

HAPLOMETHODES (CMI), BLE ET SECURITE ALIMENTAIRE

**Zelikha LABBANI^{1*} Jacques DE BUYSER² et
Emmanuel PICARD²**

**¹Département de Biologie végétale, Faculté des
Sciences de
la Nature et de la Vie, Université Mentouri
Constantine. Route Ain El Bey 25000 Constantine, Algérie.**

**²Laboratoire MVEH, Bâtiment 360, Université de
Paris Sud XI, 91405 Orsay Cedex, France.**

Résumé

Depuis l'indépendance (en 1962), les différentes politiques et interventions de l'Etat dans le secteur agricole avaient pour but d'améliorer le niveau de la production agricole et en particulier celle du blé dur pour y arriver à une autosuffisance alimentaire. De nos jours, la production de blé dur ne couvre que 40% des besoins. L'objectif est donc de combler un déficit de 60% de la consommation nationale. La faiblesse de la production de blé dur en Algérie découle en majeure partie des faibles rendements (14 quintaux à l'hectare). Il est donc impératif d'accroître les rendements à l'hectare, c'est pourquoi il apparaît plus judicieux de développer de nouvelles variétés au meilleur rendement. Cet objectif ne sera concrétisé que si les orientations actuelles en matière de création et de sélection variétale changent, et si les méthodes d'obtention de nouvelles variétés sont bien maîtrisées et menées dans le cadre d'une stratégie répondant aux préoccupations et aux besoins d'une sécurité alimentaire. Les méthodes d'améliorations variétales classiques sont relativement longues. La culture in vitro par la méthode d'haplodiploïdisation permet de contourner ces difficultés. Elle permet une fixation rapide du matériel génétique recherché par le sélectionneur. Les méthodes de sélection classiques peuvent désormais être complétées par un certain

nombre de nouvelles techniques puissantes, l'intégration des diverses solutions biotechnologiques dans les programmes d'amélioration n'est plus à justifier. Ces nouveaux outils offrent de nouvelles opportunités pour résoudre les problèmes agricoles là où les techniques traditionnelles ont échoué. Plus particulièrement, la maîtrise des méthodes conduisant à l'obtention des plantes haploïdes doublées chez le blé dur (*Triticum turgidum* subsp. durum (Desf) Husn.) est un objectif d'une importance capitale pour l'Etat algérien en vue de l'amélioration variétale de cette espèce.

Nous apportons dans ce travail notre contribution à l'optimisation de l'une des méthodes de production d'haploïdes *in vitro*, la méthode de culture *in vitro* de microspores isolées (CMI) chez le blé dur. Le cœur de notre travail est de faire connaître les résultats obtenus chez le blé dur grâce à une des méthodes d'obtention des haploïdes doublés, la CMI. Chez cette céréale, la première difficulté est d'obtenir ces plantes car le phénomène est rare. Des études menées au laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale Haploïde (MVEH), Orsay, France ont abouti à la mise au point de méthodes de cultures de microspores isolées assurant une production élevée d'embryons et un taux significatif de régénération à partir de ces embryons. Nous avons utilisé la variabilité génétique de l'espèce en ce qui concerne le comportement de ses microspores *in vitro* et leurs aptitude à donner des plantes «haploïdes».

Mots clés: CMI, *Triticum turgidum* subsp. durum (Desf.) Husn., Sécurité alimentaire, Prétraitements, Induction androgénétique, Régénération chlorophyllienne *in vitro*, Albinisme.

ملخص:

من خلال دراستنا يمكننا القول بان تشكل جنيني لم يعد عائقا أمام استخدام زراعة الابواغ المعزولة عند القمح الصلب. إذ أظهرت الدراسة التي قمنا بها الحصول على أجنة بنفس نوعية الأجنة المتحصل عليها بعد أنتاش الحبوب, هذه الأخيرة كانت مستحيلة عند القمح الصلب الذي يتميز بالاستجابة الضعيفة سواء بالنسبة لتشكيل الأجنة أو الحصول على نباتات خضراء.

