffisant, les plantules sont sevrées en terre organique dans des pots maintenus dans la salle de culture.

Le comptage des chromosomes a été effectué au niveau des méristèmes raci-

O. Chlyah, O. Amail, N. Saidi, S. Cherkaoui, O. Lamsaouri, A. Bouchra Chlyah, H. Chlyah : Laboratoire de physiologie végétale, Département de biologie, Faculté des Sciences, Université Mohammed-V, BP 1014, Rabat, Maroc.

Tirés à part : O. Chlyah

naires après coloration de Feulgen de jeunes plantules probablement écrasées dans une goutte de carmin acétique. Le doublement chromosomique a été obtenu par trempage des plantes (stade 3-4 feuilles) dans une solution de colchicine à 0,1 % pendant 5 heures suivi d'un rinçage à l'eau courante.

Des tests du chi carré ont été effectués lors de la comparaison de l'effet du génotype blé dur sur la nouaison et la formation d'embryons dans le cadre des croisements blé dur x *H. bulbosum* et blé dur x maïs.

En ce qui concerne la comparaison entre génotypes de blé dur pour les croisements blé dur x maïs (deuxième expérience), les moyennes des nouaisons et des embryons formés ont été transformées par la fonction Arc sin \sqrt{x} avant l'analyse statistique par le test *Duncan new multiple range*.

Résultats et discussion

Comparaison des réponses de 8 génotypes de blé dur pollinisés par *H. bulbosum* ou par le maïs

Après pollinisation avec *H. bulbosum* ou le maïs, nous avons analysé la nouaison, l'embryogenèse et la formation de plantes vertes (tableau 1). On observe un

pourcentage plus élevé de nouaison (61,9 à 83,8 %) pour la pollinisation avec *H. bulbosum* qu'avec le maïs (18,5 à 57,9 %). Pour les génotypes Isly et Kyperounda, les taux d'embryogenèse sont semblables avec *H. bulbosum* et le maïs, tandis que les autres génotypes forment peu ou pas (Jawhar et Acsad 65) d'embryons quand *H. bulbosum* est le pollinisateur.

Les génotypes Isly et Kyperounda ont formé respectivement 8 et 3 plantes vertes avec *H. bulbosum* et 12 et 1 plantes vertes avec le maïs. Les génotypes Jawhar et Anouar donnent 5 et 3 plantes vertes avec le maïs mais aucune avec *H. bulbosum*.

Globalement, la pollinisation avec le maïs se révèle plus efficace qu'avec *H. bulbosum* en termes de pourcentage d'embryons et de plantes vertes obtenues et en nombre de génotypes. L'obtention de plantes vertes après pollinisation avec *H. bulbosum* est une première car, à notre connaissance, seules des fécondations avaient été réalisées jusqu'à présent par ce croisement [10].

Effet des génotypes parentaux lors du croisement blé dur x maïs

Quatre génotypes de blé ont été croisés avec 4 cultivars de maïs (tableau 2).

L'influence du génotype de blé dur sur le pourcentage de nouaison est statistiquement significative : pour le génotype de maïs Guich, il varie de 16 % (Massa)

à 35,7 % (Isly), des variations similaires étant observées pour les autres cultivars. Cependant, ces résultats ne sont pas forcément en corrélation avec ceux d'embryons : Tensift croisé avec Guich ne donne aucun embryon malgré un taux de nouaison de 29 %. Les différences entre génotypes de blé dur en termes d'embryons formés sont également significatives sauf dans le croisement avec le maïs Pool 34 (tableau 2). Pour les cultivars de maïs Guich, Kamla et Elabdia, c'est Sarif qui donne les meilleurs pourcentages d'embryons (respectivement 51,8, 15,3 et 10,3 %), suivi d'Isly (21,7, 7 et 3,6 %) et de Massa (8,1, 1,6, 3,6 %), Tensift ne donnant que 1,7 % pour le croisement avec Kamla et 0 % pour les autres cultivars de maïs. La germination des embryons en plantes vertes a été obtenue pour Sarif et Massa avec 3 génotypes de maïs, alors qu'Isly a pu se régénérer avec les 4 génotypes. En tout, 42 plantes haploïdes vertes ont été formées, comportant 14 chromosomes (nombre haploïde).

