

**UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA 1 FACULTE DES  
SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE**



**Mémoire de fin d'étude en vue d'obtention du Diplôme Master  
Académique en Sciences de la Nature et de la Vie  
Spécialité : Biotechnologie végétale**

**Thème**

L'haplo diploïdisation chez l'orge : Conditions d'obtention, Intérêts et  
Applications en Algérie.

**Présenté par : GHLIS Nedjma**

**LARBI Khadidja**

**Devant le jury :**

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE**

<b>Abbad M</b>	<b>MCA</b>	<b>USDB</b>	<b>Président de jury</b>
<b>Ayadi R</b>	<b>MCB</b>	<b>USDB</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Ramla D</b>	<b>MRB</b>	<b>INRAA</b>	<b>Promotrice</b>
<b>Bouamra A</b>	<b>doctorante</b>	<b>USDB</b>	<b>Co-promotrice</b>

**Année Universitaire : 2019-2020**

## Remerciement

Au nom d'Allah le plus grand merci lui revient de nous guidé vers le droit chemin, de nous avoir aidées tout au long de nos années d'étude

Nous tenons tout d'abord à remercier **Mme Ramla D.** pour son encadrement, son orientation, ses conseils et la disponibilité qu'elle nous a témoignée pour nous permettre de mener à bien ce travail.

Dans un second temps, Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à **Mme Chaouia C.** Professeur à l'Université **Saad Dahleb de BLIDA** qui a accepté de présider le jury de soutenance, pour tout ce qu'elle a pu nous apprendre ; qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde et sincère reconnaissance.

Nous tenons aussi à remercier, **Mlle Bouamra Aicha** notre Co-promotrice qui nous a guidé et nous a encouragé.

Nos sincères remerciements s'adressent au jury de notre soutenance **Mr Abbad** et **Mme Ayadi R**

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à **Mr Senoussi S** et **Mr Zouaoui A.**

Nous adressons encore nos gratitudeux aux personnels qui travaillent à l'INRAA

Enfin, on remercie tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail.

## Dédicaces

Je dédie ce travail :

*A mes chers parents : Aicha et Abdelaziz*

*A toute ma famille : mes chers frères et mes  
chères sœurs Nora et Houria*

*A toute personne qui m'est chère*

*A toute personne qui m'a aidé et qui m'a  
encouragé : Nasreddine, Sarah, Amel,  
Abderrezak, Ghania, Ikram, et Maissa*

*A mes chères amies : Khadidja, Yasmine, Fatima,  
Nesrine, Haydi, et Zola*

## **Dédicaces**

*À mes chers parents, qui étaient toujours présents pour me soutenir et m'encourager, en particulier ma mère, qui m'a accompagnée de ses prières et de ses conseils*

*À mes sœurs Ikram, Imane, Chaimaa, Khaouther À mes frères Ali et Mohammed*

*À mon très cher neveu Iyad À mon fiancé Ayoub*

*À mon oncle djeloul et sa femme nadjia*

*À tous mes amis et collègues, à tous ceux qui ont contribué à m'encourager, faiza, madina, raihana, nefissa, manel, Iman, nesrine, yasmine, fatima, khaouther, sihem, safia, aicha, souad, soumia,*

*Et mon binôme Nadjmati Je dédie se travail*

*Khadidja*

## Résumé

De par l'importance d'orge dans l'alimentation animale et humaine, il fait encore l'objet d'un effort d'amélioration non négligeable aussi bien pour la productivité que pour l'extension de sa culture. L'haplodiploïdisation chez l'orge constitue pour le sélectionneur un outil extrêmement important et très utile. C'est pour cela l'application de cette technique en Algérie devient un projet d'une grande valeur.

Les techniques d'obtention des haploïdes doublées sont: l'androgenèse; la gynogenèse; et l'hybridation interspécifique. ces techniques régénèrent parfois une proportion importante des plantes albinos laquelle peut atteindre 100 % chez certains cultivars donc la réussite de cette technique nécessite un contrôle strict et rigoureux des facteurs qui influence cette réussite (les conditions de culture des plantes mères, le stade cytologique des microspores, le génotype, le milieu de culture et le prétraitement).

La formation de structures embryogènes, et le potentiel de régénération sont contrôlés génétiquement. En effet plusieurs travaux sur la régénération des haploïdes présentent une variabilité génétique de la réponse à l'androgenèse, donc Le génotype reste un facteur capital pour l'induction des embryons et la régénération de plantes chlorophylliennes.

**-mots clés :** orge, *Hordeum vulgare*L. , Amélioration génétique, Haplo-méthodes, rendement de la technique, embryogénèse.

## Abstract

Due to the importance of barley in animal and human nutrition, it is still the subject of a significant improvement effort both for productivity and for the extension of its cultivation. Haplodiploidization in barley is an extremely important and useful tool for the breeder. This is why the application of this technique in Algeria becomes a project of great value.

The techniques for obtaining doubled haploids are androgenesis; gynogenesis; and interspecific hybridization. These techniques sometimes regenerate a large proportion of albino plants, which can reach 100% in certain cultivars; therefore, the success of this technique requires a strict and rigorous control of the factors, which influence this success (the culture conditions of the mother plants, cytological stage of microspores, genotype, culture medium and pretreatment).

The formation of embryogenic structures and the potential for regeneration are genetically controlled. Indeed, several studies on the regeneration of haploids present a genetic variability in the response to androgenises; therefore, the genotype remains a major factor for the induction of embryos and regeneration of chlorophyll plants.

- Key words: barley, *Hordeum vulgare L.* , Improvement, Haplomethods, , yield of the technique

## ملخص

نظرًا لأهمية الشعير في تغذية الحيوان والإنسان، فإنه لا يزال موضوع جهود تحسين كبيرة لكل من الإنتاجية والتوسع في زراعته. تعتبر عملية الصبغية المفرطة في الشعير أداة مهمة للغاية ومفيدة للمربي. هذا هو السبب في أن تطبيق هذه التقنية في الجزائر أصبح مشروعًا ذا قيمة كبيرة.

تقنيات الحصول على أحاديات مضاعفة هي: التوليد. والتهجين بين الأنواع: تعمل هذه التقنيات في بعض الأحيان على تجديد نسبة كبيرة من نباتات الألبينو التي يمكن أن تصل إلى 100% في أصناف معينة، وبالتالي فإن نجاح هذه التقنية يتطلب تحكمًا صارمًا وصارمًا في العوامل التي تؤثر على هذا النجاح (ظروف استزراع النباتات الأم، المرحلة الخلوية للميكروسبورات، التركيب الوراثي، وسط الثقافة والمعالجة المسبقة).

يتم التحكم وراثيًا في تكوين الهياكل الجنينية وإمكانية التجديد. وفي الواقع، تقدم العديد من الدراسات حول تجديد الأحاديات تباينًا جينيًا في الاستجابة لتكوين الذكورة، وبالتالي يظل النمط الجيني عاملاً رئيسًا لتحريض الأجنة وتجديد نباتات الكلوروفيل.

