

Capacité androgénétique de variétés tunisiennes de blé dur (*Triticum durum* Desf.)

Hajer Slim Amara, Selim Benzaghrou, Philippe Lepoivre

Les haplométhodes permettent d'accélérer les programmes d'amélioration grâce à l'obtention rapide d'individus homozygotes, ce qui réduit le nombre de cycles d'autofécondation nécessaires à la fixation des lignées chez les plantes autogames.

Le blé dur (*Triticum durum* Desf.) est cependant récalcitrant à une application routinière de la culture d'anthères, étant donné les faibles taux d'induction de cals et la proportion élevée de plantes albinos régénérées [1, 2]. La réussite de la culture d'anthères est tributaire d'un certain nombre de facteurs parmi lesquels le génotype [3] et les conditions de culture des plantes donneuses [4] ainsi que la composition des milieux de culture [5].

Ce travail a consisté à évaluer la capacité androgénétique de 6 variétés de blé dur cultivées en Tunisie et à étudier les interactions génotype/milieu de culture.

Matériels et méthodes

Ont été utilisées 2 variétés locales de blé dur (Azizi et Jeneh-Khotifa), 2 variétés introduites (Cham 1, Om Rabia 5) et (Karim et Khiar). Le semis a été effectué

en champ dans la région de Tunis et les épis ont été récoltés lorsque les microspores en étaient au stade uninucléé tardif. Ils ont alors été soumis à un prétraitement au froid à 4 °C pendant 2 jours puis ont été désinfectés par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium à 12 % pendant 5 min suivi de 3 rinçages à l'eau distillée stérile. Les

anthères ont été ensuite prélevées au niveau des 6 premiers épillets de la base de chaque épi et transférées, à raison de 60 anthères par boîte de Pétri, sur 2 milieux d'induction : le milieu I₁ [6] (tableau 1) et le milieu I₂ (milieu I₁ auquel on a ajouté 0,5 mg/l de kinétine et dont le 2,4-D a été remplacé par 100 mg/l de PAA).

Tableau 1

Composition du milieu de culture I₁ (source ICARDA)

Macro-éléments (mg/l) :	
- KNO ₃	1 900,000
- CaCl ₂ , 2H ₂ O	440,000
- MgSO ₄ , 7H ₂ O	370,000
- KH ₂ PO ₄	170,00
- NH ₄ NO ₃	165,000
- FeSO ₄ , 7H ₂ O	27,500
- Na ₂ EDTA	37,300
Micro-éléments (mg/l) :	
- MnSO ₄ , 4H ₂ O	22,300
- AgNO ₃	10,000
- ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8,600
- H ₃ BO ₃	6,200
- KI	0,830
- Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,250
- CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025
Suppléments organiques (mg/l) :	
- glutamine	750,000
- hydrolysate de caséine	500,000
- myo-inositol	100,000
- acide ascorbique	0,400
- biotine	0,400
- acide nicotinique	0,400
- pyridoxine HCl	0,400
Autres composés (g/l) :	
- saccharose	85,500
- agar	6,000
- pH	5,800

Composition of the I₁ culture medium

H. Slim Amara : Département des sciences de la production végétale, Institut national agronomique de Tunisie, 43, avenue Charles-Nicollé, 1082 Tunis Mahrajene, Tunisie.

S. Benzaghrou, P. Lepoivre : Unité de phytopathologie, Faculté universitaire des Sciences agronomiques, 2, passage des Déportés, 5030 Gembloux, Belgique.

Tirés à part : H. Slim Amara

Summary

Androgenic ability of Tunisian durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars

H. Slim Amara, S. Benzaghoul, P. Lepoivre

Haploids derived from microspores by anther culture have a considerable breeding potential as this strategy speeds up crop improvement. However, durum wheat (Triticum durum Desf.) remains recalcitrant because of the low frequency of embryo production and low yield of regenerated plants, which are mostly albinos.

Six durum wheat cultivars (Triticum durum Desf.) were evaluated in anther culture on two different media for their ability to initiate calli and regenerate green plants. A cytological analysis of microspore development during in vitro culture was also carried out. Two induction media were compared in the experiment: I1 medium from ICARDA, currently used for wheat genotypes originating from dry areas of West Asia and North Africa (WANA) (Table 1), and I2 which differs from the first medium by the addition of 0.5 mg/l kinetin and 100 mg/l PAA.