Le cultivar de maïs Guich donne de meilleur résultat (22,3 % d'embryons et 7,7 % de plantes vertes) que les trois autres, le cultivar Pool 34 étant le moins performant avec seulement 2,5 % d'embryons et 0,8 % de plantes vertes (tableau 3). Ces différences entre maïs ont été peu étudiées, les auteurs se contentant souvent d'un seul cultivar [13, 17].

En ce qui concerne les génotypes de blé dur, Sarif, avec 17,5 % d'embryons et 4,4 % de plantes vertes, est le plus performant ; Isly et Massa occupent une position intermédiaire et Tensift a une capacité très faible (tableau 4).

Conclusion

Cette étude montre que des croisements intergénériques permettent d'obtenir des plantes haploïdes chlorophylliennes chez le blé dur, qui se développent normalement à partir d'embryons parfaitement formés et sans présenter de calcs.

Le croisement blé dur x *H. bulbosum* a abouti à la formation de plantes vertes pour 2 cultivars de blé dur alors que, dans d'autres travaux, le développement s'est arrêté au stade de la fécondation [10]. Le croisement blé dur x maïs est d'un intérêt plus général, le choix du cultivar de maïs permettant d'optimiser

Tableau 1

Comparaison des croisements intergénériques blé dur x *H. bulbosum* (*H.b.*) et blé dur x *Zea mays* (*Z.m.*)

Cultivar de blé dur	Nombre de fleurs pollinisées		Nouaisons (%)		Nombre d'embryons		Embryons/nouaisons (%)		Nombre plantes vertes		Plantes vertes/nouaisons (%)	
	<i>H.b.</i>	<i>Z.m.</i>	<i>H.b.</i>	<i>Z.m.</i>	<i>H.b.</i>	<i>Z.m.</i>	<i>H.b.</i>	<i>Z.m.</i>	<i>H.b.</i>	<i>Z.m.</i>	<i>H.b.</i>	<i>Z.m.</i>
Isly	298	592	71,5	51,0	25	30	11,7	9,9	8	12	3,8	4,0
Kyperounda	408	350	83,8	57,1	19	11	5,5	5,5	3	1	0,9	0,5
Jawhar	188	700	78,2	57,9	0	44	0,0	10,9	0	5	0,0	1,2
Anouar	228	1674	76,7	36,1	2	24	1,1	4,0	0	3	0,0	0,5
Yasmine	321	378	81,9	31,2	4	4	1,5	3,4	0	0	0,0	0,0
Jori	239	562	78,2	39,7	2	9	1,1	4,0	0	0	0,0	0,0
Belbachir	184	840	61,9	28,7	1	3	0,9	1,2	0	0	0,0	0,0
Acsad 65	106	764	71,7	18,5	0	5	0,0	3,6	0	0	0,0	0,0

Comparison of intergeneric crosses : durum wheat x *Hordeum bulbosum* and durum wheat x *Zea mays*

Tableau 2

Croisements intergénériques entre géotypes de blé dur et de maïs

Cultivar de maïs	Cultivar de blé dur	Nombre de fleurs pollinisées	Nombre de nouaisons	Nouaisons (%)	Nombre d'embryons	Embryons/nouaisons (%)	Nombre plantes vertes	Plantes vertes/nouaisons (%)
Guich	Sarif	248	56	22,6 _{ab}	29	51,8 _c	10	17,9
	Isly	168	60	35,7 _b	13	21,7 _b	5	8,3
	Massa	537	86	16,0 _a	7	8,1 _a	2	2,3
	Tensift	62	18	29,0 _{ab}	0	0 _a	0	0,0
Kamla	Sarif	1 294	569	43,9 _c	87	15,3 _c	19	3,3
	Isly	424	242	57,1 _d	17	7 _d	7	2,9
	Massa	1 204	574	39,4 _b	9	1,6 _b	3	0,5
	Tensift	252	120	47,6 _a	2	1,7 _a	0	0,0
Elabdia	Sarif	100	29	29 _a	3	10,3 _b	1	3,4
	Isly	188	82	43,6 _b	3	3,6 _{ab}	2	2,4
	Massa	147	56	38,1 _{ab}	2	3,6 _{ab}	1	1,8
	Tensift	212	56	26,4 _{ab}	0	0 _a	0	0,0
Pool 34	Sarif	276	32	11,6 _a	1	3,1 _a	0	0,0
	Isly	226	104	46,1 _b	5	4,8 _a	2	1,9
	Massa	240	53	22,1 _{ab}	1	1,9 _a	0	0,0
	Tensift	234	38	16,2 _{ab}	0	0 _a	0	0,0