- الكلمات المفتاحية: الشعير، *Hordeum vulgare* L. تحسين، Haploids مضاعفة، العائد من التقنية

## TABLE DE MATIERES

### Résumé

### Table de matière

Introduction .....	1
<b>CHAPITRE I : Généralité sur l'orge</b>	
I.1. Historique de l'orge.....	3
I.2-Classification de l'orge .....	4
I.3.Description de la plante.....	4
I.3.1.Description morphologique.....	7
I.4.Intérêt scientifique et économique de l'orge .....	7
I.4.1.Dans le monde.....	7
I.4.2.En Algérie.....	8
<b>CHAPITRE II : L'amélioration de l'orge</b>	
II .1.objectifs d'amélioration de l'orge.....	9
II.2. Les voies de la création variétale et de la sélection.....	9
a) Sélection massale.....	9
b) Sélection généalogique ou pédigrée .....	10
c) Sélection récurrente... ..	10
d) Sélection bulk... ..	10
e) Sélection participative .....	11
f) Biotechnologies végétale.....	11
<b>CHAPITRE III : L'haplodiploïdisation</b>	
III .I.1. Définition... ..	12
III .I.2.Historique .....	13
III .I.3.Intérêt de l'haplodiploïdisation... ..	14
III .4.Techniques d'obtention des haploïdes doublées... ..	15
III .4.1.Gynogenèse .....	15
III .4.2.Androgenèses... ..	15
a)Culture d'anthere .....	15
b) Culture de microspores isolées.....	16
III .4.3.Hybridation interspécifique .....	17

III.5. Les difficultés rencontrées dans le cadre de l'utilisation de la culture d'anthères en amélioration génétique chez l'orge .....	18
III.5.1. Albinisme.....	19
III.5.2. La variation gamétoclonale.....	19
III.6. Les facteurs qui influencent la réussite de l'haplodiploïdisation de l'orge.....	19
III.6.1. Les conditions de culture des plantes mères.....	20
III.6.2. Génotype .....	20
III.6.3. Stade cytologique des microspores .....	22
III.6.4. Composition de milieu de culture .....	23
III.6.4.1. Sels minéraux .....	25
III.6.4.2. Substances organiques.....	25
III.6.4.3. Régulateurs de croissance (phytohormones).....	26
III.6.4.4. Acides aminés.....	26
III.6.4.5. Vitamines.....	27
III.6.4.6. Agents gélifiants.....	27
A /Les milieux solides.....	27
B/Le milieux liquides .....	28
C/Les milieux semi-liquides.....	28
III.6.5. Le prétraitement .....	29
III.6.5.1. Prétraitement au froid.....	29
III.6.5.2. Prétraitement au mannitol .....	29
III.6.5.3. Prétraitement au mannitol et au froid .....	30
III.7. Exemple de l'application de la culture en Algérie .....	30
III.8. proposition d'un protocole argumenté (pour l'optimisation de quelques facteurs).....	33
III.8.1. Le matériel végétal .....	33
III.8.2. Conduite de l'essai .....	34
III.8.3. Préparation des conteneurs de semis .....	34
III.8.5. Irrigation.....	34
III.8.6. Désherbage .....	34
III.8.7. Dispositif expérimental .....	34
III.8.7.1. Prélèvement des épis .....	34
III.8.7.2. Critères cytologiques .....	35
III.8.7.3. Prétraitement des épis.....	35

III.8.7.4.Mise en culture d'anthères <i>in vitro</i> .....	35
III.8.7.5. analyse des résultats.....	37
<b>Conclusion</b> .....	39
<b>Références bibliographiques</b> .....	40

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Inflorescence, fleur et pièces florales d'orge ( <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Cork).....	5
<b>Figure 2 :-</b> <i>Hordeum vulgare</i> . Orge. Gauche : Épillet d'orge à 6 rangées, droite : épillet d'orge à 2 rangées.....	6
<b>Figure 3 :</b> Le cycle de développement de l'orge .....	7
<b>Figure 4 :</b> méthodes de production des haploïdes et des haploïdes doublées.....	13
<b>Figure 5 :</b> temps de génération de lignées homozygotes par la voie traditionnelle ou en culture de microspores isolées. P1 ; parent 1, P2 ; parent 2, F1 ; 1 <sup>ère</sup> génération.....	17
<b>Figure 6 :</b> Plantule chlorophyllienne et plantule albinos .....	19
<b>Figure 7 :</b> Microspores au stade uninucléé médian .....	23
<b>Figure 8 :</b> Étapes du développement des microspores chez <i>Hordeum vulgare</i> L.....	23

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Classification botanique de l'orge ( <i>Hordeum Vulgare L.</i> )... ..	4
<b>Tableau 2</b> : Obtention d'haploïdes du genre <i>Hordeum</i> par croisement interspécifique.....	18
<b>Tableau 3</b> : Fiches descriptive des variétés étudiées.....	33
<b>Tableau 4</b> : Composition des milieux de culture d'anthères chez l'orge .....	36

## Liste des abréviations

**HD** : Haploïde doublé, Désigne tout génotype homozygote issu d'une technique Quelconque d'aploïdisation

**USDA**: United States Department of Agriculture

**FAO**: Food and Agricultural Organization of the United Nations

**QTL** : Quantitative traits locus, locus à effet quantitatif

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**BAP** : 6-benzylaminopurine

**CMI** : Culture de microspores isolées

**Cv** : Cultivar

**S.A.M** : Sélection assistée par marqueurs moléculaires

**CRRA** : Centres régionaux de la recherche agronomique

**CIV** : Culture in vitro

**PPDS** : Le test de la plus petite différence significative

## Introduction

Les céréales et leurs dérivées constituent l'alimentation de base dans plusieurs pays particulièrement dans les pays Maghrébins (**DJERMOUN, 2009**).

L'Algérie est un grand intervenant sur le marché international des céréales avec un niveau de consommation annuel minimum est égal à 60 millions de quintaux de céréales (**KEBRI, 2003 ; MESFIN et AL., 2003**).

L'orge (*Hordeum vulgare L.*) est une monocotylédone diploïde ( $2n = 2x = 14$ ) appartenant à la famille des poacées et à la sous-famille des festucoïdées est une espèce anciennement cultivées, et une des plus importantes cultures céréalières à l'échelle mondiale, elle représente 15% de la consommation mondiale de céréales ; Elle occupe la 4ème place dans les céréales dans le monde après le blé, le riz et le maïs (**BENMOHAMED, 2004**).

En Algérie, l'orge largement cultivée occupe la deuxième place après le blé dur avec 35 à 40% des surfaces réservées aux céréales. La production des orges en zones arides reste confronter aux aléas climatiques et aux contraintes biotiques (**BENMOHAMED, 2004**).

L'amélioration des techniques de production, le choix du matériel végétal, l'amélioration génétique de ce dernier et sa sélection sont des éléments déterminants dans la confrontation de cette espèce vis-à-vis des contraintes biotiques (puceron, virus ...) et abiotiques (sécheresse, froid, salinité, verse ...) qui menacent sa production. Dans cette stratégie, l'amélioration génétique occupe une place importante. Aujourd'hui, les biotechnologies végétales apportent des nouvelles techniques permettant plus d'efficacité au processus d'amélioration génétique.

L'haplodiploïdisation (la production de plantes haploïdes doublées) est une technique révolutionnaire permettant d'obtenir une plante homozygote à partir d'un gamète immature haploïde en doublant son matériel chromosomique naturellement ou artificiellement (**PICKERING et DEVAUX, 1992**). Cette technique permet de réduire de 2 à 3 ans la durée d'un cycle de sélection chez l'orge et à ce titre, cette technique constitue un outil des plus précieux. Elle permet d'obtenir des lignées homozygotes en un temps très court (moins d'un an) (**LARSEN et AL. 1991**). Chez l'orge la réponse des génotypes à la culture d'anthères varie considérablement selon le type (**LUCKETT et SMITHARD, 1992**).