In durum wheat, uninucleate microspore development occurs via two different spore division pathways: dominant symmetrical division (B pathway) (Figure 1 A, B) and asymmetrical division (A pathway) (Figure 2 A, B) which was found to be less frequent. These divisions led to microstructures exhibiting callus character or produced embryoid microstructures (Figures 3 and 4). A morphological analysis of microspore development showed that androgenesis pathways in durum wheat are similar to those described in triticale and common wheat.

This work highlighted significant genotype and medium effects for all parameters studied (Tables 2 and 3). There were significant differences in the frequencies of callus induction and/or green plant regeneration between different cultivars and media. The callus initiation frequency ranged from 1.6% for cv Khiair to 2.1% for cv Jeneh-Khotifa on I2 medium. The green plant regeneration frequency ranged from 55.8% for cv Om Rabia to 83.1% for cv Azizi. Khiair, Azizi and Jeneh-Khotifa were more responsive than the other cultivars.

Cahiers Agricultures 1999 ; 8 : 334-8.

Pour chaque variété, 1 800 anthères par milieu ont été mises en culture dans l'obscurité à 31 °C pendant 21 à 40 jours. Les structures induites (cals ou embryoides) ont été dénombrées, transférées sur un milieu de régénération RW [6] et maintenues à une température de 25 °C, avec une photopériode de 16 h de lumière.

Une analyse statistique a été réalisée à l'aide du programme informatique MSTATC et le test de Newman et Keuls a été utilisé pour la comparaison des moyennes (ppds à 5 %).

Résultats

Analyse cytologique des microspores

Les premières divisions des microspores ont été observées 15 jours après la mise

en incubation des anthères. La plupart des microspores uninucléées ont montré une première division de type symétrique qui a généré deux noyaux fils identiques de grande taille et possédant une chromatine diffuse. Ce type de division s'est poursuivi en donnant des structures pluricellulaires possédant 6 noyaux, 8 noyaux ou plus (figure 1), ce qui est similaire aux résultats obtenus par la voie B décrite par Schumann [7].

Un autre type de division (appelée A par Sunderland et Dunwell [8]), a été observé à une fréquence plus faible, en conformité avec le développement normal des grains de pollen. Dans ce cas, le noyau de la microspore se divise pour en former un premier de type végétatif et un second de type génératif. Le premier se divise ensuite mais le second reste généralement latent pour donner une structure multicellulaire (figure 2). Ces divisions aboutissent à la formation de microstructures callogènes ou embryoides. Les microstructures callogènes sont de couleur clai-

re, les cellules sont grandes, disposées de manière lâche et possèdent de grandes vacuoles (figure 3). Le caractère embryogène se manifeste par la formation de structures multicellulaires (plus de 16 cellules) dans lesquelles les cellules diminuent progressivement avec un cytoplasme dense et des vacuoles de petite taille. Ces structures cellulaires se transforment ensuite en proembryoïdes, une fois libérées de l'exine (figure 4).

Capacité androgénétique des variétés étudiées

L'analyse de la variance des paramètres androgénétiques étudiés est résumée dans le tableau 2. Les effets des génotypes, des milieux et de l'interaction génotype/milieu sont hautement significatifs. Les 2 variétés locales (Azizi et Jeneh-Khotifa) ont fourni un pourcentage d'anthères avec des structures callogènes ou embryogènes (respectivement 1,4 et 1,81 % pour le milieu I₁ et 1,99 et 2,13 % pour le milieu I₂), suivies par la variété à haut rendement Khiair (respectivement 1,39 et 1,66 % pour les milieux I₁ et I₂) et les variétés Cham 1 et Karim (tableau 3). La variété Jeneh-Khotifa montre un pourcentage de régénération élevé quel que soit le milieu d'induction initial (de 70,2 % pour le milieu I₁ à 71,5 % pour le milieu I₂). La variété Azizi, sur milieu d'induction I₂, présente le pourcentage de régénération le plus élevé (72 %), avec une proportion de plantules vertes régénérées proche ou supérieure à 50 %. Les variétés Azizi, Jeneh-Khotifa, Khiair et Cham 1 donnent plus de 60 à 80 % de plantes vertes parmi les individus régénérés tandis que les variétés Om Rabia 5 et Karim possèdent les plus faibles aptitudes à la régénération.

