

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahlab « Blida 1 »
Faculté des sciences de la nature et de la vie



En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Spécialité : Biotechnologie végétale

Thème

L'utilisation des haplo méthodes pour l'accélération du processus de sélection
de quelques lignes de blé tendre.

Présenté par :

HENNAOUI Keltoum & SAIDI Fatma

Devant le jury composé de :

SNOUSSI SA.	Professeur	Université Blida 1	Président
BENMOUSSA M.	Professeur	Université Blida 1	Examineur
KEBOUR D.	Professeur	Université Blida 1	Promotrice
SEMIANI Y.	Docteur	INRAA	Co-Promotrice.

Année universitaire : 2019 – 2020.

Remerciements

Au terme de ce modeste travail, on tient à exprimer notre gratitude et remerciements à :

Nous remercions avant tout **ALLAH** tout puissant, de nous avoir guidées toutes les années d'étude et nous avoir données la volonté, la patience et le courage pour terminer ce travail.

Notre promotrice **Mme KEBOUR. D**, Professeur à l'université Saad Dahleb Blida1, pour l'honneur qu'elle nous a fait de nous encadrer et diriger notre travail, ainsi que pour son aide et ses conseils.

On tient à remercier **Mme SEMIANI Y**, docteur a l'institut l'INRAA, pour son aide et ses encouragements.

On remercie **M SNOUSSI SA**, professeur à la faculté SNV département de biotechnologie, université Saad Dahleb Blida1, d'avoir accepté d'assurer la présidence de jury de notre mémoire.

On tient à remercier **M BENMOUSSA M**, professeur à la faculté SNV département de biotechnologie, université Saad Dahleb Blida1, d'avoir accepté d'examiner notre mémoire.

On remercie aussi nos amis **OUZERI A, FEKIRI K, MOUALED L**, pour leur aide et leur disponibilité.

Nos sincères remerciements s'adressent également à toute l'équipe de recherche de l'INRAA qui nous a facilité l'accès et le travail au sein de l'institut.

Nos vifs remerciements sont adressés pareillement à nos enseignants de l'université Saad Dahleb Blida.

Dédicace

Je dédie cette thèse à :

Mes très chers parents pour leurs grands sacrifices.

*A mon meilleur tonton pour son soutien et ses encouragements
continus.*

A toute ma famille.

A mes chers amis et mes proches.

A ma chère « binôme » Fatima Saidi et sa famille.

*Et à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour réaliser ce
travail.*

HENNAOUI Keltoum

Dédicace

Avant de commencer, je tiens d'abord à remercier le bon dieu pour m'accorder la patience et la sérénité pour la réalisation de ce travail.

En premier, Je dédie ce travail à la prunelle de mes yeux : ma mère qui m'a veillé jours et nuit, Pour mon père qui est présent toujours dans mon cœur.

A mon frère : Abdel Malek.

A mes Amies : Yasmine, Nesrine, Soumia, Khadidja, Nedjma et Iman.

A ma Binôme : HENNAOUI Keltoume Soumia et sa famille.

A mes cousines et mes cousins surtout : Maissa et Nihad.

A toute la famille : Saidi et Driouche.

A la plus proche personne à mon cœur, Rafik qui était avec moi dans la plupart des moments de ma vie.

A tous mes collègues de la section de Biotechnologie végétale Master II. Qui j'ai passé avec eux des moments inoubliables.

SAIDI Fatma

Résumé

L'utilisation d'haploïde intervient très avantageusement dans la création variétale des céréales.

Dans le présent travail, nous nous proposons la technique d'obtention des haploïdes et des haploïde doublés par culture in vitro d'anthers, cette technique est déterminée par nombreuses facteurs aussi bien biologique que physique ou chimique.

Cette étude présente la réponse androgénique de cinq variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) (cheu/he.sq//BCNB/2*KAUZ ; Boumerzoug ; Mahon Demias ; et deux variétés de F1) soumis à un prétraitement au froid à 4°C pendant 10 jours et ceci en comparant deux milieux de mise en culture (MS et C17). Selon les travaux précédents dans le même sujet il est remarquable que les embryons produit sur le milieu C17 donnent plus de plantes chlorophylliennes que ceux provenant du milieu MS. On souligne aussi que les facteurs (espèce) et (génotype) sont très marquants relativement à l'induction d'embryons et à la régénération des plantules chlorophylliennes.

Mots-clés : culture in vitro, androgenèse, *Triticum aestivum*, plantes phylliennes.

Abstract

Haploid plants production through in vitro anthers culture is a very useful technique for plant improvement as to create new varieties.

Nevertheless, success depends on many parameters as species and cultivars, as well as pre-treatments and conditions of in vitro culture. Thus, the androgenetic responses of five bread wheat This study presents the androgenic response of five varieties of common wheat (*Triticum aestivum*) (cheu / he.sq // BCNB / 2 * KAUZ; Boumerzoug; Mahon Demias; and two varieties of F1) subjected to a cold pre-treatment at 4 ° C for 10 days and this by comparing two is remarkable that the embryos produced on the C17 medium give more plants culture media (MS and C17). According to previous work in the same subject its chlorophylls than those from MS medium. It is also emphasized that the factors (species) and (genotype) are very important in relation to the induction of embryos and the regeneration of chlorophyll plantlets.

Keywords: in vitro culture, androgenesis, *Triticum aestivum*, phyllian plant.

ملخص

من مميزات خاصية الجينات الفردية للقمح اللين أنها تتدخل في تكوين سلالة جديدة في الحبوب. في هذا العمل، نقترح استعمال تقنية أخذ الجينات الفردية أو الجينات المزوجة وزرعها في المخبر، و تتأثر هذه الأخيرة بعدة عوامل من بينها عوامل بيولوجية، كيميائية.. الخ

هذه الدراسة تتمثل في استجابة خمس سلالات من القمح اللين

Tritium astivum : (cheu//, 2*KAUZ, he.sq//BCN, Bumerzoug, Mahon Demias)

وسلالتين من الجيل الاول. حيث تمثلت في وضعها كمعالجة أولية في وسط درجة حرارته 4° لمدة 10 أيام ليتم نقلها الى وسطين حيويين (MS و C17)

حسب الدراسات السابقة في هذا المجال ، نلاحظ وجود عدد أكبر من الشتلات في الوسط الحيوي C 17

مقارنة بالوسط الحيوي MS ، كما ان النوع والطابع الجيني للسلالة تأثير كبير على نتائج هذا البحث.

الكلمات المفتاحية: الجينات الفردية و المزوجة، الزراعة في المخبر، الاستجابة، الوسط الحيوي، Triticum aestivum

Liste des abréviations

- ❖ **ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- ❖ **ANA** : Acide naphtalène acétique.
- ❖ **CIV** : La culture in vitro.
- ❖ **C17** : Milieu de culture de Wang et Chen.
- ❖ **ENH** : Ethylnitroso urée.
- ❖ **F1** : La première génération.
- ❖ **HD** : Haploïde doublée.
- ❖ **HNM** : Méthyle nitroso urée.
- ❖ **IE** : Ethyléneimine.
- ❖ **INRAA** : Institut national de recherche agronomique.
- ❖ **KIN** : Kinétine.
- ❖ **MS** : Milieu de culture de Murachige et Skoog.
- ❖ **MSE** : Methyle-sulfanate d'éthyle.
- ❖ **NUE** : Nitrosouréthane d'éthyle.
- ❖ **OCDE** : organisation de coopération et de développment économique.
- ❖ **SDE**: Sulfate diéthyle.
- ❖ **SSD**: Single Seed Descent.

Liste des tableaux

Tableau 01 : Composition chimique du milieu WANG and Chen (1983).....	33
Tableau 02 : Composition chimique du milieu MS.....	34
Tableau 03 : Composition des deux milieux de cultures utilisées.....	35

Liste des figures

Figure 01 : Lieu d'origine et diffusion de blé à travers le monde.....	03
Figure 02 : Phylogénie schématique du blé tendre.....	05
Figure 03 : photo des racines fasciculées du blé tendre.....	06
Figure 04 : Photo des nœuds d'un plan de blé.....	07
Figure 05 : Photo des tiges d'un plan de blé.....	07
Figure 06 : Une image des feuilles d'un plan de blé.....	07
Figure 07 : Photo d'épis du blé.....	08
Figure 08 : Morphologie du grain de blé.....	09
Figure 09 : Les grains de blé prêt.....	09
Figure 10 : les différents stades de développements du blé.....	12
Figure 11 : Schéma sur les étapes de la sélection généalogique.....	16
Figure 12 : Schéma sur les étapes de la sélection Bulk.....	18
Figure 13 : Schéma du sac embryonnaire chez les angiospermes.....	25
Figure 14 : Une image de localisation des anthères chez le blé tendre.....	25
Figure 15 : L'institut national de la recherche agronomique d'Alger (INRAA /2020).....	28
Figure 16 : Photo de serre demie contrôlée (INRAA/2020).....	28
Figure 17 : Préparation du sol.....	29
Figure 18 : Les différentes dates de culture du blé.....	31

Liste de matière

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

Introduction générale.....01

Partie 01 : Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Monographie sur le blé

I.1. Généralité sur le blé	03
I.2. Classification du blé tendre.....	04
I.2.1. Classification Botanique.....	04
I.2.2. Classification génétique.....	04
I.3. Les caractéristiques morphologiques du blé tendre.....	06
I.3.1. Le système racinaire.....	06
I.3.2. Le système aérien.....	06
I.3.3. L'appareil reproducteur.....	08
I.3.4. Le grain de blé.....	08
I.4. Le cycle de développement du blé.....	09
I.4.1. La période végétatif.....	10
I.4.1.1. Germination.....	10
I.4.1.2- Levée et début tallage.....	10
I.4.2. La période reproductrice.....	11
I.4.2.1. Phase de formation des ébauches d'épillets.....	11
I.4.2.2. Phase de spécialisation florale.....	11
I.4.2.3. Phase épiaison- fécondation.....	11
I.4.3. La période de maturation.....	11
I.5. Importance de la culture du blé.....	13
I.5.1. Dans le monde	13
I.5.2. En Algérie	13

Chapitre II : Amélioration du blé

II.1. Amélioration des plantes.....	14
II.2. La sélection	14
II.2.1. Les méthodes de sélection.....	14
II.2.1.1. Méthode classique de sélection.....	14
A. La sélection massale.....	14
B. La sélection Généalogique.....	15
C. La méthode Bulk.....	17
D. Le Back cross.....	19
E. La sélection par filiation unipare (SSD).....	19
F. La mutagenèse.....	19
II.2.2. La biotechnologie.....	20
II.2.2.1. La culture in-vitro chez les céréales.....	21
II.2.2.2. Haplodiploïdisation.....	22
A. Parthénogénèse.....	24
B. Gynogenèse.....	24
C. L'androgenèse.....	26
D. Hybridation interspécifique ou intergénique.....	27

Partie 02 : Matériels et méthodes

I.1. L'objectif du travail	28
I.2. Conditions de réalisations de l'expérimentation.....	28
I.3. Matériels utilisés.....	29
I.3.1. Appareillage et verrerie.....	29
I.3.1.1. Appareillage de labo.....	29
I.3.1.2. Matériels de serre et outillages.....	29
I.4. Support de culture.....	29
I.4.1. Sol	29
I.4.2. Matériels végétal utilisés.....	30
I.5. Mise en culture.....	31
I.5.1. Stade de prélèvement des épis.....	31

I.5.2. Stérilisation	32
I.5.2.1. Stérilisation à pression du milieu	32
I.5.2.2. Stérilisation de la hotte	32
I.5.2.3. Stérilisation des instruments	32
I.5.2.4. Stérilisation à l'alcool	32
I.5.3. Milieu de culture	32
I.5.3.1. Solutions mères	34
I.5.3.2. Préparations des milieux	35
I.6. Mise en culture	36
Conclusion	37
Références bibliographiques	

Introduction

Introduction générale

Les céréales constituent une part importante des ressources alimentaires de l'homme et de l'animal (**Slama et al., 2005**). De plus, la majeure partie de l'alimentation est fournie par les aliments en grain, dont 96% sont produits par les cultures céréalières tels que le blé, l'orge, le seigle, le riz, le maïs, le triticale...etc.