Les principaux paramètres susceptibles d'influer sur la production de plantes haploïdes en culture d'anthères sont les conditions de culture des plantes mères, le génotype, le stade

cytologique des microspores, l'environnement de culture des anthères, le prétraitement et la composition des milieux de culture (le pH, le rapport auxine/cytokine, les éléments nutritifs) (GUASMI *et AL.* 2009).

Dans notre étude nous avons utilisé la technique de culture d'anthères pour obtenir des plantes haploïdes doublées.

L'objectif de notre projet de fin d'étude était de proposer et de tester de niveaux de variation de certains facteurs (prétraitements et milieux de culture) afin de mettre en évidence les combinaisons qui donnent les meilleurs niveaux de réponse des différents paramètres de l'androgénèse (pourcentage des plantes vertes, des plantes albinos, d'anthères actives, de néoformation). Ceci n'a, hélas, pas pu être réalisé en raison de conditions relatives à l'état sanitaire et au confinement que traverse le pays.

Le travail a été réorienté vers une étude théorique approfondie à travers laquelle nous avons eu à :

1. Montrer de manière exhaustive l'intérêt et l'avantage qu'offre cette technique dans les schémas d'amélioration et de sélection variétale d'une manière générale et pour l'espèce étudiée en particulier.
2. Faire un état exhaustif des facteurs qui influencent le niveau de réponse des paramètres de la technique ainsi que son rendement, et ce, à travers une large synthèse bibliographique.
3. Faire la lumière sur l'application de cette technique pour l'amélioration des céréales, et en particulier de l'espèce orge, en Algérie.
4. Proposer un protocole, argumenté, portant des combinaisons de niveaux facteurs à tester.

# CHAPITRE I : Généralité sur l'orge

## I.1. Historique de l'orge

Le mot céréale provient du latin *cerealis*, les Romains nommaient ainsi les cultures d'orge et de blé dont les grains moulus produisaient la farine du pain (SAINT PIERRE et GENDRON, 1982), en Algérie, dans la Numidie antique, de nombreux textes et vestiges attestent que la culture des céréales était développée avant le III<sup>ème</sup> siècle (orge et blé de Numidie). (BESSAOUD, 1999).

L'orge (*Hordeum vulgare* L.) est l'une des cultures fondatrices de l'agriculture de l'Ancien Monde qui a été domestiquée à partir de son ancêtre sauvage *Hordeum spontaneum*, les résultats soutiennent l'hypothèse qui suppose que l'orge a été mise en culture dans la région de moyen orient (BADR et AL, 2000).

Selon HAKIMI (1993), au début du XIX<sup>e</sup> siècle, l'orge venait en tête des cultures par son importance ; elle était destinée à l'autoconsommation humaine et servait de complément fourrager aux troupeaux entretenus pendant la plus grande partie de l'année dans les régions steppiques.

De nombreuses qualités diététiques de l'orge lui sont reconnues, elles sont aujourd'hui à l'origine d'un véritable engouement pour cette céréale. L'orge représente actuellement l'aliment essentiel des ovins en Algérie (MEDINA, 2002 BENMAHAMMED, 2004).

## I.2-Classification de l'orge

La classification botanique de l'espèce *Hordeum vulgare* L. est présentée dans le tableau ci-dessous (tableau 1).

D'après la classification de **JESTIN, (1992)**, les orges sont des monocotylédones.

**Tableau 1** : classification botanique de l'orge (*Hordeum Vulgare* L.).

Embranchement :	Spermaphytes
Classe :	Angiospermes
Ordre :	Gramineales
Famille :	Poacées
Sous famille :	Festucoidées
Genre :	Hordeum
Espèce :	<i>HordeumVulgare</i> L.

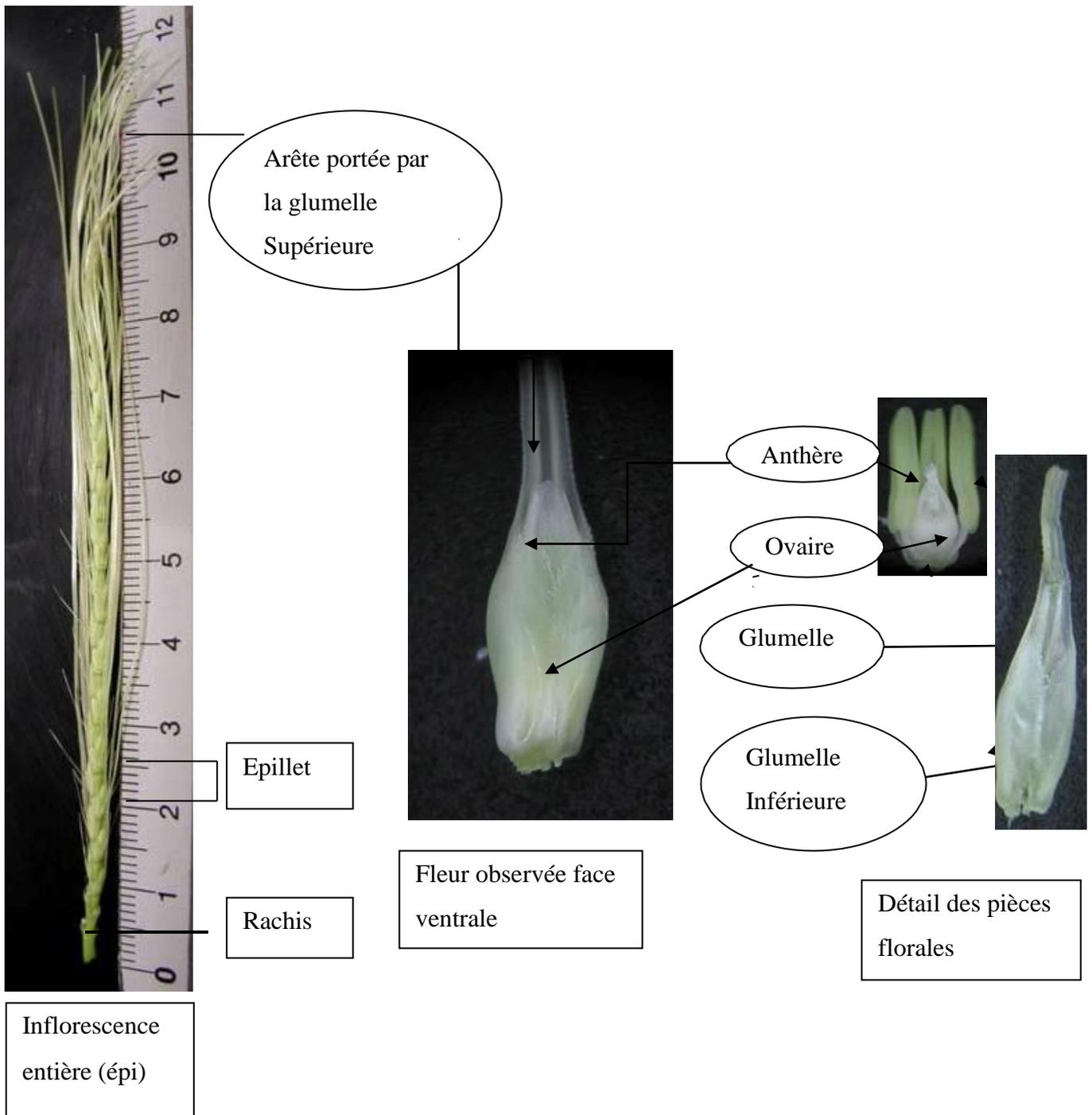
## (JESTIN, 1992) I.3.Description de la plante

### I.3.1.Description morphologique

La plante d'orge se caractérise par des épillets uniflores groupés par trois, avec un central flanqué de deux latéraux, disposés alternativement à chaque étage du rachis (**VON BOTHMER et JACOBSEN 1985**).