Discussion

L'originalité de ces résultats réside dans la forte proportion de plantes vertes régénérées alors que l'albinisme des plantules est habituellement présenté comme un facteur limitant l'androgénèse chez le blé dur [1]. Les variétés traditionnelles (Azizi et Jeneh-Khotifa) ont les meilleures aptitudes androgénétiques, suivies des variétés Khiair et Cham 1, alors que cette dernière avait présenté une faible aptitude androgénétique [4]. Il faut noter à cet égard que les conditions

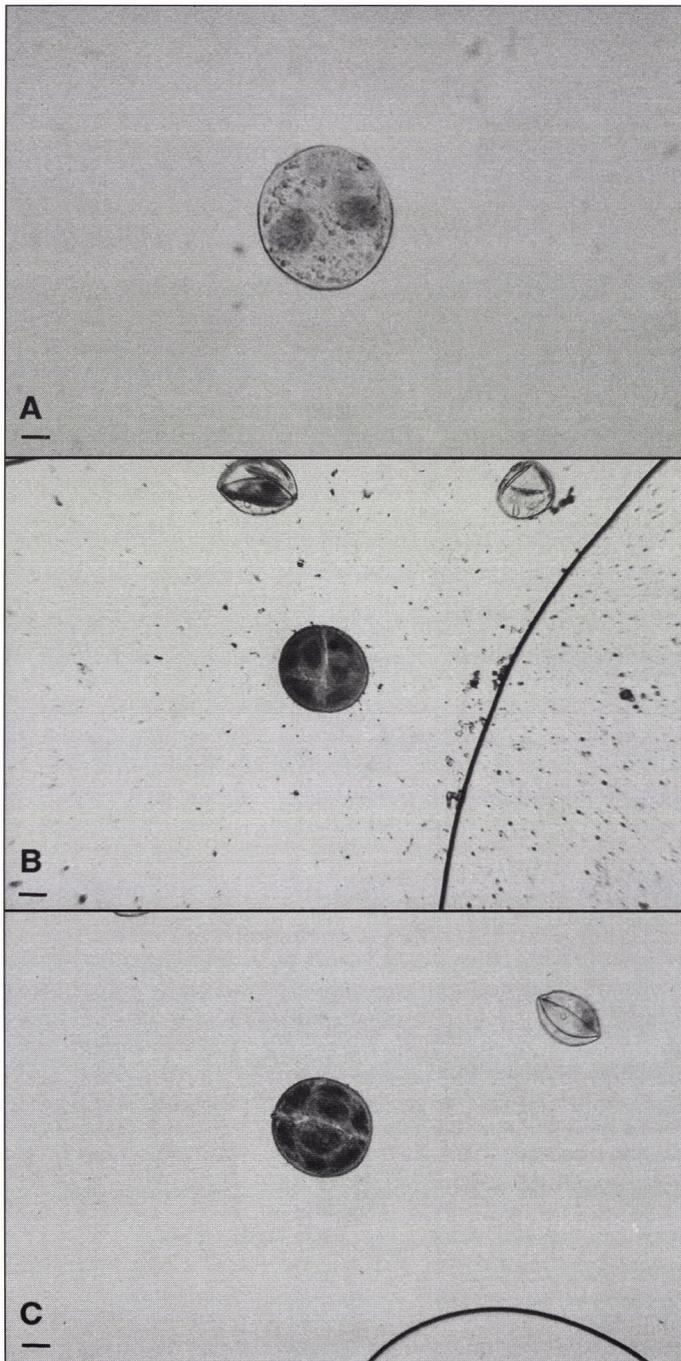


Figure 1. (Ci-contre) Division symétrique d'une microspore uninucléée de blé dur (voie B). A : cellule binucléée. B : structure pluricellulaire possédant 6 noyaux. C : structure pluricellulaire possédant 8 noyaux. Barre : 10 μm .

Figure 1. (Left) Symmetrical division of a uninucleate durum wheat microspore (B pathway). A: binucleate cell. B: multicellular structure with six nuclei. C: multicellular structure with eight nuclei. Bar: 10 μm .