Le blé est devenu la principale céréale de l'humanité, sa production et son utilisation ont été fortement liées au développement de l'agriculture et des civilisations sur au moins les 12000 dernières années (**Bonjon et Picard, 1990**).

Selon **Ait Kaki, (1993)** l'Algérie a été considérée comme un centre de diversification du blé malgré la légende de l'introduction récente du blé tendre en Algérie à la suite des invasions arabes.

Le blé tendre (*Triticum aestivum sp*) est une céréale importante en Algérie, en effet il occupe la troisième place après le blé dur et l'orge. Bien que le blé tendre soit connu pour être une espèce plus rustique que le blé dur, sa production est influencée par les aléas climatiques.

Pour améliorer cette production et la rendre plus stable, plusieurs voies ont été suivies dont la recherche et la création des nouvelles variétés plus adaptées et plus résistantes à ses conditions. L'amélioration des plantes peut se faire par la sélection généalogique qui permet d'éliminer efficacement les génotypes sans intérêt. Cette méthode est cependant problématique car elle oblige à réaliser de nombreux croisements destinés à fixer les caractères d'intérêt. Certains descendants peuvent exprimer des gènes de façon transitoire à cause des phénomènes de dominance et récessivité, ainsi que des interactions entre allèles et gènes différents. La descendance doit être examinée et étudiée pour ne retenir que les plantes les plus intéressantes. Un long travail d'épurations successives est donc nécessaire avant d'obtenir une nouvelle variété.

La biotechnologie végétale offre des outils très précieux pour l'amélioration variétale. Les techniques d'haplodiploditation, permettent ainsi l'obtention de lignées homozygotes (ou fixées) en un temps plus bref que celui nécessaire aux générations classiques d'autofécondations. Alors la technologie des "haploïdes doublés" (HD), permet de diminuer la durée des cycles de sélection, en diminuant le temps nécessaire à la fixation des caractères et à la multiplication des génotypes intéressants. Elle permet l'obtention de plantes

Introduction générale

homozygotes pour l'ensemble du génome sans introduction de matériel génétique exogène (**Jacquard, 2007**).

Dans ce contexte, notre recherche s'est orientée vers l'utilisation de lignées produites par culture *in vitro* de cellules gamétophytiques mâles (les anthères). C'est la technique androgenèse qui permet une accélération des programmes de sélection. On souligne aussi que chez les haploïdes doublés (HD), théoriquement, l'expression de tous les gènes peut être enregistrée, qu'ils soient dominants ou récessifs ; ceci permet un choix plus sûr des parents d'entrée en sélection, pour la création de nouvelles variétés (**Picard et al., 1994**), les HD présentent l'avantage d'une homozygotie totale, a priori, ce qui leur permet aussi des utilisations élégantes dans la recherche en génétique (**Serghini, 2006**), telle la cartographie des diverses espèces de céréales (**Tanhuanpää et al., 2008**).

Dans ce présent travail nous nous sommes proposés :

1. Installation d'un essai de blé tendre sur trois dates échelonnées.
2. Préparation de deux milieux de cultures et leurs stérilisations.
3. Culture *in vitro* des anthères (androgenèse).
4. Obtentions des plantules.

Partie 01

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Monographie sur le blé

I.1. Généralités sur le blé

Le blé (*triticum*) c'est une espèce de plante monocotylédone qui appartient au genre *Triticum* de la famille des Gramieae ou Poacées (Feillet,2000) ; Les deux espèces les plus cultivées sont : le blé tendre (*Triticum aestivum*) espèce hexaploïde utilise pour la panification et le blé dur (*Triticum durum*) espèce tétraploïde utilise pour produire les semoules et les pâtes alimentaires.

Les premières évidences archéologiques de récolte de céréales datent d'un peu moins de 8000ans avant J.C, et se trouvent au Moyen –Orient dans le « croissant fertile » : Turquie, Palestine, Mésopotamie (Feldman, 1976). A cette époque, l'en grain (*triticum boeoticum*) et l'amidonnier (*triticum dicoccoïdes*) faisaient l'objet de cueillette.

Selon Doussinault et al., (2001), le « croissant fertile » est le centre d'origine de blé qui diffusait vers le Nord-ouest par les plaines côtières du bassin méditerranéen et à travers des Balkans, puis en suivant la vallée du Danube pour arriver à la vallée du Rhin, entre environ 5000 et 6000 ans avant J.C. le reste des archéologues montrent que le blé atteint l'Ouest de l'Europe environ 5000 ans avant J.C. En Afrique, la route la plus ancienne gagna l'Egypte depuis 6000 ans et se poursuivit vers le Soudan et l'Ethiopie au sud, et vers la Libye à l'Est. D'autres voies à partir de la Grèce et de la Crète, certains blés rejoignirent également la Libye, d'autres en provenance du sud de la péninsule Italienne et de la Sicile vers la Tunisie, l'Algérie et le Maroc (Figure 02) (SEMIANI ,2018).



Figure 01 : Lieux d'origine et diffusion de Blé à travers le monde (Semiani 2018)

I.2. Classification du blé tendre

Le blé (*triticum*) c'est une plante herbacée annuelle, monocotylédone qui appartient au genre *Triticum* de la famille des Gramineae ou Poacées (Feillet, 2000). C'est une espèce autogame à reproduction sexuée, ce genre comprend les espèces diploïdes, tétraploïdes et hexaploïdes. Ainsi, leur polypléidie a joué un rôle important dans l'évolution du blé.

I.2.1. Classification botanique

Selon Bonneuil et al (2009), Le blé tendre appartient à la systématique suivante :

- **Règne** : végétal Plantae.
- **Sous-règne** : Tracheobionta.
- **L'embranchement** : Magnoliophyta.
- **Classe** : Liliopsida.
- **Sous-classe** : comelinidae.
- **Ordre** : Cyperales.
- **Famille** : Poaceae.
- **Sous-famille** : pooideae.
- **Tribu** : Triticeae.
- **Genre** : *Triticum*.
- **Espèces** : *Triticum aestivum* (Blé Tendre).

I.2.2. Classification génétique

Selon la classification la plus utilisée (Gallais et Banerot, 1992), les blés cultivés appartiennent à quatre espèces du genre *Triticum* : *T. monococcum* est diploïde ($2n=14$), *T. turgidum* et *T. timopheevi* sont tétraploïdes ($2n=42$) et *T. aestivum* est hexaploïde ($2n=42$).

La filiation génétique des blés est complexe et incomplètement élucidée. Les différents blés ont été générés par des événements successifs de polypléidisation intervenant après des croisements interspécifiques entre des espèces ancestrales diploïdes.

Le croisement naturel entre *Triticum monococcum* (génomé A) et *Aegilops* (*bicornis*, *speltoides*, *longissima*, *searsii*) (génomé B) a permis l'apparition d'un blé

Chapitre I : Monographie sur le blé

dur sauvage de type AABB (*Triticum turgidums sp.* dicoccoïdes), qui a ensuite progressivement évolué vers *Triticum turgidums sp.* Dicoccum, puis vers *Triticum durum* (blé dur cultivé) intervenant après des croisements interspécifiques entre des espèces ancestrales diploïdes.

Les blés tendres cultivés (AABBDD) seraient issus d'un croisement également naturel, entre *Triticum turgidums sp.* Dicoccum (AABB) et *Aegilops squarrosa* (DD) (Feillet, 2000 ; Henry et De Buyser, 2001).

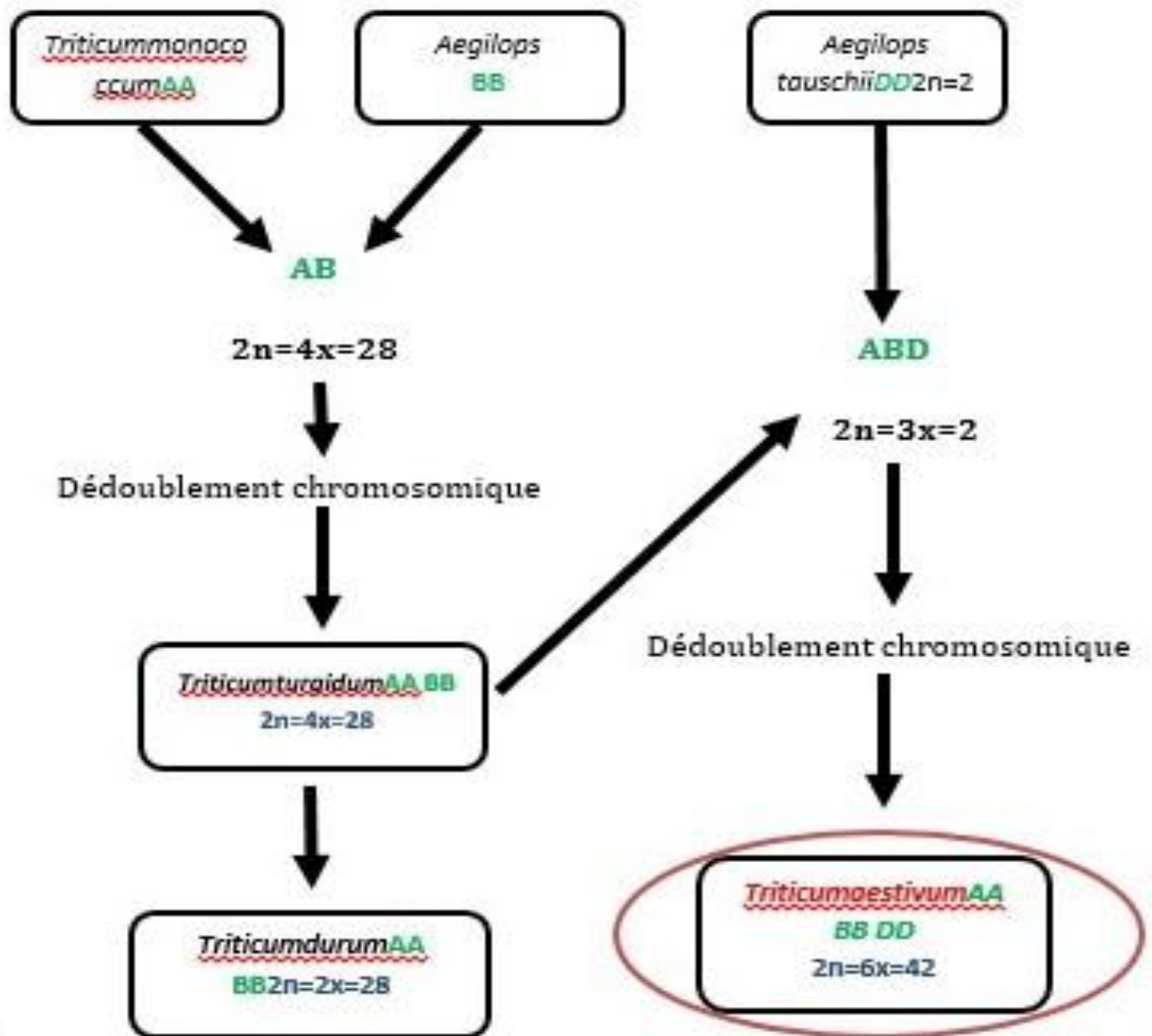


Figure 02 : Phylogénie schématique du blé tendre (Chen *et al.*, 1984)

Chapitre I : Monographie sur le blé

I.3. Les caractéristiques morphologiques du blé tendre

Le blé est une plante herbacée, à une graminée annuelle (Naville, 2005), dont sa morphologie est la suivante :

I.3.1. Le système racinaire

Le système racinaire est de type fasciculé, Ce système possède deux types de racines :

→ **Un système séminal** : il est issu de la semence, fonctionnel seule de la germination au début tallage (les premières phases de la croissance).