La fleur d'orge est constituée d'un verticille de trois anthères, chacune constituée d'une anthère fixée au filet, et d'un ovaire surmonté de deux stigmates (**JESTIN 1992 ; VON BOTHMER et AL. 1995**).

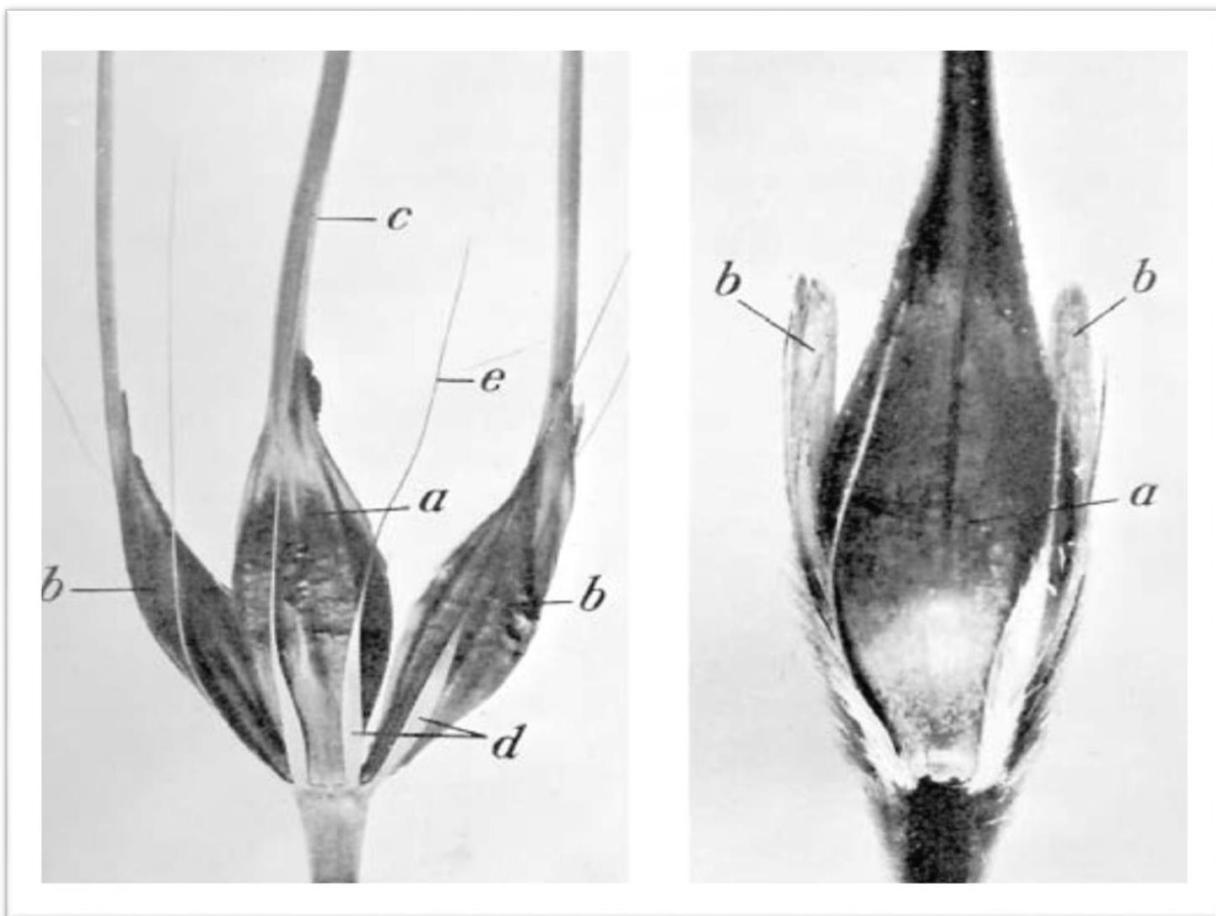
L'anthère représente l'organe reproducteur mâle de la fleur qui produit les grains de pollen. La floraison débute vers le tiers supérieur de l'épi puis s'étend à l'épi entier. L'orge est autogame, c'est à dire que les anthères émettent une grande partie de leur pollen dans leur fleur d'origine, induisant une autopollinisation (**NUUTILA et AL. 2000**) (**figure1**).



**Figure 1 :** Inflorescence, fleur et pièces florales d'orge (*Hordeumvulgare L. cv. Cork*)  
 (Source : JACQUARD, 2007).

On distingue deux sous-espèces d'orge, selon que l'épi porte deux ou six rangées de grain  
(MAZOYER *et AL.* 2002) :

- Chez l'orge à deux rangs, *H. vulgares* sp. *distichum*, chaque nœud du rachis compte trois épillets dont un seul est fertile et produit une graine. L'alternance de noeuds d'un côté et de l'autre du rachis produit un épi à deux rangs
- Chez l'orge à six rangs, *H. vulgares* sp. *hexastichum*, les trois épillets de chaque noeud contiennent des fleurs fertiles ce qui donne naissance à trois rangées de grains de chaque côté du rachis. (figure 2 et 3)



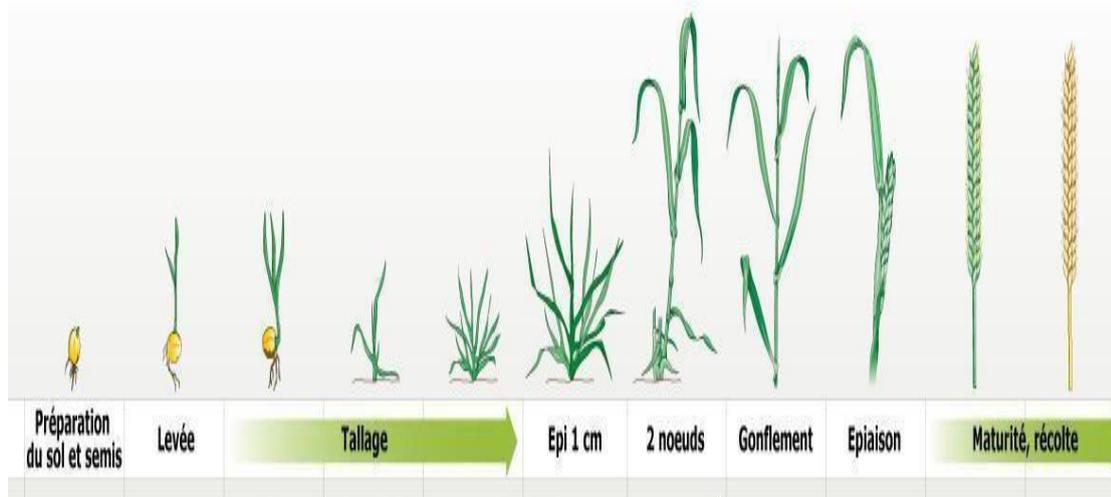
**Figure 2 :- *Hordeum vulgare*.** Orge. Épillet d'orge à 6 rangées et à 2 rangées. (LEONARD et MARTIN 1973).