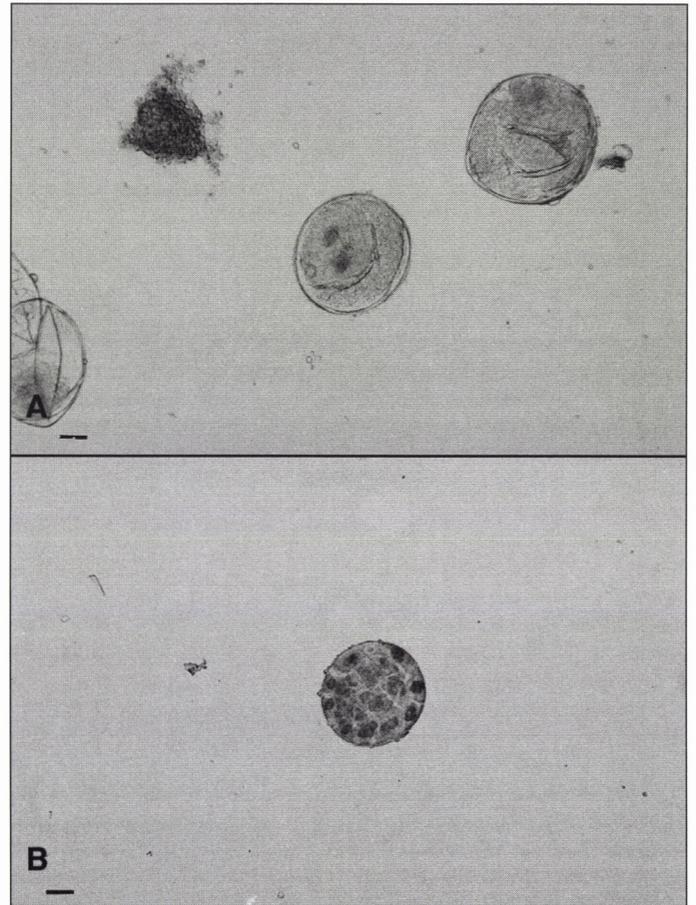


Figure 2. (Ci-dessus) asymétrique d'une microspore de blé dur (voie A). A : cellule possédant un noyau végétatif et un noyau génératif. B : structure multicellulaire de la microspore. Barre : 10 μm .

Figure 2. (Above) Asymmetrical division of a durum wheat microspore (A pathway). A: cell with a vegetative and a generative nucleus. B: multicellular microspore structure. Bar: 10 μm .

de culture des plantes donneuses des anthères influence fortement le rendement de l'androgénèse, les meilleurs résultats étant obtenus, pour le blé tendre, avec des plantes cultivées en

plein champ [9], puis avec celles cultivées en serres conditionnées et, enfin, avec celles issues de chambres de culture. Les observations microscopiques ont montré que le développement des micro-

spores de blé dur était globalement identique à ce qui a été rapporté pour le triticale [7, 8] et le blé tendre [10]. La voie dominante (B) aboutit à la formation de deux noyaux fils identiques contraire-

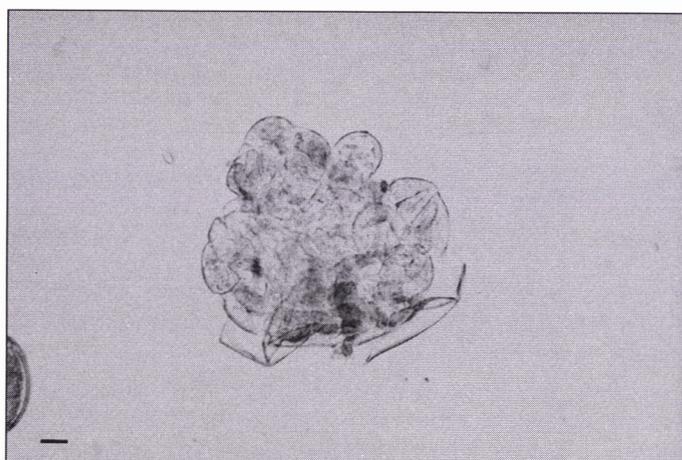


Figure 3. Microstructure de blé dur possédant un caractère callogène. Barre : 50 μm .

Figure 3. Microstructure of durum wheat with callogenic potential. Bar : 50 μm .