Durum wheat and maize genotypic effects on intergeneric crosses

Tableau 3

Pourcentages moyens d'embryons et de plantes vertes obtenus pour chaque géotype de maïs dans le croisement blé dur x maïs (4 géotypes de blé groupés)

Géotype de maïs	Embryons/nouaisons	Plantes/nouaisons
Guich	22,3	7,7
Kamla	6,4	1,9
Elabdia	4,4	1,8
Pool 34	2,5	0,8

Mean percentages of embryos and plants obtained for each maize genotype in the durum wheat x maize cross (4 wheat genotypes pooled)

Tableau 4

Pourcentages moyens d'embryons et de plantes vertes obtenus pour chaque géotype de blé dans le croisement blé dur x maïs (4 géotypes de maïs groupés)

Géotype de blé	Embryons/nouaisons	Plantes/nouaisons
Sarif	17,5	4,4
Isly	7,8	3,3
Massa	2,5	0,8
Tensift	0,9	0,0

Mean percentages of embryos and plants obtained for each wheat genotype in the durum wheat x maize cross (4 maize genotypes pooled)

le taux de formation d'embryons et de régénérations.

Le pourcentage de plantes vertes obtenues est encore relativement faible, notamment à cause de la petite taille de certains embryons au moment de leur transfert dans les conditions *in vitro*. Les techniques de croisement éloigné éliminent l'obstacle que constitue l'albinisme dans l'haplodiploïdisation chez le blé dur par culture d'anthers ou androgénèse ■

Remerciements

Nous remercions l'Agence universitaire de la Francophonie (AUF, ex-AUPELF) pour le financement de ces recherches dans le cadre d'un projet ARC (action de recherche concertée).

Références

1. Picard E, De Buyser J. High production of embryos in anther culture of pollen derived homozygous spring wheats. *Ann Amel Pl* 1977 ; ??? : 483-8.
2. Chlyah H, Saidi N. Analyse des capacités androgénétiques de *Triticum durum*. In : *L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides*. Paris/Montrouge : AUPELF-UREF/John Libbey Eurotext, 1991 : 135-48.
3. Saidi N, Cherkaoui S, Chlyah A, Chlyah H. Embryo formation and regeneration in *Triticum turgidum* ssp. *durum* anther culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 1997 ; 51 : 27-33.
4. Cherkaoui S, Lamsaouri O, Saidi N, Chlyah AB, Chlyah H. Regeneration of haploid green plants through anther culture in durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) using liquid media. *Actes Inst Agron Vet Hassan II* 1997 ; 17 : 201-8.

5. Chlyah H, Cherkaoui S, Saidi N, *et al.* Green haploid plant production in durum wheat by various haplo-methods. In : Altman A, ed. *Plant biotechnology and in vitro biology in the 21st century. Proceedings of the IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Jerusalem, juin 1998*. Kluwer Academic Publishers, 1999 (sous presse).

6. Mdarhri-Alaoui M, Saidi N, Chlyah A, Chlyah H. Obtention par gynogénèse *in vitro* de plantes haploïdes chlorophylliennes chez le blé dur. *CR Acad Sci Paris (Sciences de la vie)* 1998 ; 321 : 25-30.

7. Barclay IR. High frequency of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. *Nature* 1975 ; 256 : 410-1.

8. Snape JW, Chapman V, Moss J, Blanchard CE, Miller TE. The crossabilities of wheat varieties with *Hordeum bulbosum*. *Heredity* 1979 ; 42 : 291-8.