A.- Caryopse central ; B.- Caryopses latéraux ; C.- Pointe ; D.- Glumes ; E.- Pointe de la glume.

### 1.3.2.Stades phénologiques

Deux périodes se distinguent

- a) La période végétative qui comprend : la germination, la levée, et le tallage) (**HADRIA., 2006**).
- b) La période reproductive comprenant : la montaison, l'épiaison, la floraison, et la maturité complète) (**GIBAN *et AL.*, 2003**) (figure.4).



**Figure 3 :** Le cycle de développement de l'orge. (**ANNONYME, 2016**)

### 1.4.Intérêt scientifique et économique de l'orge

#### 1.4.1.Dans le monde

L'orge peut être considérée comme une plante modèle, d'étude expérimentale et notamment dans la compréhension de la biologie des *Poaceae*. Si l'orge suscite un intérêt certain de la communauté scientifique, c'est avant tout par son importance économique, de premier plan sur la scène internationale (**MAGLIONE, 2016**). Les connaissances obtenues sur l'orge peuvent être publiés et généralisés sur l'ensemble des graminées.

L'orge est très largement cultivée dans le monde, sa production annuelle mondiale avoisine les 145 millions de tonnes au cours de ces 50 dernières années (United States Department of Agriculture (USDA) Foreign Agricultural Service, <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/>). Ceci en fait la 4ème céréale la plus cultivée après le maïs, le riz et le blé (**SCHULTE *et AL.*, 2009**).

#### **I.4.2.En Algérie**

De manière générale, la production des céréales en Algérie exige une amélioration des rendements aussi bien en milieux favorables qu'en milieux défavorable (**MEZIANI et AL., 2011 ; ADJABI et AL., 2014**). L'orge (*Hordeum vulgare* L.), dont les superficies approchent celles du blé dur (*Triticum durum* Desf.), trouve une multitude d'utilisation en alimentation humaine et animale. La demande est élevée en production animale, où cette espèce est utilisée sous forme de grain, de paille et même les chaumes et résidus laissés sur champs (**ABBAS et ABDELGUERFI, 2008**).

L'orge est une espèce adaptée aux systèmes de cultures pratiqués en zones sèches. Cette adaptation est liée à un cycle de développement plus court et à une meilleure vitesse de croissance en début du cycle. La culture de l'orge s'insère dans les milieux caractérisés par une grande variabilité climatique où elle constitue avec l'élevage ovin l'essentiel de l'activité agricole (**HAKIMI, 1989 ; CECCARELLI et AL. 1998**).

La culture de l'orge est pratiquée, en Algérie, essentiellement sur les hauts plateaux. Les superficies qui lui sont consacrées varient d'une année à l'autre (**MENAD et AL., 2011**). Effet la totalité de la production estimée à 91 990 700 qx en 2016, est destinée à l'alimentation du cheptel, le reste est destiné à l'alimentation humaine; l'orge est un aliment très apprécié pouvant se conserver durant de longues périodes et transporté pour des distances importantes( **BOUCHETAT et AISSAT, 2018**). Mais cette culture en Algérie rencontre des problèmes qui détériorent ses rendement et leurs instabilités qui sont : la longue période de sécheresse, la salinité, le stress hydrique les basses températures hivernales, les gelées printanières et les hautes températures de fin de cycle, de développement épidémique de certaines maladies cryptogamiques (**RAMLA, 2017**).

## CHAPITRE II : L'amélioration de l'orge

### II.1.Objectifs de l'amélioration de l'orge

Compte tenu de la faiblesse des rendements en Algérie, certains objectifs d'amélioration de l'orge ont été défini, ces derniers sont (AIT ABDALLAH ,1989) :

- a) obtention d'une meilleure productivité, et régularité des rendements.
- b) Résistance à la verse, à la sécheresse et aux maladies (l'oïdium, helminthosporiose, rouille, jaunisse nanisant).
- c) Obtention d'une précocité et d'une adaptation aux différentes zones agro- climatique.
- d) Obtention d'une teneur élevée en protéines et acides aminés indispensables.
- e) Obtention des grains nus, dans le but d'introduire l'orge dans un programme d'alimentation humaine.
- f) Obtention des orges à fort tallage herbacé, des épis lisses pour les orges fourragères.

### II.2.Les voies de la création variétale et de la sélection

La sélection a bien évolué et recouvre un ensemble d'activités techniques et scientifiques très diversifiées. Un certain nombre de méthodes de sélection sont bien établies. Les objectifs de la sélection ne sont pas uniquement d'obtenir de bons rendements, avec des variétés bien adaptées aux techniques culturales hautement mécanisées mais également d'améliorer les facteurs de régularité de ce rendement et la qualité technologique (PICARD, 1988).

#### a)La sélection massale

Elle consiste à choisir des plantes dans la masse des individus d'une population d'après leur propre performance (aspect phénotypique) et de mélanger leur semence, puis la semée en vrac. Après un croisement, la descendance hétérozygote est cultivée en masse pendant plusieurs générations (sept à huit) avant qu'on ne choisisse les plants qui apparaissent comme étant les meilleures de point de vue agronomique. Les agriculteurs gardaient les semences et les plants de leurs plus beaux végétaux et fruits. Cette méthode est aujourd'hui peu pratiquée. Elle n'est pas adaptée à la sélection pour la qualité boulangère car la quantité de grain disponible au niveau

d'une plante (3-6 g) est inférieure à celle requise pour la plupart des tests de technologie (VAROQUAUX et GEORGES, 2002).

#### **b) La sélection généalogique ou pédigrée**

Cette méthode consiste à choisir les individus d'après les caractéristiques de leurs descendances. Le choix des lignées se fait sur leur valeur propre et surtout sur le comportement de leurs descendances par l'individualisation de chacune d'elles. La sélection généalogique nécessite un temps assez long et demande de vrais spécialistes. Elle s'efforce d'obtenir des variétés à grand rendement et bien adaptées aux régions de grande culture (GENECH, 1971). La sélection généalogique, être mise en place avant de connaître les lois de l'hérédité. La séparation et l'appréciation des différentes plantes mère sa conduit à sélectionner les meilleurs géotypes dans des populations de blé, d'orge (plantes autogames) ou de betterave à sucre (plante allogame) (VAROQUAUX et GEORGES, 2002).

#### **c) La sélection récurrente**

La sélection récurrente regroupe un ensemble de méthode d'amélioration des populations qui reposent sur l'identification des meilleurs individus dans les populations de départ hétérogènes et l'inter fécondation de ces géotypes sélectionnés pour former des populations améliorées. La sélection récurrente procède par cycles successifs. Chaque population améliorée peut être directement utilisée comme base de départ d'une sélection variétale (par la méthode généalogique par exemple) ou bien servir de matériel génétique de départ pour le cycle suivant. La sélection récurrente a pour but de concentrer progressivement les allèles favorables en augmentant leur fréquence dans les individus sélectionnés qui peuvent servir à la création variétale tout en préservant la variabilité génétique (PICARD, 1988 GEORGET, 1990). Cette sélection récurrente est vraisemblablement la mieux adaptée pour accroître progressivement le niveau moyen de la qualité (caractéristique polygénique) d'une population de céréales.