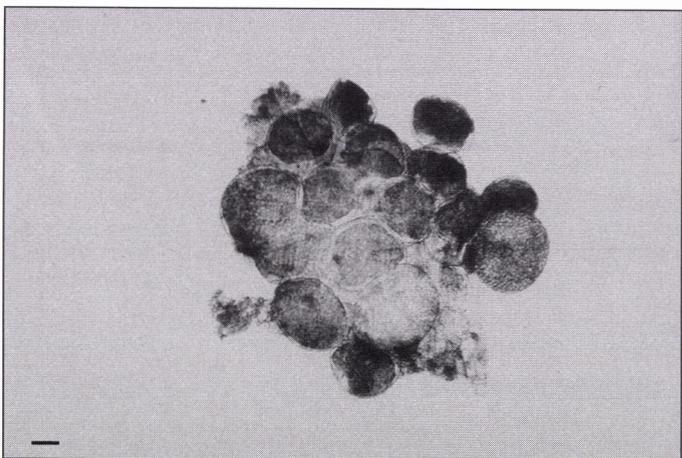


Figure 4. Microstructure de blé dur possédant un caractère embryogène. Barre : 50 μm .

Figure 4. Microstructure of durum wheat with embryogenic potential. Bar : 50 μm .

ment à la voie A (comparable au développement normal des grains de pollen). La performance du milieu d'induction I₂ est fonction de la variété alors que le milieu I₁ présente un niveau de performance constant pour les 6 génotypes. Chez les cultivars Azizi et Jeneh-Khotifa, l'addition de kinétine et le remplacement du 2,4-D par le PAA ont amélioré d'une façon significative tous les paramètres androgénétiques mesurés, y compris ceux relatifs aux étapes de régénération sur le milieu suivant. Ces deux régulateurs de croissance ont déjà été rapportés pour stimuler la néoformation de structures multicellulaires chez le blé tendre et chez l'orge [5, 11].

Ce travail sur le blé dur a montré un effet génotype et un effet milieu d'induction hautement significatifs pour tous les paramètres étudiés qui conditionnent le rendement global de l'androgénèse (aptitude à l'induction de cals, à la régénération et à celle de plantules chlorophylliennes). De tels résultats ont déjà été démontrés pour le blé tendre [12, 13].

La culture d'anthers *in vitro* est globalement une méthode attrayante pour le blé car elle offre un potentiel de production de plantes haploïdes par fleur supérieur à celui de la gynogénèse ou des croisements interspécifiques [14].

Les résultats obtenus avec les variétés tunisiennes de blé dur montrent les réelles possibilités de cette technique qui permet la régénération d'un nombre significatif de plantes ■

Ces recherches ont été réalisées dans le cadre d'une action concertée (ARC) soutenu par l'Agence universitaire de la Francophonie.

Tableau 2

Valeurs des carrés moyens issues de l'analyse de la variance des paramètres androgénétiques

	% EA*	% CR	% PV
Génotypes	0,516**	228,690**	556,080**
Traitements	0,925**	465,480**	851,660**
Génotypes x traitements	0,041**	25,670**	19,470**
Erreur	0,013	0,780	0,734
CV (%)	7,500	1,390	0,510

* % AE : pourcentage d'anthers callogènes ou embryogènes ; % CR : pourcentage de cals pouvant être régénérés ; % PV : pourcentage de plantules vertes régénérées.

** Significatif au seuil 1 %.

Mean squares from the variance analysis of androgenic parameters

Références

- Saidi N, Cherkaoui S, Chlyah A, Chlyah H. Embryo formation and regeneration in *Triticum turgidum* ssp. *durum* anther culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 1997 ; 51 : 27-33.
- Fouroughi-Wehr B, Zeller FJ. *In vitro* microspore reaction of different German wheat cultivars. *Theor Appl Genet* 1990 ; 79 : 77-80.
- Andersen SB, Due IK, Olesen A. The response of anther culture in a genetically wide material of winter wheat (*T. aestivum*). *Plant Breed* 1987 ; 99 : 181-6.
- Ghaemi A, Sarafi A, Alibert G. Influence of genotype and culture conditions on the production of embryos from anthers of tetraploid wheat (*Triticum turgidum*). *Euphytica* 1993 ; 65 : 81-5.
- Ziauddin A, Marolais A, Simion E, Kasha KJ. Improved plant regeneration from wheat anther and barley microspore culture using PAA. *Plant Cell Rep* 1992 ; 11 : 489-98.