عدة معاملات أولية أجريت على أصناف من القمح الصلب ومن بين هؤلاء نجد مانيتول M 0,3 (7 أيام) والمعاملة الأولية بالبرودة (4م0 في الظلام) من أحسن المعامل التي أعطت نتائج لم يتحصل عليها إطلاقا عند القمح الصلب. حيث تحصلنا تحت المعامل الأولي بالبرودة (5 أسابيع) على مجموع 5300 جنين من بين 2470000 أبواغ الصنفين معا (1Cham وKJ) منها 1850 أنقلت على وسط خاص بإنتاج النباتات (OMS) إذ أنتجت 89 نباتات خضراء أي 9 نباتات خضراء لكل 100 مئبر (الصنفين معا). من جهته فان المانيتول 3,M 0 (7 أيام تحت درجة حرارة 4م0 في الظلام) أعطى بالنسبة للصنف 2,3 KJ % من الإنتاج للنباتات الخضراء أي بمعدل 9 نباتات خضراء لكل 100 أبواغ. تجدر الإشارة هنا إلى نتائج أصلية لم يسبق الحصول عليها عند القمح الصلب إلى وهي إنتاج نباتات خضراء من خلال أجنة مسنة وضعت اصطناعيا في وسط منتج للنباتات.

الكلمات الأساسية، *Triticum turgidum subsp. durum* (Desf.) Husn.

زراعة الأبواغ المعزولة، معاملة أولية، مانيتول، معاملة أولية بالبرودة، تحريض التشكل الجنيني الذكري، تشكل جنيني، إنتاج نباتات خضراء، إنتاج نباتات خضراء، عديم الكلوروفيل

Introduction

En Algérie la production agricole est faible et ne couvre pas les besoins alimentaires de la population. Pour le blé qui constitue l'aliment de base, sa production nationale est faible: 1,3 millions de tonnes. Le rendement moyen est de 14 quintaux à l'hectare (blé dur ou blé tendre, d'après la FAO, statistiques 2004), production qui couvre 40% des besoins nationaux. Il en découle des importations massives: 1,7 millions de tonnes pour couvrir un déficit de 60%. Il est utile de rappeler que pour l'année (2005), l'Etat a mobilisé une enveloppe de 1,5 milliards de dollars pour couvrir la totalité des besoins domestiques en blé (les deux espèces confondues) dont 500 millions de dollars sont consacrées uniquement pour couvrir les importations du blé français (les

deux espèces confondues): ce qui représente le tiers des importations totales en blé. Pour ce dernier, l'Algérie est devenue le premier importateur dans le monde. Pour faire face à ces défis concurrentiels, mais aussi à d'autres évolutions (restructuration à venir des outils de production et modifications des techniques de production, nécessité de développer des nouvelles variétés.

L'enjeu pour une agriculture du blé dur est d'arriver à l'autosuffisance alimentaire pour une sécurité alimentaire de la population. Il est donc impératif d'accroître les rendements à l'hectare, car il n'est plus possible d'étendre les superficies consacrées aux céréales. Au contraire, ces superficies sont menacées par l'avancée du béton armé et peuvent être diminuées dans un futur prochain par l'accroissement démographique de la population et son besoin en urbanisme.

Les méthodes d'améliorations variétales classiques sont relativement longues. La culture in vitro par la méthode d'haplodiploïdisation permet une fixation rapide du matériel génétique recherché par le sélectionneur. Ceci apporte un gain de temps considérable dans le processus de sélection. Il suffit après l'obtention des plantes haploïdes de doubler leurs chromosomes et d'obtenir ainsi, en une étape de lignées complètement homozygotes (pures), l'équivalent de plus de dix années d'autofécondation. La maîtrise des méthodes conduisant à l'obtention des plantes haploïdes doublées chez le blé dur est un objectif d'une importance capitale pour l'Etat algérien en vue de l'amélioration variétale de cette espèce.

La production des plantes haploïdes doublées est devenue la méthode de choix dans la sélection des génotypes intéressants recherchés en agronomie. De nos jours la CMI est couramment utilisée dans les programmes d'améliorations des plantes comme le colza, le tabac, le blé tendre et l'orge. Chez le blé dur la méthode de la CMI est en amélioration continue afin d'augmenter le nombre de plantes vertes régénérées

L'haplodiploïdisation a en effet été considérée comme une des biotechnologies susceptibles d'apporter une contribution très significative à l'amélioration des plantes.

Matériel et méthodes

Cette étude a été menée sur des variétés de blé dur (*Triticum turgidum* subsp. *durum* (Desf.) Husn.), tétraploïde ($2n = 4x = 28$, AABB), et une variété de blé tendre de printemps (*Triticum aestivum* subsp. *aestivum*) hexaploïde ($2n=6x=42$, AABBDD), Pavon 76 dans la mesure où jusqu'à présent aucun génotype de l'espèce *T. durum* ne pourrait servir de modèle.

Les plantes mères ont été cultivées dans une chambre climatisée de type Strader, réglée à la température jour/nuit 20/15°C avec une photopériode de 16 heures et une intensité lumineuse de 1150 μ E.m-2.s-1. L'humidité relative y a été maintenue à 70% \pm 5. Les talles ont été prélevées lorsque la majorité des microspores étaient au stade uninucléé tardif et ont subi par la suite les prétraitements.