#### **d) La sélection bulk**

Les plantes issues d'un croisement ne font pas ou peu l'objet d'une pression de sélection au cours des premières années d'autofécondation. Dans cette méthode, largement employée dans les pays anglo-saxons, les filiations plante-lignée-famille ne sont pas réalisées et les plantes retenues

à chaque génération sont récoltées en mélange. Après quatre ou cinq années d'autofécondation, la sélection réalise un tri plus sévère puisque, à ce stade, de nombreuses plantes sont homozygotes pour plusieurs caractères. Cette seconde phase est souvent réalisée selon la méthode généalogique (**GENECH, 1971**).

#### e) La sélection participative

La sélection participative est une idée récente. Il existe plus d'une centaine de programmes de sélection participative par le monde, qui mobilise les savoirs et les faveurs des agriculteurs dans la création variétale et l'étude des interactions génotype- environnement, suite aux travaux de l'équipe de L. Sperling sur le haricot en Afrique de l'Est, de J. Witcombe sur le riz au Népal, de S. Ceccarelli au Moyen-Orient sur l'orge. Chacun de ces programmes associe des centaines d'agriculteurs, accueillant sur leurs terres des essais de dizaines de génotypes, participant à la définition des critères de sélection pertinents et à la notation des types en essais (**BONNEUIL ET DEMEULENAERE, 2007**).

L'ambition de la sélection participative est de refaire la jonction entre une offre qui a été parfois trop souvent définie par le sélectionneur sans liaison organique avec la demande qui peut être exprimée par les agriculteurs ou par les acteurs des filières. La recherche participative n'est plus une activité marginale des centres de recherches agricoles. Aujourd'hui, un nombre croissant de chercheurs essaie de mieux concentrer leur recherche sur les priorités et les contraintes des agriculteurs des zones rurales en les insérant directement dans le processus de recherche (**NANCY et AL., 2003**).

#### f) Les biotechnologies végétale

Les progrès biotechnologiques en recherche agronomique ont apportés, à travers différents outils, de réelles solutions aux différentes contraintes de l'agriculture (stress biotiques, abiotique, etc.) et pour améliorer la productivité et la qualité des rendements.

Ainsi, beaucoup de voies et alternatives sont disponibles pour faire face, aux maladies des végétaux jusqu'ici incurable, pour explorer les nouveaux outils de développement des cultures, pour trouver des solutions à la plupart des problèmes liés au changement climatique, à la dégradation des terres, à la perte de biodiversité (**W.D.Dar , 2014**). Les activités de recherches en biotechnologie s'intéressent aux céréales et légumineuses alimentaires, et à toutes les cultures, qui occupent une

place importante dans l'économie agricole nationale et qui assurent la couverture des besoins nutritionnels nationaux (ELHADDOURY, 2005).

Parmi les outils biotechnologiques utilisés on peut citer :

- **L'outil moléculaire** : les techniques de marquage moléculaire, les M.A.S (sélection assistée par marqueurs moléculaires), la cartographie du génome et la sélection des QTL, la transformation génétique (ELHADDOURY, 2005).
- **La culture in vitro** : permet de régénérer une plante entière à partir de la culture des tissus végétaux et ceci est possible car les cellules végétales sont totipotentes, Les approches biotechnologiques comme l'induction haploïde, la variation somaclonale, etc. sont ses applications importantes (SHAHZAD *et AL.*, 2017).

## CHAPITRE III : L'haplodiploïdisation

### III .I.1. Définition

L'haplodiploïdisation, et aussi appelée la double haploïdie, la dihaploïdie ou la technique des haploïdes doublés. C'est une technique de sélection variétale grandement utilisée dans le domaine d'amélioration des plantes, elle consiste à prélever des cellules haploïdes issues de gamètes d'une plante puis provoquer le doublement de leur stock chromosomique afin d'obtenir une lignée stable. Cette technique réduit ainsi le temps de la création variétale et le coût de production (LABBANI, 2007). Si on utilise des gamètes mâles (anthères et microspores), on parle d'androgenèse. Si on utilise des gamètes femelles (ovules et ovaires), on parle de gynogenèse (IRIKOVA *et AL.*, 2016).

Il existe plusieurs techniques pour obtenir des haploïdes et des haploïdes doublées en méthodologies vivo et in vitro (Figure5). Les méthodes les plus utilisées sont la gynogenèse et l'androgenèse (IRIKOVA *et AL.*, 2016). La gynogenèse est moins favorisée en raison de sa faible efficacité (FORSTER *et AL.*, 2007). D'autre part, l'androgenèse est l'une des méthodes les plus utilisées pour la production d'haploïdes et d'haploïdes doublés (KASHA *et MALUSZYNSKI*, 2003).



### III .I.2.Historique

L'histoire de la production d'haploïdes doublés a commencé en 1921, quand A.D.Bergner et Weed Jimson observé le premier haploïde sporophytique naturel chez (*Datura Stramonium* L). **MALUSZYNSKI et AL., 2003 et GERMANA, 2011).**

L'importance de l'haplo diploïdisation dans le domaine de la recherche génétique et la sélection végétale a été immédiatement reconnues depuis le développement des haploïdes spontanés de différentes espèces (**MALUSZYNSKI et AL., 2003**). Le premier haploïde de céréale a été observé en 1926 à Combridge par Gains et Ase, il provenait d'un croisement interspécifique entre *Triticumcompactum* et *Aegyllopscylindrica* (**DEMERLYET PICARD, 1995**) Le premier haploïde d'orge a été observé en 1934(**DORE, 2006**).

**GUHA et MAHESHWARI (1964)**, ont essayé de produire des plantes haploïdes en cultivant des gamétophytes in vitro, et ont obtenus les premières plantes haploïdes chez le *Datura innoxia* à partir des anthères. En 1967, Dourgin et Nitsch ont réussi à obtenir des haploïdes de tabac en cultivant des étamines. Ils ont démontré que la totipotence des cellules végétales est également conservée au niveau des gamétophytes (**PICARD et DEMARLY, 1995**)

L'intérêt pour les haploïdes s'est manifesté lors du 1er Symposium International «Haploïdes dans les plantes supérieures», qui a eu lieu à Guelph, Canada, en 1974 et ou une introduction fort intéressante de « l'haploïdie » a été présenté ouvrant des d'importantes et d'historiques perspectives pour les scientifiques travaillant dans le domaine de l'amélioration des plantes. (**KASHA, 1974 ; KASHA et MALUSZYNSKI, 2003**).

### III .I.3.Intérêt de l'haplodiploïdisation

- Apporte une contribution très significative à l'amélioration des plantes (**LABBANI, 2007**).
- permet la fixation totale et l'absence de l'hétérozygotie résiduelle persistante pour les deux autres systèmes de reproduction en consanguinité (l'autofécondation et le croisement) (**RAMLA, 2017**).
- Permet une obtention plus rapide de lignées pures (en une seule étape au lieu de 7 à 8 générations) et donc un gain de temps considérable. En effet, l'un des intérêts le plus importants de cette technique est la réduction du temps d'obtention des plantes homozygotes (figure6),

Elle permet d'obtenir un matériel homozygote à 100% en seulement une génération (une année environ), par contre les techniques traditionnelles reposant sur la fixation par autofécondation produit du matériel homozygote à 99,8% pendant 8 ans (**MAGLIONE, 2016**).

- permet également de simplifier certaines analyses en génétique quantitative et se révèle être un outil efficace en marquage moléculaire. et elle permet d'observer l'expression aussi bien des gènes récessifs que des gènes dominants et donc Le choix des lignées haploïdes doublées (HD) est moins aléatoire. (**LABBANI, 2007**).
- Les lignées haploïdes doublées présentent un intérêt pour l'amélioration variétale grâce à leur homozygotie stable et à l'absence de toute interaction allélique. (**LABBANI, 2007**).