Il est au nombre de 5-7 (Benlaribi et al., 1990 ; Hazmoune, 2006)

→ **Un système adventif ou tallage ou secondaire** : apparaissent en plein tallage (où la plante émet ces talles). Ainsi c'est une plante qu'est incapable d'aller chercher de l'eau profondément dans le sol, et profite des pluies fréquentes (Henry et Buysler, 2000).



Figure 03 : photo des racines fasciculées du blé tendre (Institut du végétal 2018).

I.3.2 Le système aérien

Ce système possède deux parties

➤ **Nœud et tige** : Les nœuds sont les principales zones de croissance, elles représentent des zones méristématique à partir des quelle s'allongent les entre-nœuds et se différencie les feuilles.

Chapitre I : Monographie sur le blé

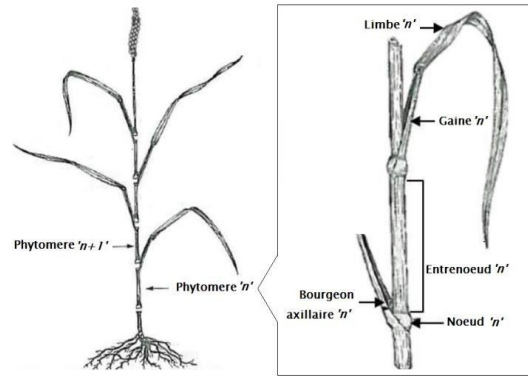


Figure 04 : Photo des nœuds d'un plan de blé (Soltner, 2005).

- Les tiges de la plante de blé sont de forme cylindrique, creuse et formé d'entre-nœud, certaines variétés possèdent toute fois des tiges pleines (Clarke et al., 1982).



Figure 05 : Photo des tiges d'un plan de blé. (Www.researchgate.net)

- **Les feuilles :** elles sont longues, étroites avec des nervures parallèles et des extrémités pointues, les feuilles du blé se composent d'une base (gaine) entourant la tige (une portion inférieure), et du limbe (une portion supérieure).



Figure 06 : Une image des feuilles d'un plan de blé. (Www.researchgate.net)

Chapitre I : Monographie sur le blé

Selon l'australien **Donald (1968)**, un plant idéal du blé est ceux qui possèdent des caractéristiques spécifiques : une paille courte, une seule tige forte, des feuilles petites, un épi large et long, et un système racinaire dense.

I.3.3. L'appareil reproducteur

Le blé est une plante monoïque, elle se reproduit par la voie sexuée et par l'autofécondation (plante autogame). L'inflorescence du blé est un épi sur lequel sont insérés les épillets. Chaque épillet porte 5 à 7 fleurs hermaphrodites.



Figure 07 : photo d'épis du blé (des fleurs sanotreporte.over-blog.com).

I.3.4. Le grain de blé

Le grain de blé est un caryopse, c'est un fruit sec de couleur blanchâtre à brunâtre selon l'espèce et la variété.

La coupe longitudinale de grain de blé à insérer des parties :

- ➔ **L'amande** : est formée de l'embryon.
- ➔ **Les enveloppes** : elles sont riches des éléments minéraux et en matière grasse (**Figure 08**).

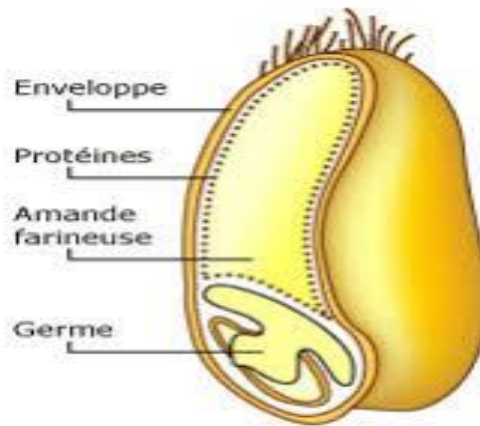


Figure 08 : Morphologie du grain de blé (Soltner, 2005).



Figure 09 : Les grains de blé prêt (des fleurs sanotreporte.over-blog.com)

I.4. Cycle de développement du blé

Le blé est une plante à cycle végétatif annuel, dans lequel une série d'étapes séparées par des stades repères allant de germination jusqu'à la maturité complète du grain

Selon **Jaques (1980)**, on distingue trois grandes périodes de développement :

- La période végétative : durant laquelle la plante ne différencie que des feuilles et des racines.
- La période reproductrice : s'étale de l'initiation florale jusqu'à la fécondation.
- La période de maturation : de la fécondation jusqu'à la maturation des grains.

I.4.1. La période végétative

I.4.1.1. Germination

La germination est un passage de la semence de l'état de vie ralentie à l'état de vie active ; la graine ne peut germer que si deux sortes de conditions sont réunies, l'une propre à la graine et l'autre relative au milieu.

a. Les conditions liées à la graine

- Elle doit être vivante, c'est à dire avoir une faculté germinative qui réponde aux normes des semences (85%). Cette faculté se maintient pendant 3 à 4 ans et décroît ensuite plus ou moins vite selon les variétés et les conditions de récolte et de conservation.
- Elle doit être également mure physiologiquement.

b. Les conditions liées au milieu

- L'humidité pour réhydrater les cellules et permettre la mise en solution et la circulation des réserves.
- L'oxygène pour oxyder les réserves que la plante va utiliser.
- La température pour accélérer les réactions chimiques et la division cellulaire.

Cette phase présente quelque particularité. Après humification de la semence, sort une radicule, puis une coléoptile, étui de la première feuille, qui s'allonge vers la surface au niveau de laquelle il se lasse percer par la première feuille.

I.4.1.2. Levée et début du tallage

Durant cette phase, la plante émet plusieurs apex susceptibles de donner plusieurs tiges : les talles.

Le tallage est fonction de variété, les conditions climatiques notamment les températures, de la nutrition hydrique et minérale, de la profondeur, date et densité de semis.

Un tallage excessif est cependant peu intéressant, car il augmente les besoins en eau et en éléments minéraux de la plante et la plupart des talles restent stériles.

I.4.2. La période reproductrice

Elle comporte trois phases principales :

I.4.2.1. Phase de formation des ébauches d'épillets

La période reproductrice débute par la différenciation et l'élongation des entre-nœuds de la tige principale.

Ce stade marque le début de la formation des ébauches d'épillets. Il a été appelé stade d'initiation florale; par la suite, les autres ébauches d'épillets apparaîtront successivement puis sur l'épillet, deux renflements latéraux deviennent visibles, ce sont les ébauches de glumes.

I.4.2.2. Phase de spécialisation florale

A partir de cette phase, on assiste à la différenciation des pièces florales :

- Apparition des ébauches de glumes.
- Apparition des ébauches de glumelles.
- Apparition des ébauches de fleurs.

Cette phase se termine au moment de la différenciation du stigmate.

I.4.2.3. Phase épiaison-fécondation

L'influence sort de la gaine de la dernière feuille, peu après la méiose, c'est l'épiaison notée au stade 50 pour 100 d'épi sortis qui permet également de mesurer la précocité des variétés.

La fécondation suit de quelques jours l'épiaison. La durée de cette phase est variable selon les variétés et de climat, car chez le blé la phase dure 10-12 jours à 14°C, 4-5 jours à 18°C.

I.4.3. La période de maturation

Dernière période du cycle, elle s'étend de la fécondation jusqu'à la maturation complète du grain ce qui correspond à l'accumulation de l'amidon dans les grains puis à leurs perte d'humidité (Lafon, 1987 ; Soltner, 2005)

Chapitre I : Monographie sur le blé

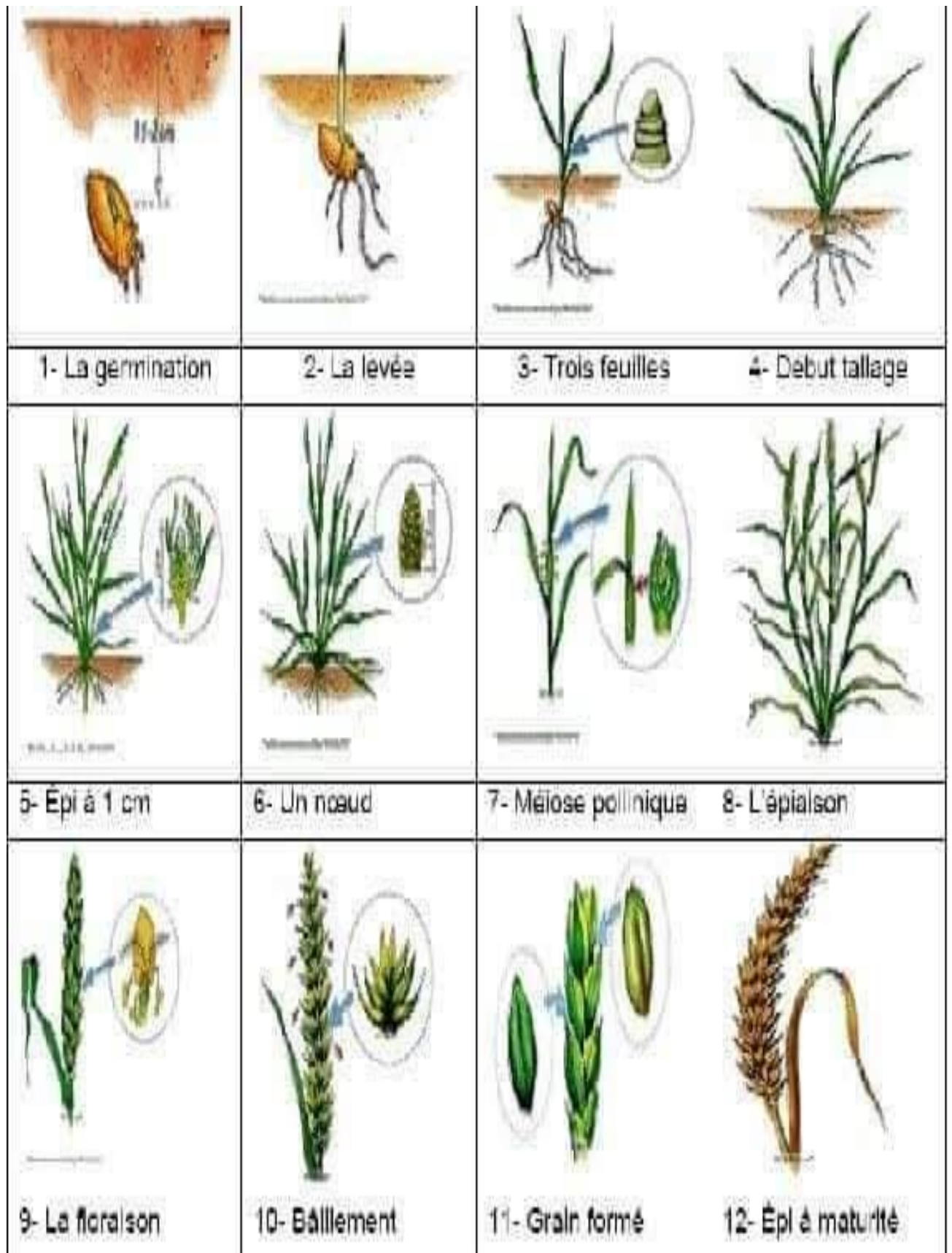


Figure 10 : les différents stades de développements du blé (Anonyme, 2004)

Chapitre I : Monographie sur le blé

I.5. Importance de la culture du blé

I.5.1. Dans le monde

Trois céréales blé, riz et maïs constituent la base alimentaire des populations du globe. Durant le développement de la civilisation indo-européenne, le blé est devenu la principale céréale des peuples occidentaux sous climat tempéré (**Henry et De Buyser, 2001**). Le blé est l'une des principales ressources alimentaires de l'humanité. La saga du blé accompagne celle de l'homme et de l'agriculture

Le blé occupe une place importante dans la production agricole et constitue la nourriture de base pour 35 % de la production mondiale (**Semiani, 2018**). Durant le développement de la civilisation indo-européenne, Le blé est l'une des principales ressources alimentaires de l'humanité. La saga du blé accompagne celle de l'homme et de l'agriculture depuis les années 1960 qui est estimé grossièrement à 2.4% par an (**Cnuced., 2011**). Ce progrès de la production de blé est principalement dû à un accroissement constant des rendements à l'hectare (multiplié par 2.8 sur les cinquante dernières années) plutôt qu'une augmentation des surfaces mondiales cultivées en blé (**Terrones Gavira et Burny, 2012**). Presque la totalité de l'alimentation de la population mondiale est fournie par les aliments en grains, 96% sont produits par les cultures céréalières. Ces dernières apportent 31% des calories et 33% des protéines de la ration journalière par habitant (**Mechara et Acila, 1999**).