Le protocole d'isolement des microspores ici est celui décrit par De Buyser et al., 2002 sauf pour les prétraitements. Avant l'isolement des microspores, les épis ont été désinfectés par une solution d'hypochlorite de calcium à 4%. Après broyage des épillets, filtration et centrifugation, reprise du culot et deuxième centrifugation, les microspores extraites ont été cultivées dans le milieu d'induction liquide CHB3 (CHU additionné de 90 g/l de maltose) (Chu et al., 1990), dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre à raison de 1,5 ml par boîte et co-cultivées avec 5 à 10 ovaires par boîte de Pétri.

Après la phase d'incubation dans une enceinte de culture régulée à 27°C, les embryons formés ont été comptés puis transférés sur le milieu de régénération solide de Murashige et Skoog, 1962 sans hormones (MS0). Suivant toujours le même protocole de De Buyser et al., 2002, après 3 semaines de culture des embryons sur le milieu de régénération, les plantes vertes et albina ayant développé un

systeme racinaire ainsi que les structures non régénérées en plantes ont été dénombrées.

Un test z de comparaison de pourcentages utilisant la formule ci dessous, a été effectué sur les résultats androgénétiques

Soient N1 et N2 les effectifs des deux échantillons indépendants. P1 et P2 les proportions ou pourcentages observés dans chacun des 2 échantillons à comparer. On calcule la statistique z par la formule indiquée ci-dessous. Pour appliquer la statistique z il faut que les deux échantillons respectent la règle suivante: les valeurs de NP et N (1-P) doivent être supérieures ou égales à 5.

$$Z = \frac{|P_1 - P_2|}{\sqrt{\frac{P(1-P)}{N_1} + \frac{P(1-P)}{N_2}}}$$

Et pour P dont la formule est la suivante

$$P = \frac{N_1P_1 + N_2P_2}{N_1 + N_2}$$

Une analyse de variance a été appliquée pour les résultats de l'androgenèse in vitro. Les données recueillies étant calculées sous forme de pourcentages, ceux-ci ont été transformés en arc sin \sqrt{p} .

L'effet variétal, l'effet des prétraitements ainsi que l'effet d'une interaction variété- prétraitement ont été comparés par le test F.

Résultats et discussion

Les différentes étapes de la CMI sont portées en Figure 1.

Le meilleur taux d'embryogenèse a été observée avec 7 jours de prétraitement au mannitol 0,3M. Ainsi un total de 13 475 embryons androgénétiques a été obtenu à partir de 2 693 500 microspores, dont 3 673 ont été repiqués et ont donné 85 plantes chlorophylliennes (Figure 2). En moyenne sur 100 embryons transférés sur le milieu de régénération MS0, deux ont été convertis en plantes vertes. Le rapport plantes vertes/plantes albina était de 0,1. Ce dernier était le meilleur ratio obtenu chez ce cultivar de blé dur.

Un autre résultat intéressant (Figure 3) et original de cette étude est la régénération des plantes chlorophylliennes à partir d'embryons âgés après ce même prétraitement au mannitol 0,3M (7 jours). La fréquence de régénération en plantes vertes est en effet passée de 1,45 pour des embryons âgés de 1 mois et 8 jours (38 jours), à 2,87 et 3,83 pour ceux qui sont âgés d'1 mois et 14 jours (44 jours) et d'1 mois et 25 jours (55 jours) respectivement. Un tel résultat n'a jamais été obtenu en androgenèse in vitro chez le genre *Triticum*. D'habitude la totalité des régénérations en plantes est obtenue à partir de 28 à 35 jours de culture des embryons. Au-delà de cette phase, les embryons restant n'ont aucune aptitude (ou très rarement) à se convertir en plantes que ce soit chlorophylliennes, albina, chimériques, anthocyaniques ou autres.

Le blé dur (*Triticum turgidum* subsp. *durum* (Desf.) Husn.) est sans nul doute l'une des espèces cultivées de la famille des Poacées les plus récalcitrantes à l'androgenèse in vitro.

Le succès de l'androgenèse in vitro dépend en première mondiale des prétraitements appliqués aux

inflorescences avant l'extraction des microspores. Plusieurs prétraitements appelés aussi "stress" ont été développés pour réorienter le programme gamétophytique vers un programme sporophytique (Touraev et al., 1997). Ce processus peut alors être induit par plusieurs approches: par un gamétocide (Picard et al., 1987), prétraitements thermiques Picard et De-Buyser (1975), choc osmotique (Hu et Kasha, 1999).