### **III .4. Techniques d'obtention des haploïdes doublées**

#### **III .4.1. Gynogenèse**

Cette technique permet de générer des embryons HD après mise en culture d'ovules non pollinisés ou pollinisé avec des grains de pollens irradiés. L'induction, *in vitro*, peut se faire grâce à l'utilisation de milieu et de conditions de culture contrôlés. Cette technique a surtout été développée chez l'oignon (*Allium cepa*) et la betterave (*Beta vulgaris*) (**BOHANEK, 2009**), mais aussi chez l'orge (**CASTILLO ET CISTUE, 1993**).

#### **III .4.2. Androgenèses**

L'androgenèse consiste à la régénération de plantes haploïdes par la culture *in vitro* du gamétophyte mâle (anthères ou microspores isolées), c'est la technique la plus utilisée pour la production de plantes HDs chez l'orge (**PICKERING et DEVAUX, 1992 ; JÄHNE et LÖRZ, 1995**).

##### **a) Culture d'anthère**

Il s'agit, généralement, de mettre en culture des anthères immatures, plus rarement du pollen formé mais n'ayant pas subi encore la dernière division, celle qui donnera un noyau reproducteur et un noyau végétatif (**AIT SALAH, 2005**).

L'utilisation de cette technique permet un gain de temps dans le processus de fixation et l'obtention rapide des lignées pures. Le taux de réussite est variable selon les génotypes et les différents facteurs qui contrôlent son processus (**GALLAIS, 2011**). Chez l'espèce orge, la culture d'anthères engendre la régénération considérable de plantes albinos ce qui limite le rendement potentiel des plantes dihaploïdes d'orges. Ce taux des plantules albinos régénérées reste toutefois variable selon les génotypes (**OHNOUTKOVA et AL., 2019**).

Pour diminuer le taux des plantes albinos, les anthères sont prétraitées au froid ou en condition de stress hydrique avec une solution de mannitol (CISTUE *et AL.*, 1994). Puis, sont placées sur un milieu d'induction à une température contrôlée et dans le noir. Quelques semaines plus tard, les néoformations, sont transférées sur milieu de régénération. La quantité de plantes haploïdes générées dépendra du nombre de microspores par épi (MAGLIONE, 2016). Chez l'orge, l'androgénèse comprend trois étapes : l'induction, la culture, et la régénération (ASAKAVICIUTE *et AL.* 2006).

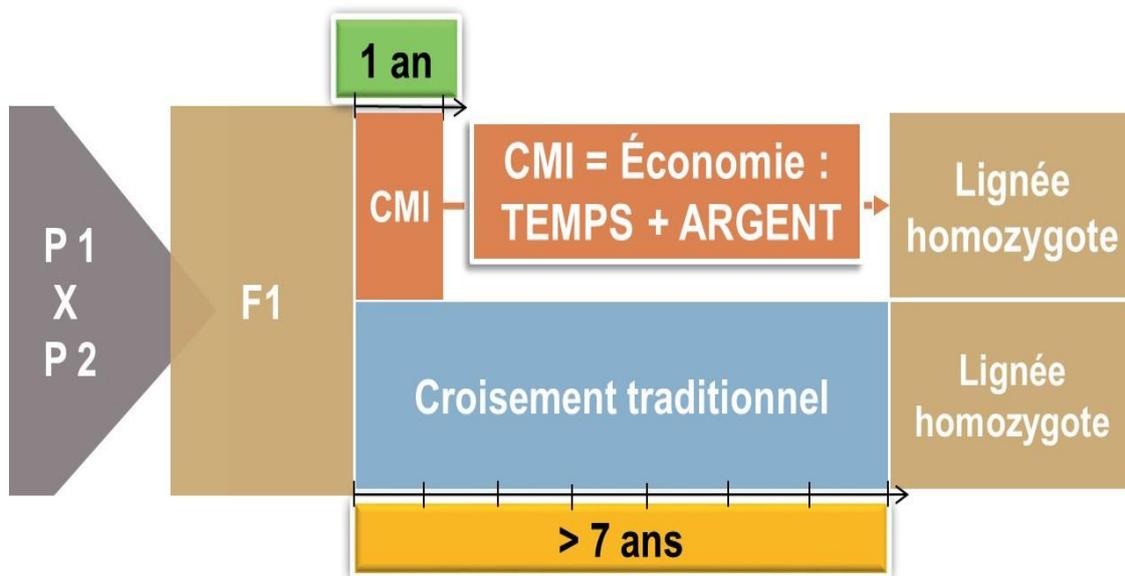
L'induction : permet la réorientation du programme gamétophytique vers le programme sporophytique.

La culture : pendant laquelle les microspores produisent des structures embryogéniques.

La régénération : permet la régénération des plantes haploïdes à partir des cals androgène ou des embryons (ASAKAVICIUTE *et AL.* 2006).

#### **a) Culture de microspores isolées**

Chez l'orge la culture des microspores isolées est une technique d'amélioration et d'obtention des haploïdes doublés (LI *et DEVAUX*, 2005), mais elle fait face à un problème majeur avec l'albinisme (MAGLIONE, 2016). Cette technique consiste à soumettre les épis à un prétraitement au froid ou au mannitol. Puis Ils sont découpés en fragments et placés dans un broyeur contenant une solution de mannitol. L'homogénat est filtré, par la suite, une centrifugation conduit au regroupement des microspores dans un surnageant. Les microspores ainsi isolées sont suspendues dans un milieu de culture liquide. La suspension est alors utilisée pour l'induction des microspores en culture. Après cette phase d'isolement des microspores, les autres étapes de la technique restent identiques à celles de la culture d'anthères (SANGARE, 2008). (Figure.6).



**Figure. 5** : temps de génération de lignées homozygotes par la voie traditionnelle ou en culture de microspores isolées. P1 ; parent 1, P2 ; parent 2, F1 ; 1<sup>ère</sup> génération. (MAGLIONE, 2016).

### III.4.3. Hybridation interspécifique

Cette méthode est basée sur le sauvetage par culture *in vitro* d'embryons immatures, issus de croisements interspécifiques. Le sauvetage de ces embryons immatures se fait grâce à leurs mises en culture sur un milieu nutritif artificiel. Chez l'orge, le croisement est réalisé entre *H. bulbosum*, qui sert de parent mâle et *H. vulgare*L., qui sert de parent femelle (DEVAUX, 2003). Après fécondation, les chromosomes de *H. bulbosum* sont éliminés au cours du développement embryonnaire, ce qui conduit à l'obtention d'une plante haploïde. Le doublement chromosomique permet l'obtention de plantes HD présentant tous les caractères d'*H. vulgare*L. (KASHA ET KAO, 1970). Cette technique est couramment utilisée pour l'amélioration et la sélection variétale des céréales (DEVAUX, 2003).