I.5.2. En Algérie

Le blé compte parmi les espèces les plus cultivées dans le monde et constitue la base de l'alimentation d'une grande partie de l'humanité.

En Algérie, les céréales constituent la base de l'alimentation et l'origine de produits alimentaires de divers plats et aliments traditionnels : pain, pâtisseries, pattes divers et gâteaux traditionnels... elles présentent aussi 73.6% de l'apport calorique globale et fournissent en moyenne 80% des protéines totales consommées (**Godon et Williem, 1991**).

II.1. Amélioration des plantes

L'amélioration des plantes peut être définie comme l'ensemble des activités tendant à l'ajustement génétique des plantes au service de l'homme (**Dore et al., 2006**).

L'amélioration du blé a principalement les objectifs suivants :

- Développer des variétés de bonne qualité technologique.
- Identification de sources de résistance et /ou de tolérance.
- Développer des variétés productives et adaptées aux conditions climatiques.
- Valoriser au mieux les produits des céréales (grain, paille).
- Développer des variétés résistantes aux maladies et insectes.
- Préserver le germoplasme local.

II.2. La Sélection

La culture sélective des plantes, est le processus par lequel l'homme modifie une espèce végétale. L'objectif de la sélection est l'identification de nouvelles lignées qui portent un ensemble de caractéristiques désirables leur permettant d'être adoptées comme variétés agricoles, sans de grands risques pour les producteurs. Elles doivent produire plus pour réduire les coûts de production au niveau de l'exploitation et surtout doivent se distinguer par une meilleure régularité des rendements et une nette amélioration de la qualité du produit récolté (**Lecomte, 2005**).

II.2.1. Les méthodes de sélection

La finalité de l'amélioration des plantes est l'obtention d'un matériel végétal toujours plus performant ; pour y arriver, plusieurs méthodes ont été mises en œuvre, aboutissant à l'existence de deux grandes méthodes d'amélioration des plantes :

II.2.1.1. Méthodes classiques de sélection

A. La sélection Massale

Selon **Zahour (1992)**, la sélection massale parmi les méthodes de sélection les plus anciennes, elle est probablement à la base de la domestication de plusieurs espèces végétales. Elle consiste à retenir la descendance des meilleurs individus (**Dore et al., 2006**).

Cette méthode consiste à choisir les plantes qui semblent les plus intéressantes dans une population et à utiliser leurs graines comme semences pour la culture suivantes. L'opération est répétée de génération en génération, ce qui permet d'améliorer progressivement les performances de la culture.

Entre deux étapes de sélection les recombinaisons génétiques se font naturellement, sans aucun contrôle humain. Les plantes sélectionnées ne sont par conséquent ni identiques à celles de génération précédente ni identiques entre elles. Elles ne constituent donc pas une variété.

B. La sélection généalogique

D'après **Zahour (1992)**, cette méthode consiste d'abord à choisir un nombre important de plantes ou d'épi au sein d'une population hétérogène, ensuite semer les descendances des plantes choisies pour une sélection visuelle.

La sélection généalogique débute par croisement de deux plantes (parents) dont les caractères sont jugés intéressants et complémentaires. Les plantes issues de ce croisement sont hétérozygotes pour un grand nombre de gènes et présentent une forte variabilité de phénotype. Elles sont autofécondées afin de produire des plantes dont le niveau d'hétérozygotie est moins grand, au sein desquelles le sélectionneur choisit les meilleurs individus. Le cycle autofécondation –sélection est répété 4à5 génération. Les plantes issues de ce processus sont ensuite autofécondées et testées pendant 4 générations afin de produire des lignées fixées.

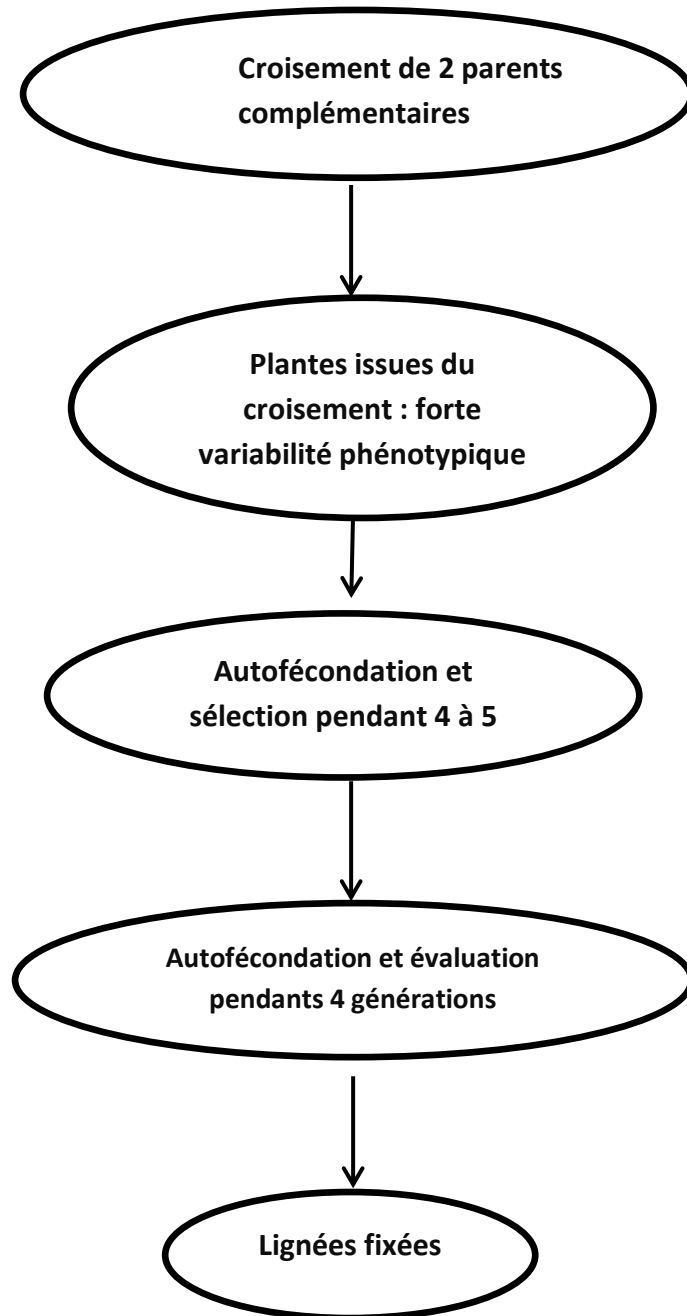


Figure 11 : schéma sur les étapes de la sélection généalogique.

C. La méthode Bulk

La méthode Bulk est simple, cependant la taille de la population doit être assez importante. Les plantes F2 sont récoltées et un échantillon des semences est utilisé pour semer les générations suivantes. Les lignées qui présentent des ségrégations sont alors sélectionnées à nouveau (**Bonjean et Picard, 1990 ; Zahour, 1992**).

La méthode Bulk est également appelée sélection généalogique différée car dans cette méthode la sélection a lieu après fixation des lignées.

De même que pour la sélection généalogique, deux parents complémentaires sont croisés afin d'obtenir des plantes qui présentent une large gamme de variabilité sur les caractères qui intéressent le sélectionneur. Ces plantes sont ensuite autofécondées. Le nombre des graines retenues pour l'étape suivante d'autofécondation est limité pour des raisons pratiques. Mais aucune sélection n'est effectuée à ce niveau. Les autofécondations sans sélection sont répétées sur 4 à 5 génération au total, ce qui permet d'obtenir des lignées fixées. La sélection n'intervient qu'ensuite, selon un processus analogue à celui utilisé en sélection généalogique si ce n'est qu'il est appliqué à des lignées fixées.

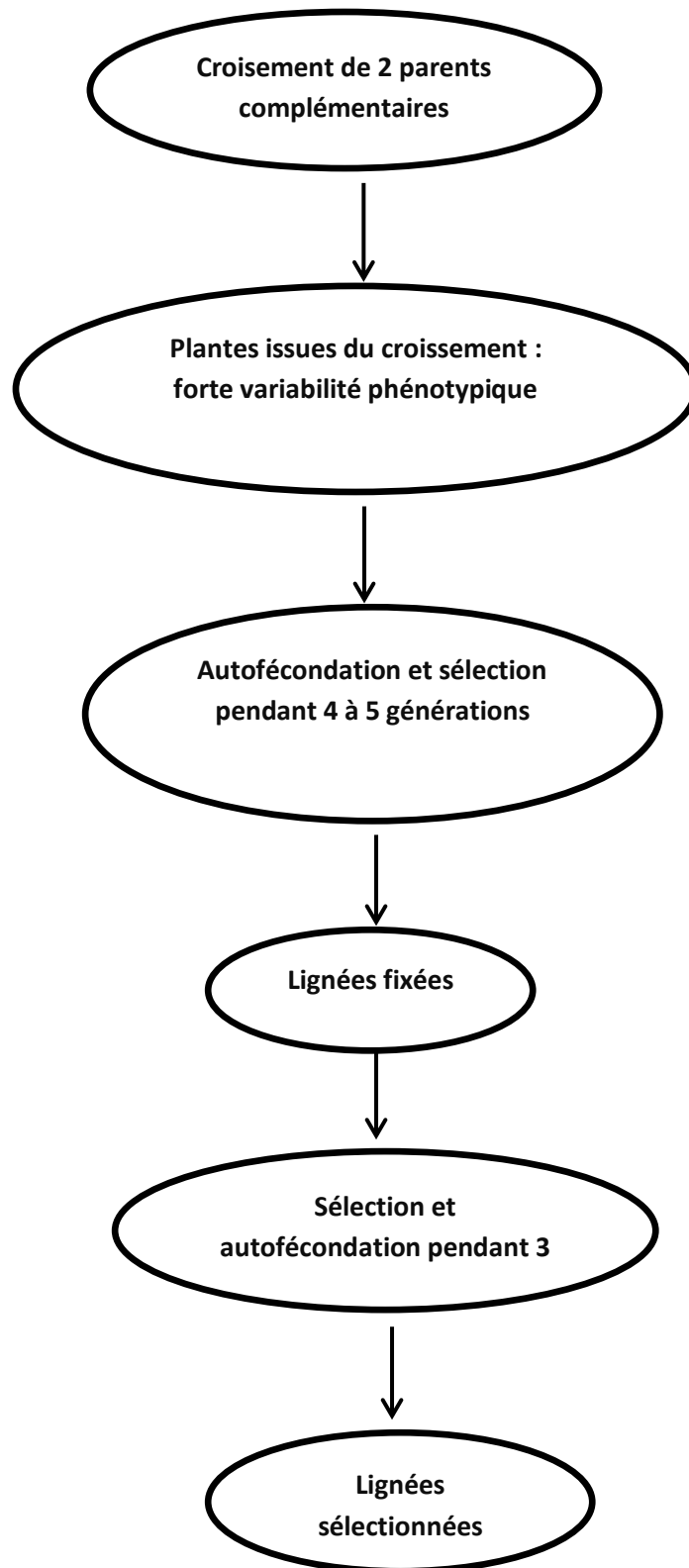


Figure 12 : Schéma sur les étapes de la sélection Bulk.

D. Le Back-Cross

Appelé également rétrocroisement ou croisement en retour, est une forme d'hybridation récurrente durant laquelle le caractère désirable est transféré à une variété adaptée et productive. Généralement, le back-cross est utilisé lorsqu'une variété possédant des caractéristiques désirables présente une faiblesse qui peut être corrigée par l'introduction d'un ou de quelques gènes (**Zahour, 1992**).