9. Sitch LA, Snape JW. Factors affecting haploid production in wheat using the *Hordeum bulbosum* system. 1. Genotypic and environmental effects on pollen grain germination, pollen tube growth and the frequency of fertilization. *Euphytica* 1987 ; 36 : 483-96.
10. O'Donoghue LS, Bennett MD. Comparative responses of tetraploid wheats pollinated with *Zea mays* L. and *Hordeum bulbosum* L. *Theor Appl Genet* 1994 ; 87 : 673-80.
11. Laurie DA, Bennett MD. The effect of crossability loci Kr1 and Kr2 on fertilization frequencies in hexaploid wheat x maize crosses. *Theor Appl Genet* 1987 ; 73 : 403-9.
12. Laurie DA, Bennett MD. The production of haploid wheat plants from wheat x maize crosses. *Theor Appl Genet* 1988 ; 76 : 393-7.
13. Sarrafi A, Amrani N, Alibert G. Haploid regeneration from tetraploid wheat using maize pollen. *Genome* 1994 ; 37 : 176-8.
14. O'Donoghue LS, Bennett MD. Durum wheat haploid production using maize wide crossing. *Theor Appl Genet* 1994 ; 89 : 559-66.
15. Saidi N, Chlyah O, Chlyah H. Production of green haploid durum wheat plants by pollination of wheat with maize. *Can J Bot* 1998 ; 76 : 652-6.
16. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of Soybean root cells. *Exp Cell Res* 1968 ; 50 : 151-8.
17. Savaskan C, Ellerbrook C, Fish LS, Snape JW. Doubled haploid production in Turkish durum wheats using crosses with maize. *Plant Breed* 1997 ; 116 : 229-301.

Summary

Doubled haploid plant production in durum wheat through wide crossing with *Hordeum bulbosum* and maize

O. Chlyah, O. Amail, N. Saidi, S. Cherkaoui, O. Lamsaouri, A. Bouchra Chlyah, H. Chlyah

The wide crossing method was used to obtain green haploid durum wheat plants through pollination of wheat by H. bulbosum or maize.

Eight durum wheat genotypes were used to compare the two types of pollination, while ovarian development, embryo formation and haploid green plant formation were also analysed (Table 1). The percentage ovary development was generally higher with H. bulbosum, while embryo formation was similar for two wheat genotypes (Isly, Kyperounda) – all others produced some embryos with maize and very few or none (Jawhar, Acsad 65) with H. bulbosum. Two of the eight durum wheat cultivars studied produced haploid green plants with H. bulbosum and four with maize.

A second experiment was designed to study the genotype effect of each parent in a wheat x maize cross. Four durum wheat genotypes were crossed with four maize genotypes (Table 2). A significant effect of genotype on ovary development was noted, but ovary development was not necessarily related to embryo formation. The genotypic effect of durum wheat on embryo formation was also significant with all maize varieties except one (Pool 34), which showed weak responses. Three wheat genotypes (Sarif, Isly, Massa) formed embryos with all four maize genotypes, and went on to form green plants with three or four maize varieties. One wheat genotype (Tensift) produced embryos only with Kaml, but these did not give rise to green plants.

Maize (Table 3) and wheat (Table 4) genotypes are classified according to their respective embryo and green plant formation performances. The maize cultivar Guich and the wheat cultivar Sarif were found to have the highest potential of all of these intergeneric crosses.

Cahiers Agricultures 1999 ; 8 : 330-3.

Résumé

Haplodiploïdisation chez le blé dur par croisements intergénériques : blé dur x *Hordeum bulbosum* et blé dur x maïs

O. Chlyah, O. Amail, N. Saidi, S. Cherkaoui, O. Lamsaouri, A. Bouchra Chlyah, H. Chlyah

Nous avons obtenu des plantes haploïdes (n = 14) chlorophylliennes chez le blé dur en le pollinisant soit par *H. bulbosum* soit par le maïs. Ces deux types de pollinisation ont été comparés pour 8 génotypes de blé dur. La nouaison est en général supérieure après croisement avec *H. bulbosum* mais la formation d'embryons et de plantes vertes est plus élevée avec le maïs. La pollinisation de 4 génotypes de blé avec 4 variétés de maïs a été étudiée. Trois génotypes de blé ont formé des embryons avec les 4 variétés de maïs et des plantes vertes avec 3 d'entre elles. Les génotypes de blé dur et de maïs ont été classés selon leurs capacités de formation d'embryons et de plantes vertes : le blé Sarif et le maïs Guich se sont révélés les plus performants à cet égard.