Tableau 3

Performances des géotypes de blé dur pour leur capacité androgénétique

Variétés	% AE*		% CR		% PV	
	Milieu I ₁	Milieu I ₂	Milieu I ₁	Milieu I ₂	Milieu I ₁	Milieu I ₂
Azizi	1,40 _{EF} **	1,99 _{AB}	60,17 _A	72,00 _A	70,27 _C	83,10 _C
Jeneh-Khotifa	1,81 _{BC}	2,13 _A	70,27 _{AB}	71,56 _{AB}	65,27 _E	75,57 _B
Karim	1,06 _G	1,41 _{EF}	46,83 _H	58,77 _{FG}	45,30 _J	60,17 _G
Khiar	1,39 _{EF}	1,66 _{CD}	64,30 _E	69,04 _C	60,33 _G	68,03 _D
Om Rabia 5	1,20 _G	1,58 _{DE}	58,17 _G	64,59 _E	50,33 _I	55,83 _H
Cham 1	1,20 _G	1,25 _{FG}	59,90 _F	66,82 _D	55,33 _H	62,33 _F

* % AE : pourcentage d'anthers callogènes ou embryogènes ; % CR : pourcentage de cals régénérables ; % PV : pourcentage de plantules vertes parmi les plantules régénérées.

** Les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil 5 %.

Androgenic performances of durum wheat genotypes

6. Lashermes P, Engin G, Ortiz Ferrara G. Anther culture of wheat (*Triticum aestivum*) adapted to dry areas of Asia and North Africa. *J Genet Breed* 1991 ; 45 : 33-8.

7. Schumann G. Zytologisch-histologische Untersuchungen in Triticale-Antherenkulturen. *Arch Züchtungsforsch* 1987 ; 17 : 17-25.

8. Sunderland N, Dunwell JM. Pathways in pollen embryogenesis. In : Street HE, ed. *Tissue culture and plant science*. New York/Londres : Academic Press, 1974 : 141-67.

9. Hoffmann B, Krüger HU, Schumann G. *In vitro* androgenesis in wheat (*T. aestivum* L.). I. Effects of donor plant genotype on the development of pollen derived macrostructures and plantlets. *Arch Züchtungsforsch* 1991 ; 21 : 153-9.

10. Kuramae EF. *Effect of maltose in culture medium on microspore development in anthers of wheat* (*Triticum aestivum* L.) cv « Sabine ».

Mémoire, Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux, 1991 ; 69 p.

11. Kasha KJ, Yao Q, Simion E, Hu T, Oro R. Production and application of doubled haploids in crops. In : *Induced mutation and molecular technics for crops improvement*. IAEA-SM Proceedings. 1995 : 23-37.

12. Picard E, De Buyser J. High production of embryoids in anther culture of pollen derived homozygous spring wheats. *Ann Amélior Plant* 1977 ; 27 : 483-8.

13. Bullock WP, Baenziger PS, Schaeffer GW, Bottino PJ. Anther culture of wheat (*T. aestivum* L.). F1's and their reciprocal. *Theor Appl Genet* 1982 ; 62 : 155-9.

14. Picard E, Crambes E, Cong-She L, Mihamou-Ziyyat A. Évolution des méthodes d'haplodiploïdisation et perspectives pour l'amélioration des plantes. *CR Soc Biol* 1993 ; 188 : 109-41.

Résumé

Capacité androgénétique de variétés tunisiennes de blé dur (*Triticum durum* Desf.)

H. Slim Amara, S. Benzaghrou, P. Lepoivre

Le blé dur (*Triticum durum* Desf.) est récalcitrant à la culture d'anthers *in vitro* étant donné le taux élevé de plantes albinos régénérées.

La capacité androgénétique de six variétés de ce blé a été analysée sur la base du développement cytologique des microspores durant la phase d'induction *in vitro*. Deux milieux de culture ont été utilisés : le milieu I₁ (mis au point à l'ICARDA) pour des variétés de blé tendre et le milieu I₂ modifié par l'apport de 0,5 mg/l de kinétine et 100 mg/l de PAA. Les observations microscopiques du développement des microspores chez le blé dur ont montré que ces dernières suivaient deux voies de divisions différentes : une de division symétrique (B) dominante et une de division asymétrique (A) chez un faible nombre de microspores. Elles aboutissent à la formation de microstructures à caractère callogène ou embryogène.

On observe une grande variabilité de la réponse à l'androgenèse parmi les six géotypes de blé dur étudiés en fonction du milieu d'induction (production de cals allant de 1,6 % pour la variété Khiar à 2,1 % pour la variété Jeneh-Khotifa sur le milieu I₂). Le pourcentage de plantules vertes régénérées à partir des structures pluricellulaires ainsi induites a varié de 55,8 % pour la variété Om Rabia à 83,1 % pour la variété Azizi.