Cette lignée est croisée avec une autre lignée : une plante sauvage apparentée ou une plante appartenant à une espèce proche qui possède le caractère d'intérêt. Après avoir vérifié que l'hybride possède à une série de croisements avec la lignée d'intérêt agronomique (rétrocroisements), en sélectionnant à chaque étape les plantes qui portent le caractère d'intérêt.

Les rétrocroisements sont répétés pendant 6 à 8 générations, ce qui permet d'obtenir une lignée extrêmement proche de la lignée initiale mais qui possède en plus le caractère que l'on voulait introduire.

E. La sélection par filiation unipare (SSD)

Cette méthode est plus connue sous sa dénomination anglaise "SSD" pour "Single SeedDescent". Cette méthode consiste à semer à chaque génération, une graine unique de chaque plante obtenue depuis la F₂. La sélection ne commence qu'après l'obtention d'homozygotes. Les lignées obtenues sont appelées lignées recombinantes. L'intérêt majeur par rapport à la sélection généalogique est de conserver la variabilité généalogique jusqu'à la fixation des lignées mais l'inconvénient est d'entraîner des dispositifs très lourds et de ne pas permettre le suivi des descendance.

F. La mutagenèse

D'après **Beudoin et al., (2002)**, l'organisme a une tendance naturelle à passer d'un état héréditaire à une autre, le processus est appelé mutation. Elle est définie également comme étant un changement de la structure soudain du caractère hérité et qui serait par la suite transmis à la descendance. Ces changements peuvent se produire à trois niveaux :

- **La mutation chromosomique** : se traduit par un changement de la structure du chromosome, des segments de chromosome, ou même des groupes de chromosomes.
Elle se manifeste par addition ou délétion d'un seul chromosome ou dédoublement du chromosome.
- **La mutation spontanée** : peuvent se produire sans cause apparente, des analyses ont révélé que les facteurs internes et externes de la plante pourrait être responsable de ces mutations.
- **La mutation génique** : elle affecte généralement un seul gène en agissant sur la structure des molécules d'ADN constitutif de ce gène.

Les mutations induites ou mutation artificielles sont provoqués par :

- Des agents mutagènes physiques tels que les rayons, des isotopes radioactifs surtout ceux du Cobalt et du Césium, les rayons Gamma et les Neutrons.
- Des agents chimiques le plus souvent le méthyle-sulfonate d'éthyl (MSE) et sulfate diéthyle (SDE, Ethylèneimine (IE), Nitrosouréthane d'éthyle (NUE), Ethylnitroso urée (ENH) méthyle nitroso urée (HNM) (**Mohan *et al.*, 1998 ; Beaudoin *et al.*, 2002**).

L'amélioration du blé tendre (*triticum aestivum* L.) Par les méthodes de sélection classiques est onéreuse et demande plusieurs cycles d'autofécondation et de sélection pour atteindre l'homozygotie. La réduction des délais de sélection de nouvelles variétés est possible par l'utilisation des techniques de biotechnologies. En effet, Les techniques d'haplodiplodisation permettent de fixer rapidement le matériel végétal et d'obtenir ainsi des lignées pures en une seule génération.

II.2.2. La biotechnologie

Au sens large, les biotechnologies peuvent être définies comme un ensemble de techniques et de connaissances permettant d'exploiter les propriétés des vivants à des fins d'application.

Les biotechnologies végétales offrent des outils très précieux pour l'amélioration variétale. Les techniques d'haplodiplodisation, permettent ainsi l'obtention de lignées

homozygotes (ou fixés) en un temps plus bref que celui nécessaires aux générations classiques d'autofécondation.

Selon l'OCDE la biotechnologie regroupe toutes les applications de la science et de la technologie à des organismes vivants ou à leurs composantes, produits ou modélisation, dans le but de modifier des matériaux, vivants ou non, à des fins de production de connaissances, de biens ou de services.

Les biotechnologies englobent un ensemble de techniques couramment utilisée pour l'amélioration des plantes. Ces techniques peuvent être rassemblées en deux groupes :

- Le premier groupe de génomique qui regroupe les marqueurs moléculaires, le séquençage et enfin les bio-informatiques.
- Le deuxième le génie génétique qui regroupe la culture des tissus, la biosécurité et la transformation.

II.2.2.1. La culture in vitro chez les céréales

La multiplication végétative in vitro est un mode de reproduction asexuée artificielle, elle comprend un ensemble de méthodes faisant intervenir d'une part des éléments d'asepsie, et d'autre part la mise en place d'un environnement parfaitement contrôlé : milieux définis pour chaque espèce végétale, conditions optimales de température, photopériode, d'humidité (**Dutuit et Gorenflot, 2008**).

La culture in vitro ou CIV est une technique visant à régénérer une plante entière à partir de cellule ou de tissus végétaux en milieu nutritif.

Pratiquement, n'importe quel organe (Bourgeon, racine, feuille, anthère, etc.) ou fragment d'organe (explant) prélevé sur une plante peut être cultivé isolement sur milieu nutritif, il s'agira alors d'une culture de tissu ou des cellules au sens strict (**Gaspar, 1988**). Cela est réalisable sur milieu synthétique afin d'établir une culture de cals (est un tissu qui croît de façon désorganisée, se formant chez les plantes au niveau de la coupure de l'explant) ou de reconstituer une plante entière grâce au phénomène de **Totipotence** ; c'est-à-dire la capacité des cellules différenciées à régénérer de nouvelles plantes conservant tous leurs programmes génétique (**Ryde, 1988 ; Hopkins, 2002**).

Les techniques *in vitro*, outre l'aspect technologique qui sera examiné dans les protocoles expérimentaux, doivent permettre de résoudre un certain nombre de difficultés, tel que de maintenir l'explant en vie, et favoriser l'activité de sa croissance par déclenchement de la division cellulaires.

Les applications de la culture *in vitro* sont nombreuses aujourd'hui tant dans le domaine de céréaliculture ou de l'horticulture que dans celui de la recherche (notamment en amélioration des plantes), ou encore pour conserver la diversité variétale (conservatoires) pour sauvegarder des espèces menacées (conservations *ex-situ*). Ces techniques exigent la connaissance des facteurs de l'environnement (températures, lumière, composition du milieu...) du fragment de plante mis en culture afin de l'orienter vers un programme d'évolution déterminé (Delaa, 2013).

La culture *in vitro*, peut être utilisée pour :

- Reproduire de façon identique, une espèce et la multiplier en grande quantité, et à moindre coût pour la mettre sur marché dans les plus courts délais.
- Préserver des espèces anciennes et menacées, pour conserver la biodiversité.
- Elaborer de nouvelles variétés de plantes plus rapidement.
- Assainir des plantes virosées et conserver des plantes saines (Agnès et *al.*, 2013).

II.2.2.2. Haplodiploïdisation (les haplométhodes)

Haploïdie : Une plante haploïde est une plante qui possède le nombre gamétique de chromosomes. Elle dérive généralement d'une cellule du gamétophyte mâle ou femelle (Pelletier, 1988).

L'haploïdie est le meilleur moyen d'obtention de plante fixé, principal objectif du sélectionneur, une plante haploïde étant homozygote (Décusser et Henry, 1982).

La maîtrise de l'obtention et l'utilisation de lignées haploïdes doublées (un haploïde doublé, c'est au départ une cellule haploïde. Et les cellules haploïdes, on les trouve chez les plantes dans les pièces fertiles : microspores (= grains de pollen immatures) dans les étamines, et ovules dans les pistils) chez une espèce de grande culture comme le blé tendre est un enjeu important pour les programmes d'amélioration variétale de cette espèce. L'Haplo diploïdisation est en effet une méthode de fixation rapide du matériel génétique après la méiose, permettant l'obtention de lignées homozygotes en une seule étape, alors

que, dans les méthodes classiques, la fixation des lignées requiert plusieurs cycles d'autofécondation (**De Buser *et al.*, 1987**). On obtient alors en une étape de culture *in vitro* des Lignées complètement homozygotes, c'est-à-dire fixées. Ce qui équivaut à 10 générations d'autofécondation (**Picard *et al.*, 1994**).

Elle permet donc un gain de temps appréciable, également un gain en efficacité de la sélection et une diminution du coût de production des lignées pures (**De Buser *et al.*, 1987**).

Chez un certain nombre d'espèces de grande culture : orge, blé, riz l'haplodiploïdisation est utilisée en routine dans les schémas de sélection pour fixer des lignées pures. Certaines différences entre lignées les haploïdes doublés HD obtenues par diverses méthodes et/ou lignées dérivées par autofécondations ont pu être notées.

➤ Utilisations des haplodiploïdes

L'haplodiploïdisation comporte deux phases. Il faut d'abord obtenir des plantes haploïdes puis doubler leur nombre de chromosomes pour obtenir des plantes diploïdes homozygotes (doublement chromosomique). Le doublement chromosomique peut être obtenu de deux façons. L'état haploïde est instable et il se produit souvent un retour à la diploïdie ou plus par endomitose et fusion des noyaux dans les cultures de cal. Il s'agit alors d'un doublement spontané (**Thom, 1992**). Le doublement peut également être artificiel à l'aide de la colchicine, un alcaloïde d'origine végétale inhibiteur de la formation des fuseaux achromatiques lors des mitoses.

Thom (1992) dresse un bilan des avantages des haploïdes doublés. L'intérêt majeur est l'obtention en une génération de l'homozygotie complète et cela même dans des cas difficiles comme l'auto-incompatibilité. Par l'utilisation des gamètes d'un hybride F1, on élimine des générations d'autopollinisations normalement nécessaires pour obtenir des lignées fixées.

Cela permet un raccourcissement de 3 à 4 générations d'autofécondations du blé. De plus, grâce à l'homozygotie des haplodiploïdes, les caractères désirables ne sont pas perdus par ségrégation des loci hétérozygotes dans les générations suivantes. Les caractéristiques et recombinaisons (obtenues après croisement) récessives ne sont exprimées qu'à l'état homozygote. La probabilité d'expression de ces gènes récessifs est deux fois plus élevée avec la méthode des haploïdes doublés qu'avec un croisement entre

deux diploïdes. Enfin, en situation mendélienne, pour « n » paires de gènes indépendants, le modèle de ségrégation de la F1 est $(2n)^2$. Pour les gamètes, ce modèle est de $2n$ puisqu'il n'y a qu'un parent. Comme il y a moins de combinaisons possibles, la sélection est alors facilitée.

Il existe diverses méthodes de production des plantes haploïdes, la méthode de croisement interspécifique ou inter générique qui implique le phénomène de l'élimination chromosomique (**Thom, 1992 ; Pickering et Devaux, 1992**), l'androgenèse in vitro impliquant la culture des anthères ou des microspores isolées (**Pickering et Devaux, 1992**) (**Kasha et al., 1990**) (**Ziauddin et al., 1992**), ou la culture d'ovaires non fécondés ou de sacs embryonnaires (**Prakash et Giles, 1987**).

A. Parthénogenèse

La parthénogenèse est considérée comme un mode de reproduction de certaines plantes au cours duquel l'oosphère se développe sans fécondation et produit une plantule haploïde parfaitement viable (**Grossniklaus et al., 2001**). Cette technique conduit à l'amplification d'un individu particulièrement intéressant, sans reproduction sexuée et donc sans brassage génétique puisque seul le génome maternel participe à la formation des nouvelles plantules. La faible fréquence d'apparition d'embryons par cette technique la rend pour le moment inexploitable pour des programmes industriels de sélection (**Koltunow et Grossniklaus, 2003**).

B. Gynogenèse

Elle consiste à mettre en culture in vitro des ovules ou des ovaires prélevés sur la plante avant fécondation. Des plantes haploïdes ont pu être obtenues chez le blé, l'orge, le tabac, le riz le maïs ... Ce sont les éléments du sac embryonnaire qui donnent des embryons haploïdes. Chez l'orge, l'oosphère ou les antipodes se développent en embryon ; par contre, les synergides ne donnent que des proliférations qui se transforment en callosités (**Chih-ching, 1982**).