L'effet positif d'un prétraitement thermique de longue durée a été mis en évidence au laboratoire MVEH, d'Orsay (Figure 4). Le prétraitement au froid a permis non seulement d'améliorer l'embryogenèse, les résultats obtenus étaient très significatifs (Tableau 1); mais aussi, pour la première fois, d'obtenir des quantités relativement importantes de plantes chlorophylliennes (Labrani et al., 2005, 2006).

Une analyse de variance des résultats de culture in vitro de microspores isolées correspondantes a montré une différence hautement significative au seuil α de 5%. Les résultats ainsi acquis au laboratoire MVEH d'Orsay, montrent qu'il est possible d'obtenir chez l'espèce blé dur des haploïdes doublés d'origine androgénétique par la méthode de culture in vitro de microspores isolées.

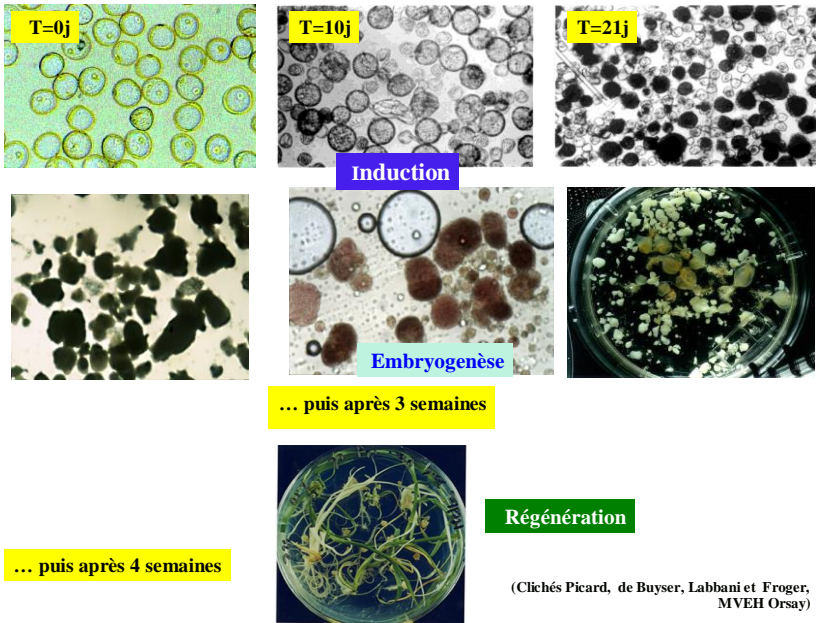


Figure 1: Le processus d'haplodiploïdisation *in vitro*: cas du *turgidum subsp. durum* (Desf.) Husn

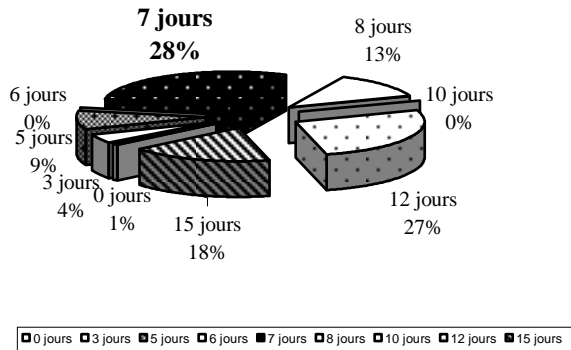


Figure 2: Effet de la durée du mannitol 0,3M sur la Régénération chlorophyllienne en CMI: cas du cv.JK

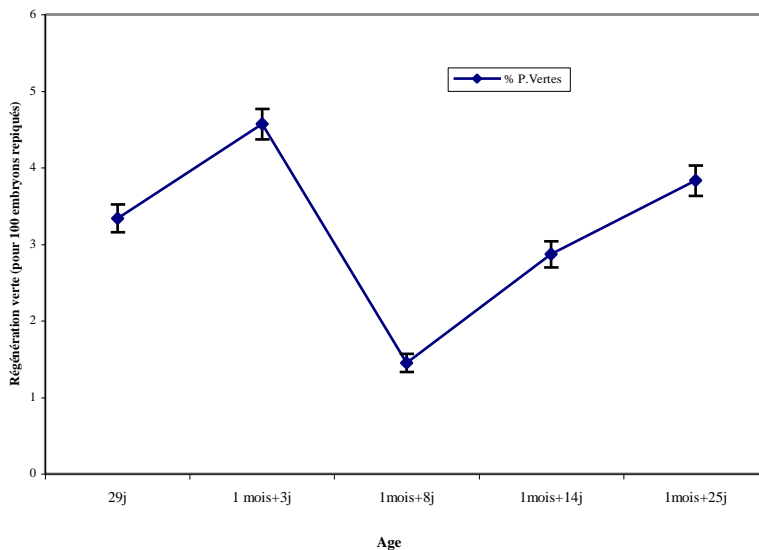


Figure 3: Age d'embryons et l'effet du mannitol en culture de microspores isolées chez le blé dur cv.JK