Elle correspond à la culture d'ovules non fécondés. Elle a été appliquée avec succès sur un certain nombre d'espèces cultivées : l'orge (**San Noeun, 1976**), le blé (**Zhu et Wu, 1979**), le riz (**Asselin de Beauvillé, 1979**).

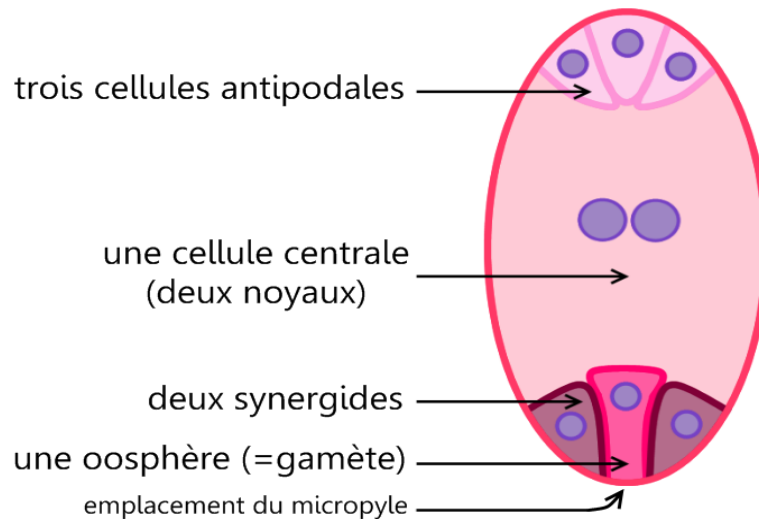


Figure 13 : Schéma du sac embryonnaire (gamétophyte femelle) Chez les angiospermes. (Semeurdeble.ek.la)

Dans la plupart des cas, le taux d'induction des haploïdes de cette façon est assez faible, cette méthode est moins utilisée. Elle est souvent utilisée chez les espèces qui sont récalcitrantes à l'androgénèse car ce processus ne donne qu'un très faible taux de régénération albinos, du fait que les plantes haploïdes régénérées sont d'origine uniquement maternelle.

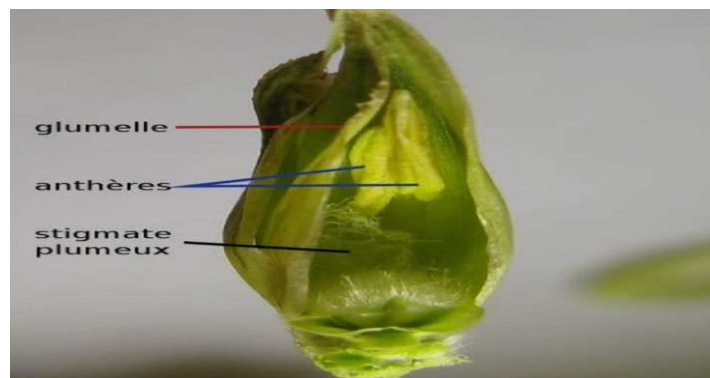


Figure 14 : Une image de localisation des anthères chez le blé tendre. (Fr.wikipedia.org)

C. L'androgenèse

La culture des anthères ou l'androgenèse est une technique d'haplodiplodisation réalisé depuis plus de vingt ans. L'utilisation de lignées produites par la culture in vitro de cellules gamétophytes males (androgenèse) permet une accélération des programmes de sélection.

Chez les haploïdes doublés (HD), théoriquement, l'expression de tous les gènes peut être enregistrée, qu'ils soient dominants ou récessifs, ceci permet plus sûr des parents d'entrée en sélection, pour la création de nouvelles variétés (**Picard *et al.*, 1994**).

La culture d'anthères contenant des microspores au stade précédant la première mitose pollinique, ou la culture de microspores isolées ont permis de régénérer des plantes.

La microspore (contenue dans les anthères) passe de la voie gamétophyte vers une voie sporophyte puis embryogénèse, aboutissant ainsi à un embryon, et a une plante haploïde ou haploïde doublée (**Dermarly, 1977**).

Chez les haploïdes doublés (HD), théoriquement, l'expression de tous les gènes peut être enregistrée, qu'ils soient dominants ou récessifs, ceci permet plus sûr des parents d'entrée en sélection, pour la création de nouvelles variétés (**Picard *et al.*, 1994**).

Cependant l'efficacité d'établissement de cette technique s'avère liée à l'espèce et au génotype (**El Haddoury *et al.*, 1993**). Chez les céréales, les premières à être opérationnelles ont été le blé tendre (**Amara *et al.*, 1999**), l'orge (**Sibi et Fakiri, 2000**), les triticales (**Marciniak *et al.*, 2003**), l'avoine (**Slusarkiewiczjarzina et Ponitka, 2007**), le riz (**Talebi *et al.*, 2007**).

Chez le blé dur, létaux de production des plantes haploïdes et haploïdes doublées chlorophyllienne est souvent nulle, et lorsqu'il y'a formation des plantes, elles sont souvent déficientes en chlorophylle 'c'est-à-dire albinos. Ces problèmes retardent l'application de cette technologie à l'amélioration de *Triticum durum*.

La technique consiste à extraire les anthères ou à isoler les microspores et à les placer en culture in vitro. Au bout d'un à deux mois, des embryons ou des cals embryonnaires se

forment et peuvent être repiqués. Trois facteurs majeurs jouent sur la réussite de ces techniques :

- Le stade de prélèvement des microspores, qui est très précis ;
- Le choc inducteur de la réorientation du développement, qui peut avoir lieu avant ou après l'introduction in vitro ;
- La composition du milieu de culture in vitro, souvent spécifique à une espèce.

D'autres facteurs moins évidents en conditionnent aussi la réussite, en particulier les conditions de culture des plantes mères...

Des cultivars ont été obtenus par doublements des haploïdes issus de la culture d'anthers de F1. Chez le maïs, le riz ou même le triticales, on a obtenu des haplodiploïdes ayant des caractéristiques de rendement, de résistance aux maladies ou aux stress identiques ou meilleures que celles de diploïdes classiques (**Thom, 1992**). Historiquement, deux cultivars de blé sont importants, puisque pour la première fois l'androgenèse est intégrée dans un schéma de sélection. En 1982, le cultivar « Jinghua no. 1 » fait son apparition en Chine.

D. Hybridation interspécifique ou intergénique

Une des méthodes actuellement utilisée pour l'amélioration des blés est l'haplodiploïdisation. Cette méthode suscite un très vif intérêt parmi les sélectionneurs, car elle permet de raccourcir la période de sélection aboutissant à la production de lignées pures par comparaison aux méthodes classiques de sélection (**De Ruysers, Henry 1986**). Le maïs, *Zeamays L.*, peut fertiliser le blé tendre *Triticuma estivum L.*, (**Laurie, Bennett, 1986**). Le zygote issu de croisements entre le blé et le maïs contient une combinaison de 21 chromosomes de blé et 10 chromosomes de maïs, et l'albumen est soit absent, soit fortement anormal (**Laurie, Bennett, 1988**). Les 10 chromosomes de maïs montrent des centromères qui présentent une faible affinité pour le fuseau achromatique, ce qui entraîne leur élimination rapide au cours des trois premières divisions cellulaires et la formation d'un embryon haploïde avec des chromosomes en provenance du parent blé (**Laurie, Bennett, 1988**).

Partie 02 :
Matériels et méthodes

Partie 02 : Matériels et Méthodes

I.1. L'objectif du travail

La maîtrise de l'obtention et l'utilisation de lignées haploïdes doublées pour l'accélération de processus de sélection et comparaison de deux milieux de culture chez quelques variétés de blé tendre.

I.2. Conditions de réalisations de l'expérimentation

L'expérimentation a été réalisée in vivo au niveau de la serre qui fait partie de laboratoire de recherche de Physiologie Végétale et Amélioration des Plantes de l'Institut National de la Recherche Agronomique à Alger INRAA, station expérimentale Mehdi Boualem.



Figure 15 : Photo originale (2020) de l'institut national de la recherche agronomique d'Alger (INRAA /2020).



Figure 16 : Photo originale de serre demie contrôlée (INRAA/2020)

I.3. Matériels utilisés

I.3.1. Appareillage et verrerie

I.3.1.1. Appareillage de labo

- Boîtes de pétries.
- Pincettes.
- Haute à flux.
- Autoclave.
- Chambre de culture.
- Etuve.
- La loupe.

I.3.1.2. Matériels de serre et outillages

- Outillage de serre.

I.4. Support de culture

I.4.1. Sol

- ✓ 1/3 terre de texture argilo-limoneuse, avec présence de graviers fins inférieur à 5mm de diamètre.
- ✓ 1/3 de terreaux.
- ✓ 1/3 de sable.



Figure 17 : Préparation du sol (Photo originale 2020).

Partie 02 : Matériels et Méthodes

I.4.2. Matériels végétal utilisé

Le matériel végétal que nous avons utilisé nous a été fourni par l'équipe du programme National d'amélioration du blé de l'institut National de la Recherche Agronomique INRAA BARAKI.

Il s'agit de cinq variétés de blé tendre *Triticum aestivum* à savoir

- ➔ **Variété 01 : Cheu/He.sq//BCNB/2*KAUZ**
- ➔ **Variété 02 : Boumerzoug** : originaire du Mexique (CIMMYT), sélection du croisement : CMSS93B00255S-48Y-010M-010Y-010M-7Y-0M-4KBY-0KBY-0M. Port au tallage demi dressé à paille courte. Epi pyramidale, demi-lâche à demi-compact, à grain ovoïdes et roux. Variété à rendement élevé et présente une résistance à l'oïdium sur épi, à la rouille brune et jaune et à la fusariose.
- ➔ **Variété 03 : Mahon Diams (MD)** est une variété rustique, à cycle de développement relativement long permettant d'esquiver les gels tardifs qui caractérisent la zone de production. Sa paille fine, haute et demi-pleine, la fait Apprécier par les éleveurs qui l'utilisent comme aliment du bétail. Elle se caractérise par une Large adaptation aux zones arides et semi-arides et aux hauts plateaux.MD est une variété qui est tolérante aux rouilles jaune et noire, possédant une qualité technologique moyenne et une production faible mais régulière.
- ➔ **Variété 04** : c'est des hybrides F1 de la première génération d'un croisement entre la première variété (Chen/Ae.Sq/BCNB/KAUZ) et la deuxième variété (Boumerzoug).
- ➔ **Variété 05** : c'est des hybrides F1 de la première génération d'un croisement entre la première variété (Chen/Ae.Sq/BCNB/KAUZ) et la troisième variété (Mahon Diams).

REMARQUE : dans ce travail de recherche nous avons travaillé avec la quatrième et les cinquièmes variétés (les hybrides) et les autres variétés seront utilisées pour d'autre objectifs.

Partie 02 : Matériels et Méthodes

I.5. Mise en culture

Les graines sont plantées dans des pots de 18 cm de haut et de 20 cm de largeur chaque pot a été perforé à la base et remplis par 4 Kg de mélange de substrat préparé. ils sont placés dans une serre au niveau de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Alger de température 25/15°C (jour, nuit) et d'humidité relative 60-80% et luminosité naturel.

Nous avons semis cinq graines par génotype dans chaque pot, les premières variétés (1, 2,3) possèdent six pots, la quatrième variété possède deux pots et la dernière variété possède trois pots, nous avons installé d'un essai sur trois dates échelonnées (20/01/2020 *03/02/2020 *17/02/2020) ils sont irrigués régulièrement 3 fois par semaine.



Figure 18 : La photo originale (2020) de différentes dates de culture du blé.

REMARQUE : A partir de cette étape nous avons arrêté le travail au niveau de l'institut à cause de l'épidémie mondiale (covid 19) ce qui vient après est le protocole que nous aurions dû suivre.