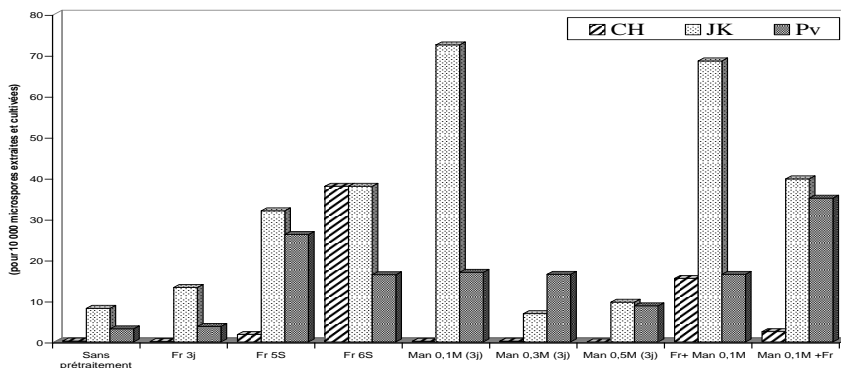


Figure 4: Effet de différents prétraitements sur l'embryogenèse en culture *in vitro* de la CMI chez des cultivars de blé dur (pour 10 000 microspores extraites et cultivées)

Tableau 1: Analyse de variance à deux facteurs au seuil de signification de 5% et 1% pour l'embryogenèse *in vitro*. Effet des prétraitements.

Source des variations	ddl	SC	CM	F observé	F théorique ou (critique)	
					5%	1%
Variétés	2	0,014	0,007	23,8	3,09	4,8
Prétraitements	7	0,031	0,0045	15,2	2,1	2,8
Variétés x Prétraitements	14	0,062	0,0044	14,9	1,8	2,3
Erreur	96	0,028	0,0003			
Total	119	0,136				

ddl: degré de liberté ; SC: somme des carrés ; CM: moyenne des carrés

Conclusion

Nos résultats montrent que la fréquence des plantes albina peut être réduite par l'action des prétraitements. La procédure développée ici, pour la culture de microspores isolées chez le blé dur nous a permis d'obtenir avec succès des embryons et des plantes chlorophylliennes. Ainsi, en ajustant les prétraitements, on devrait pouvoir modifier significativement la réponse des microspores, optimiser le nombre d'embryons produits et par la suite augmenter le nombre de plantes haploïdes chlorophylliennes.

Références Bibliographiques

De-Buyser J, Touraine P, J'Aïti F, Haïcour R, Picard E. 2002. Haplodiploïdisation par culture de microspores isolées de blé in vitro. In: Tec Doc, Biotechnologies

végétales techniques de laboratoire. Lavoisier, Londres, Paris, New York, 257-273.

Chu CC, Hill RD, Brule-Babel AL. 1990. High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. On monosaccharide containing

media. *Plant Science* 66: 255-262.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Touraev A, Vicente O, Heberle-Bors E. 1997. Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci Rev* 2(8): 297-302.

Picard E, Hours C, Gregoire S, Phan TH, Meunier JP. 1987. Significant improvement of androgenetic haploid and doubled-haploid induction from wheat plants treated with a chemical hybridization agent. *Theor. Appl. Genet* 74: 289-297.

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 Sc Paris, série D*, 281: 127-130.

Hu T, Kasha KJ. 1999. A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. *Genome* 42: 432-441.

Labbani Z, Richard N, de Buyser J, Picard E. 2005. Plantes chlorophylliennes de blé dur obtenues par culture de microspores isolées: importance de prétraitements.

Comptes Rendus Biologies 328: 713-723.

Labbani Z, de Buyser J, Picard E. 2006. Relation entre le Mannitol et la régénération chlorophyllienne en culture in vitro de microspores isolées chez le blé dur.

Proceeding Xèmes Journées Scientifiques de l'AUF Constantine Algérie du 8 au 11 mai 2006. pp 25-26.

المحور الخامس:

الأمن الغذائي والرهانات الحيوية