I.5.1. Stade de prélèvement des épis

La récolte des épis doit avoir lieu lorsque les microspores sont au stade uninucléé, vacuolisé ; la précision de ce stade est un facteur essentiel à la réussite de la culture in vitro d'anthères (El Haddoury *et al.*, 1993 ; Fakiri, 1995).

Le repérage peut en être fait au travers du critère phénotypique que représente la distance entre les deux dernières feuilles au-dessous de l'épi, ou encore, par la hauteur de l'épi par rapport la longueur de la gaine qui le contient, critères établis par Picard et De

Partie 02 : Matériels et Méthodes

Buyser (1973). Cependant, ces paramètres peuvent changer sensiblement d'un génotype à l'autre et selon la saison ; alors, l'observation cytologique s'avère indispensable pour déterminer précisément le stade adéquat de prélèvement des épis. Pour ce faire, les anthères scindées de l'épillet sont écrasées dans une goutte de carmin acétique entre lame et lamelle, puis observées au microscope optique. Cette étude cytologique montre que le stade uninucléé recherché coïncide avec le stade 49 de l'échelle de Zadoks (**Soltner, 2005**).

Les talles sont prélevées avec l'épi enfermé dans sa gaine foliaire, puis enroulées - chambre froide à 4°C pendant 14 jours à l'obscurité.

I.5.2. Stérilisation

La culture in vitro nécessite l'emploi de conditions aseptique pour ne pas gêner le développement des embryons par la présence des microorganismes (**Mouiner., 1971**).

Cette importance a suscité la paise en considérable d'un certain nombre de mesure.

I.5.2.1. Stérilisation à pression du milieu

La stérilisation du milieu de culture, est assurée par l'autoclave à une température de 120°C et une pression de 15 ppsi pendant 15 à 20 min.

I.5.2.2. Stérilisation de la hotte

La hotte à flux lumineaire doit être préparé et nettoyer de préférence 30 min avant son utilisation.

I.5.2.3. Stérilisation des instruments

Tous les instruments métalliques (pince, pointe, ou verreries, boites de pétri ou bécher) sont enrobés avec du papier aluminium, et sont mis à l'étuve pour une stérilisation à sec à une température de 130°C pendant 2h du temps avant chaque manipulation.

I.5.2.4. Stérilisation à l'alcool

Au cours des manipulations, les instruments sont plongés dans l'alcool, le passage à la flamme ne sert qu'à éliminer l'alcool (on garde l'instrument stérilisé toujours dans la boule stérile).

I.5.3. Milieu de culture

Pour la phase d'induction deux milieu ont étaient utilisés :

- Le milieu de **Wang et Chen(C17), (1983)**.
- Le milieu de **Murachinge et Skoog (MS), (1965)**.

Partie 02 : Matériels et Méthodes

Tableau 01 : Composition chimique du milieu WANG and Chen (1983).

Constituants	Concentration de la solution en Mg/l	Quantité à prélever de la solution mère en ml/l
Macroéléments MS modifié		
KNO ₃	1000	100
(NH ₄) ₂ SO ₂	200	
Ca(NO ₃) + 4H ₂ O	100	
MgSO ₂ +7H ₂ O	200	
KCl	40	
Microéléments		
MnSO ₂ +4H ₂ O	84	100
ZnSO ₂ +4H ₂ O	86	
H ₃ Bo ₃	62	
K	5	
CoCl ₂ +6H ₂ O	2.5	
Fe-EDTA		
Na ₂ EDTA		5
FeSO ₄ +7H ₂ O		
Vitamines (MS)		
Pyridoxine	50	10
Acide nicotinique	50	
Thiamine HCl	100	
Myoinositol	100	
Glycine	200	
Source de carbone		
Maltose	50000	
Hormones		
Kinétine	0.5	
NAA	0.5	
Agent gélifiant		
Phytigel (Gerlite)	350	

Partie 02 : Matériels et Méthodes

Tableau 02 : Composition chimique du milieu.

CONSTITUANTS	Concentration de la solution en Mg/l	Quantité à prélever de la solution mère en ml/l
Macroéléments MS modifié		
KNO ₃	1900	40
NH ₄ NO ₃	1650	
CaCl ₂ +2H ₂ O	440	
MgSO ₄ +2H ₂ O	370	
K ₂ H ₂ Po ₄	170	
Microéléments		
MnSO ₄ +4 H ₂ O	22.3	10
ZnSO ₄ +4H ₂ O	8.6	
H ₃ Bo ₃	6.2	
K	0.83	
Na ₂ MoO ₂ +2H ₂ O	0.25	
CuSO ₄ +5H ₂ O	0.025	
CaCl ₂ +6H ₂ O	0.025	
Fe-EDTA		
Na ₂ EDTA	3725	5
FeSO ₄ +7H ₂ O	2785	
Vitamines (MS)		
Thiamine HCl	100	
Myoinositol	100	
Source de carbone		
Saccharose	30000	
Agent gélifiant		
Agar agar	7000	

I.5.3.1. Solutions mères

Un milieu de culture est constitué principalement d'eau, de sels minéraux (Macroéléments, Microéléments, fer), d'éléments organiques (vitamines, sucre, parfois des acides aminés ect).

- ➔ Les solutions mères des macroéléments et microéléments sont préparés et stockées à +4°C à l'abri de la lumière dans des flacons teintés elles se conservent et restent actives durant 3 mois.

Partie 02 : Matériels et Méthodes

- Les solutions mères de vitamines (Myo-inositol, Thiamine HCL), sont préparées et stockées à +4°C dans des flacons teintés pendant une durée maximale de quatre semaines.
- La solution mère de fer sous forme de FeEDTA est préparé et stocké à +4°C.
- Les régulateurs de croissance utilisée dans les différents milieux sont la 2,4D(2,4 dichlorophénoxyacétique) et auxine, l'acide naphthalène acétique (ANA) et la kinétine (KIN).

Ces régulateurs ne sont pas solubles dans l'eau, ils sont préalablement dissous dans des solvants appropriés.

I.5.3.2. Préparation des milieux

La préparation des milieux d'induction et de régénération se fait à partir des solutions mères, le volume des différents éléments à savoir macroéléments, microéléments, le fer MS est prélevé, la quantité de sucrose et d'agar est pesée, le tout est dissout dans 600ml d'eau distillée à l'aide d'une plaque chauffante magnétique jusqu'à ébullition à 100°C.

Le volume est ramené à 100 ml, après avoir ajouté des vitamines et les hormones par l'ajout de la différence avec l'eau distillé.

Le PH est ajusté à 5.8 avec une base NaOH ou un acide HCl en utilisant le pH mètre.

Les milieux de culture sont préparés dans des béchers, transférés dans des ballons pour stérilisés à l'autoclave pendants 20 min à 120°C.

Après la stérilisation, ils sont distribués aseptiquement dans des boites de pétri sous hotte.

Tableau 03 : Composition des deux milieux de cultures utilisées.

Composition du milieu	MS	Wang et Chen
Macroéléments	MS modifié	Wang
Microéléments	MS	Wang
Fer	MS	MS
Vitamines	MS	MS Glycine
Ph	5.8	5.7
Agar/Phytigel	7g/l	3.5g/l

Partie 02 : Matériels et Méthodes

I.6. Mise en culture :

Pour la mise en culture des anthères, les épis sont d'abord dégagés de leur gaine et excisés, puis débarrassés de leurs barbes. Ils sont ensuite désinfectés dans la hotte à flux laminaire stérile, par immersion dans l'eau de javel à 20/100 pendant 10 minutes, et suivie de trois rinçages (3 minutes pour chaque bain) à l'eau distillée stérile. Les glumes et les glumelles sont alors éliminées stérilement, et les anthères sont prélevées, puis déposées sur les deux milieux (C17 et MS), contenu dans les boîtes de Pétri (100mm), à raison de 100 anthères par boîte. Les boîtes ensemencées sont scellées avec du film étirable, puis incubées à l'obscurité dans une étuve à 28°C.

Les anthères, enfermées dans les boîtes de Pétri, sont alors contrôlées régulièrement sous la loupe binoculaire. Toute formation sur les anthères, ou en leur sein, est repérée et éliminée ; les embryons et/ou les cals suffisamment développés sont repiqués en tube, sur le milieu de régénération. Le stockage de ces derniers a lieu dans une salle du laboratoire, à la lumière du jour et à une température 23± 2°C. Les plantules régénérées développent spontanément des racines et n'exigent donc pas de traitement particulier à cet égard.

Conclusion

Conclusion

Le blé tendre (*Triticum aestivum sp*) est une céréale importante en Algérie et sa production influencée par des conditions du milieu, condition climatique...etc.

Notre simple étude a montré l'obtention et l'utilisation de lignées haploïdes doublées pour l'accélération de processus de sélection et comparaison de deux milieux de culture chez quelques variétés de blé tendre.

Selon ce travail et d'autre travaux précédents dans le même objectif, montre que :

- Seuls les embryons des génotypes de blé tendre ont régénéré des plantes.
- Par ailleurs seul le milieu d'induction C17 a pu initier des embryons et/ou des cals.

L'effet génotype reste donc un facteur primordial de la réussite de l'androgénèse de même que le milieu d'induction.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Agnés B ., Hélène R. et F. Louise. 2013.** La culture in vitro en TPE <http://culture-in-vitro-tpe.e-monsite.com/>.
2. **Ait KAKLI., 1993.** Contribution à l'étude des mécanismes morphophysiologiques et biochimique de tolérance au stress hydrique sur 05 variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf). Thèse de Magistère. Ait KAKI1993.114p, Université d'annaba.
3. **AMARA SH ., Benzaghrou S., et Lepoivre P., 1999.** Capacité androgénique des variétés Tunisiennes de blé dur. Cahiers Agriculture, 8(4) :334-338.
4. **ASSELIN de BEAUVILLE, M., 1979.** Obtention d'haploïde in vitro à partir d'ovaire non Fécondées de riz, *Oryza sativa* L. Compte-rendu de l'académie des sciences, Paris 290 (série D) ,489-492.
5. **BAUDOIN J.P., LOUANT B.P., DEMOL J., MARECHEL R., MERGEAI G., OTOUL E., 2002.** Amélioration des plantes : application aux principales espèces cultivées en région tropicales, P12.
6. **BENLARIBL.M., MONNEVEUX Ph., Et Grignac P., 1990.** études des caractères d'enracinement et de leur rôle dans l'adaptation au déficit hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf) Agronomie, 10:305-322.
7. **BONJEAN A., PICARD E., 1990.** Les céréales à paille. Origine, Histoire, économie, sélection Softword, P205.
8. **BONNEUIL., ROERICH R ., et ANGLADE P., 2009.** Innover autrement, la recherche face à l'avènement d'un nouveau régime de production et de régulation des savoirs en génétique végétale, Docier de l'environnement de l'INRA, 30, 2006, P.29-51.
9. **BOUATROUS, Y. 2012.** Effet du stress salin et l'haplodiploidisation chez le blé dur (*Triticum durum* L) ;12p.
10. **CHEN P.D., et GILL B.S., 1984.** The origin of chromosome 4A and the Band G genomes of dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. Biotechnol common bunt resistance in wheat. Genome (2), 217–223.
11. **CHIH. CHING chu., 1982.** Haploïds in plants improvement. p 129-158. In vasil, I, K, W, R.
12. **CLARKE, J .M., Mc CRALG., T.M., (1982).** Evolution of techniques for screening for drought resistance in wheat. Crop Sci , 22 :503-506.
13. **CLARKE J.M., NORVELL W.A., CLARKE F.R ., et BUCKLEY T.W., 2002.** Concentration of cadimium and other elements in the grain of near-isogenic durum lines . can J_plant Sci./Revue canadienne de phytotechni, 82 :27-33.(revue scientifique)
14. **CNUCED., 2011.** Bulletin des prix produits de base.
15. **DE BUYSSER J., Henry Y ., 1982.** Orge. haploïdes par croisement interspécifiques. Cultivar 146, 22-23.
16. **DE BUYSSER J ., HENRY Y . , 1986.** Wheat. production of haploïdes performances of doubled haploïdes in Biotechnology in agriculture and forestry .vol.GROPS I , YPS . BAJAJ. Ed. Speinger Verlag , Berlin .
17. **De BUYSER J.Y., HENRY.P., LONNET.R., HERTZOG. A., HESPEL ., 1987.** 'Florin', a doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method, Plant Breed. 98 (1987) 53–56.16.

Références bibliographiques

18. **DELA A. 2013.** La culture in vitro .<http://fr.slideshare.net/Ahmed Dellaa/culture-in-vitro-des-plantes>.
19. **DERMALY, Y., 1977.** Génétique et amélioration des plantes. éd., maison ,Paris, 287p.
20. **DERMALY, Y., et Sibi, M 1996.** Amélioration des plantes et biotechnologies ...AUPELF-UREF, éd., collection Universités Francophones. Rous, Londres, Paris, Jolin Libbey, Edition 151p. (mémoire)
21. **DONALD, S., 1968.** Relationship between frost tolerance and formation of proline, abscisic acid and specific proteins in cold hardened winter wheat (*Triticum aestivum*) varieties. XII Eucarpia Congress.
22. **DORE., et VAROQUA F ., 2006.** Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées.
23. **DOUSSINAULT G., PAVOINE M., JAUDEAN B., JAHIER J., 2001.** Evaluation de la variabilité génétique chez le blé .Dossier de l'environnement de l'INRA N)21, station d'amélioration des plantes. pp91-103.
24. **DUTUIT P. et R. GORENFLOT. 2008.** Glossaire pour le développement durable : des mots pour les maux de la planète, Ed des archives contemporaines, p182.
25. **EI HADDOURY, J., CHLYAH, H ., et PICARD, E., 1993.** Etude de effet de quelques facteurs génotypiques et environnementale de l'androgénèse dans vitro chez les variétés de blé tendre adapté au MAROC .Dans le progrès génétique passe-il par le repérage et l'inventaire de gènes . AUPELF –UREF éd ;J. Libbey Eurotext, Paris, p221-232.
26. **FAKIRI, M., 1995.** Obtention chez l'orge (*hordeum vulgare*) de régénération par androgénèse et gynogénèse in vitro en condition de stress salin, Application à trois génotypes marocains. Thèse de doctorat de INPL Science agronomiques, av, de la foret de haye, 54505 Vand œuvre, 132p.
27. **FEILLET P., 2000.** Le crains de blé : composition et utilisation. Editions Quae, 200-308P.
28. **FELDMEN M., 1976.** Taxonomic classification and Names of wild, Pritive cultivated, and Modern cultivated Weats. Dans Simmonds, N.W (éd), Evolution of crop Plants. Longrman, Londre, 120-128P.
29. **GALLAIS A., et BANNEROL, H., 1992.** amélioration des espèces végétales cultivées ,Institut national de la recherché agronomique 147, rue de l'université-75007 Paris.
30. **GASPAR Th., 1988.** Culture de cellules, tissus et orgaes végétaux. Fondementsthéoriques et utilisation pratique. Jean pierre-Zryd, pp . 31-49, 69-86.
31. **GODON B., WILLIEM C., 1991.** Les industries de première transformation des céréales. Coll. Agro. Alimentaire. Lavoisier. pp : 78-91.
32. **GROSSNIKLAUS U., NOGLER G., et Van DIJK P., 2001.** How to avoid sex: the genetic control of gametophytic apomixis. The Plant Cell 13 : 1491-1497.
33. **HAZMOUNE T., 2006.** Le semis profond comme palliatif à la sécheresse. Rôle de la coléoptile dans la levée et conséquence sur les composants du rendement. Thèse docteur d'état. Univ Constantine, 168 p. (thèse)
34. **HENRY., BUYSER., 2000.** Cycle de développement du blé in Bouasla S, Debabsa.
35. **HENRY et De BUYSER., 2001.** L'origine des blés. In : Belin. Pour la science (Ed). De la graine à la plante. Ed. Belin, Paris, pp, 69-72.

Références bibliographiques

36. HOPKINS., 2002. Physiologie végétale.
37. JaCQUARD, C. 2007. Emryogenèse pollinique chez l'orge (*hordeum vulgare L*), importance du prétraitements, docteur de l'université de Reims Champagne-Ardenne Spécialité : Biologie et physiologie végétales.
38. Jaques B., (1980). les cultures céréalières ISBN. Paris.
39. KASHA, K.J., A. ZIAUDDIN et U.H. Cho. 1990. Haploids in cereal improvement: anther and microspores culture. p. 213-235 Dans Gustafson, J.P. (ed.). Gene manipulation in plant improvement II. Plenum Press, New York, U.S.A. p 668.
40. KOLTUNOW A., et GROSSNIKLAUS U., 2003. APOMIXIS: a developmental perspective. Annual Review of Plant Biology 54(1): 547-574.
41. LAFON J., 1987. Biologie des plantes cultivées. Physiologie du développement génétique.
42. LAURIE DA, BENNETT MD, 1986. Wheat * maize hybridation *canJ.Genet. Cytol.*, 28 :313-316.
43. LAURIE DA, BENNETT MD. 1988. Chromosome behaviour in wheat*maize, wheat*sorghum and barley*maize crosses, In : Bradham PE, ed Kew chromosome conferences III :167-177, *Her Majesty's Stationary office, London*.
44. LECOMPTE T., (2005). L'évaluation expérimentale de l'innovation variétale. Proposition d'outils d'analyse de l'interaction génotype-milieu adaptés à la diversité des besoins et des contraintes des acteurs de la filière semences UR LEG INRA .Paris, AgroPariTique. Thèse de doctorat, 2006 2p.(thèse).
45. MARCINIAK.K., Karzmarek.Z., ADAMSKI.T, et SURMA .M., 2003. La réponse de la culture d'anthères de descendants de testers de la lignée triticales. *Cellular letters de biology molecular*.
46. MECHARA R.E. et ACILA S., 1999. Etude de l'efficacité de quelques fongicides sur la carie du blé : mémoire d'ingénieur. IST.Univ.Tebessa. 70p. (mémoire).
47. MOHAN. S JAIN D.S, BRAR B.S, 1998. Somaclonal variation and induced mutation in crop improvement p. 256.
48. MURASHIGE T, SKOOG F.A., 1965. Revised medium for rapid growth bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* .15(3):473-97.
49. NAVILLE M., 2005. La biodiversité des espèces cultivées : Analyse dans le cas du blé, Paris : Université Paris XI, Paris, 20p. (mémoire)
50. PELLTIER G., RAQUIN G., SIMON G., 1972 . La culture in-vitro d'anthère d'asperge (*Asparagus officinalis*) C.R. Acad. Sci . D. t., 274, 6 .pp . 848-851.
51. PELLETIER G, FERAULT M, GOUJOURD J, VEDELE F and CABOUCHE M. 1987. The use of rootless mutants for the screening of spontaneous androgenetic and gynogenetic haploids in *Nicotiana tabacum* : evidence for the direct transfer of cytoplasm. *Theoretical and Applied Genetics*. 75,13-15.
52. PICARD E., 1984 .Contribution à l'étude de l'hérédité et de l'utilisation en sélection de l'haplodiploidisation par androgenèse in-vitro chez une céréale autogame : *Triticum aestivum L* . Doctorat d'état, 269p. (mémoire).
53. PICARD E, De BUYSER, J., 1973. Obtention de plantules haploides de *Triticum aestivum L* à partir des culture d'anthères in vitro. Paris, CR. Acad. Sci., 277D :1463-1466.
54. PICARD E., E. CRAMBES, G.S. LIU Et A. MIHAMOU-ZIYYAT., 1994. Evolution des méthodes d'haplodiploidisation et perspectives pour l'amélioration des plantes. *C. R. Soc. Biol*. 188: 109-141.

Références bibliographiques

55. **PICKERING R.A. et P. DeVAUX .1992.** Haploid production: approaches and use in plant breeding. p. 519-547 Dans P.R. Shewry (Ed.). Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology. Biotechnology in Agriculture series no. 5. Wailingford, Oxon,UK. P 610.
56. **POLLETIER G., 1988.** Culture des cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisation pratique.
57. **PRAKASH, J. et K-L. GILES .1987.** Induction and growth of androgenic haploids. Int. Rev. Cytol. 107: 273-292. (revue scientifique)
58. **SAN NOEUN LH., 1976.** Haploïdes d'hordeum vulgare L par culture in vitro d'ovaire non fécondé. Annale de l'amélioration des plantes ,26 ,751-754.
59. **SEMIANI .Y, 2018 :** étude de la tolérance a la sécheresse de plusieurs variétés de blé dur (*Triticum Durum*) locales et introduites dans les zones semi-arides, 3-4P.(thèse de doctorat)
60. **SIBI,M. et Fakiri,M.,2000.**Androgenèse et gynogenèse, source de vitrovariation et tolérance à la salinité chez Hordeum vulgar ? Sécheresse, 11(2) : 125-32.
61. **SKOWCROFT and K,J FREY(ed),** PLANT Improvement and somatic cell genetic. Academic press, Newyork.
62. **SLAMA A,Ben Salem M,Ben NACEUR M et Zid E.D.2005.**Les céréales en tunisie :production,effet de la sécheresse et mécanismes de résistance.Institut national de la recherche agronomique de Tunisie (inrat).Univ Elmanar .Tunisie.(http://www.john-libbeyeurotext.fr/fr/revue/agro_biotech/sec/e-docs/00/04/11/2^E/telecharger.md).
63. **Slusarkiewicz-jarzina,A,et ponitka,A.,2007.**L'effet de l'état du milieu physique sur l'anthère culture réponse dans polonais cultivé avoine (*Avena sativa* L) Acte Biologie Cracoviensia Series Botanica,Pologne,49(2) :27-31.
64. **Soltner D., 2005.** les grandes productions végétales .20ème Edition. Collection sciences et techniques agricoles. France, 464P.
65. **Talebi, R.,Rahemi,MR,Arefi,MN und Bagheri,N.2007.**In régénération des plantes à travers l'anthère culture de certains Iranien local riz (*oryza sativa* L) Cultivars. Journal des sciences biologiques du Pakistan,10(12) : 2056-2060.(journal).
66. **Tanhuanpää P,Klandar R.,SehulmanH.Aet Kivihier E.2008.**Til commence doublé liaison haploïde carte pour cultivé génome d'avoine.pub presse de recherche INC,51 :560-569.
67. **Terrones Gavira F. et Burny P., 2012.** Evolution du marché mondial du blé au cours des cinquante dernières années. In « Céréals». ULg Gembloux Agro-bio Tech ET CRA-W Gemloux.PP9.
68. **Thom. E.C .1992.** Selective Chromosome ELimination in Barley: the ' Bulbosum S ystem'. Possibilities and Limitations in Plant Breeding. Thesis, Swedish University of Agriculrural Sciences, Sweden, p 63.(mémoire).
69. **Wang,P and Chen Y,R,1983.**A study on the application of C17 medlum for another culture.Act Bot,Sin.,28:38-45.
70. **ZAHOUR, A 1992 :** Manuels scientifiques et techniques. Eléments d'amélioration génétique des plantes. Actes Institut agronomique et vétérinaire Hassan II,Rabat, Maroc. P9-157.
71. **Zhu ET Wu, 1979.**In vitro induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* and *nicotiana tabacum*.acta genetica sinica, 6,181-184.

Références bibliographiques

72. **Ziauddin, A., A. MarsoIais, E.,Simion et KJ., Kasha .1992.** Improved plant regeneration from wheat anther and barley microspore culme usùig pheaylacetic acid (PAA). Plant CellRep. 1 1, p489-498.
73. **ZRYD, J . P 1988.**-Culture de cellules, tiss us et organes végétaux. Fondements théorique et utilisation pratiques, p 120-134.
74. www.researchgate.net
75. [Des-fleurs-sanotreporte.over-blog.com.](http://Des-fleurs-sanotreporte.over-blog.com)