**Tableau 3.2 :** obtention d'haploïdes du genre *Hordeum* par croisement interspécifique

Croisement	Type des haploïdes
HordeumbulbosumxH.secalinum (2n=4x=28) x (2n=4x=28)	H.bulbosum
H.lechleri x H.vulgare (2n=4x=28) (2n=14)	H.lechelri
H.bulbosum x H.vulgare (2n=4x=28) (2n=28)	H.vulgare
H.vulgarexH.bulbosum En croisement réciproque (2n=14) (2n=4x=28)	H.vulgare
H.parodii x H. bulbosum (2n=6x=42) (2n=14)	H.vulgare
H.brachyantherumxH.bulbosum (2n=4x=28) (2n=14)	H.parodii
H.depressum x H.bulbosum (2n=4x=28) (2n=14)	H.brachyantherum
H.arizonicum x H.bulbosum (2n=6x=42) (2n=14)	H.depressum
H.lechelri x H.bulbosum (2n=6x=42) (2n=14)	H.arizonicum
	H.lechelri

**AIT ABDALLAH(1989).**

### **III.5. Les difficultés rencontrées dans le cadre de l'utilisation de la culture d'anthères en amélioration génétique chez l'orge**

L'androgenèse est un processus où des cellules sexuelles mâles (culture *in vitro* d'anthère ou de microspores isolées) sont capables de germer *in vitro* sur un milieu artificiel et donner des plantes vertes. C'est une méthode très intéressante dans le développement des recherches en génétique, en sélection et en biotechnologie. Mais la réussite de cette technique est généralement freinée par l'albinisme et la variation gamétoclonale (**LABBANI ,2007**).

### III.5.1. Albinisme

En culture d'anthere, l'albinisme est une problématique majeure posée chez les céréales notamment l'orge et le blé (**MARCHAND et AL. 2008**). Chez l'orge **CAREDDA et AL., (2004)** ont mené un travail fondamental sur les plastes de la microspore durant les différentes phases de l'androgenèse. Ces auteurs ont montré que chez le cv d'hiver Igri, les plastes des embryons dérivés des microspores sont caractérisés par de nombreuses divisions, une différenciation des thylakoides, une faible présence d'amidon et une forte teneur en ADN. Ces embryons donnent dans la plupart des cas des plantules vertes (88% de plantules chlorophylliennes régénérées). A l'inverse, au niveau des lignées de printemps, il y a peu de divisions et peu d'ADN dans les plastes des embryons dérivés des microspores. Ces derniers ont régénéré 100 % de plantes albinos (figure 7). Les plastes des plantules albinos sont dépourvus de thylakoïde, mais contiennent un corps pro-lamellaire et de nombreux plastoglobules (**CAREDDA et AL., 1999**). Les gènes responsables du pourcentage de régénération de plantes vertes en culture d'anthers d'orge sont héréditaires (**DUNWELL et AL. 1987 ; LARSEN et AL. 1991**).



**Figure 6** : plantule chlorophyllienne et plantule albinos (**JACQUARD, 2007**)

### **III.5.2. La variation gamétoclonale**

De façon générale, les variations produites en culture de cellules se nomment «Variations somatiques», et les variations produites en culture de cellules de tissus gamétiques se nomment «variations gamétoclonales» (EVANS *et AL.*, 1984).

Les variations gamétoclonales peuvent provenir de changements dans le nombre et la structure des chromosomes (EVANS *et AL.*, 1984). Il peut y avoir, dans le génome des plantes des inversions, des délétions d'une copie d'un gène, une duplication d'un gène ou des crossing-over méiotiques. Des mutations nucléaires peuvent également affecter les gènes. Il peut aussi y avoir des changements au niveau de l'ADN cytoplasmique suite des mutations ou à un tri des organites (EVANS *et AL.*, 1984).

Chez les plantes issues de l'androgenèse, la variabilité gamétoclonale est principalement causée par des variations nucléaires et cytoplasmiques déjà présentes dans les microspores (CHALEFF, 1983). Les plantes d'orge régénérées en culture d'anthères peuvent être haploïdes, diploïdes ou tétraploïdes. Ces variations génotypiques peuvent s'exprimer phénotypiquement ou se caractériser par une réduction de la fertilité (EVANS *et AL.* 1984).

SNAPE *et AL.* (1988) rapportent que chez le blé la production d'haploïdes doublés par la méthode bulbosum produit de la variation gamétoclonale, et les réarrangements chromosomiques et les mutations permettent de produire une descendance fertile et viable (LAW *et* WORLAND, 1972).

Les mutations gamétoclonales dominantes ou récessives sont aussi exprimées directement chez les plantes haploïdes doublées, car deux copies identiques de chaque gène sont présentes. Les mutations récessives sont donc plus facilement observables chez les plantes haploïdes ou haploïdes doublées que chez les plantes diploïdes hétérozygotes (EVANS *et AL.*, 1984).

### **III .6.Les facteurs qui influencent la réussite de l'haplodiploïdisation de l'orge :**

Chez l'orge l'obtention de lignées homozygotes grâce aux techniques d'haplodiploïdisation, comme la culture d'anthère, est un enjeu économique important. Cependant ; la production de plantes haploïdes reste soumise à l'influence de plusieurs facteurs à savoir les conditions de culture

des plantes mères, le génotype, le stade cytologique des microspores, la composition des milieux de culture (le pH, le rapport auxine, /cytokine, les éléments nutritifs) et le prétraitement. (CAREDDA *et AL.* 2004).

### III.6.1 Les conditions de culture des plantes mères :

- Les conditions de culture des plantes mères affectent leur état physiologique. Plusieurs travaux ont démontré qu'au cours du processus d'androgenèse, l'état physiologique des plantes mères influence fortement le rendement en embryons et en plantes haploïdes (LAZAR *et AL.*, 1990). Les conditions de culture des plantes mères étudiées le plus souvent sont (OUYANG *et AL.*, 1983): la température de croissance en serre qui varient généralement entre 12 et 15 °C pendant le jour (HOU *et AL.* 1994) avec une réduction de 6 à 8 °C pendant la nuit (KINTZIOS *et FISCHBECK*, 1994).
- la photopériode
- la nutrition (l'apport des éléments nutritifs et l'arrosage).

### III.6.2. Le génotype :

En culture d'anthere, au sein d'une même espèce, il est fréquent d'observer une grande variabilité génotypique pour l'aptitude à produire des haploïdes (LABBANI, 2007). Cette variabilité dans la réponse des génotypes provoque un problème important dans la formation de plantes vertes, d'embryons, et dans la fréquence d'induction de cals. Ce phénomène est observé beaucoup plus chez l'orge (FOROUGH-WEHR *et MIX* 1979 ; LUCKETT *et SMITHARD* 1992) et même chez le blé (ORSHINSKY *et SADASIVAIAH*, 1997).

L'aptitude à l'androgenèse est liée à la constitution génétique du cytoplasme et donc à la variabilité génomique des mitochondries et des chloroplastes (GUHA *et MAHESHWARI.*, 1964). PICARD *et AL.*, (1978) ont démontré, pour quelques variétés de blé, l'effet positif de remplacement du cytoplasme *aestivum* par le cytoplasme *timopheevi*, un remplacement dont résulte une supériorité de rendement androgénétique.

LARSEN *et AL.*, (1991), ont étudié l'impact des gènes sur la régénération de plantes vertes en culture d'anthers en effectuant vingt-deux (22) croisements réciproques et un croisement simple entre quatre variétés à faible capacité de régénération et trois variétés à haute capacité de régénération. L'effet du génotype a eu un impact significatif sur la formation d'embryons et la production de plantes vertes, celui-ci a représenté en effet, 62 à 76% de la variation totale

Les travaux et les recherches de **KNUDSEN et AL. (1989)** montrent qu'il a été possible de subdiviser sept variétés d'orge en deux groupes :

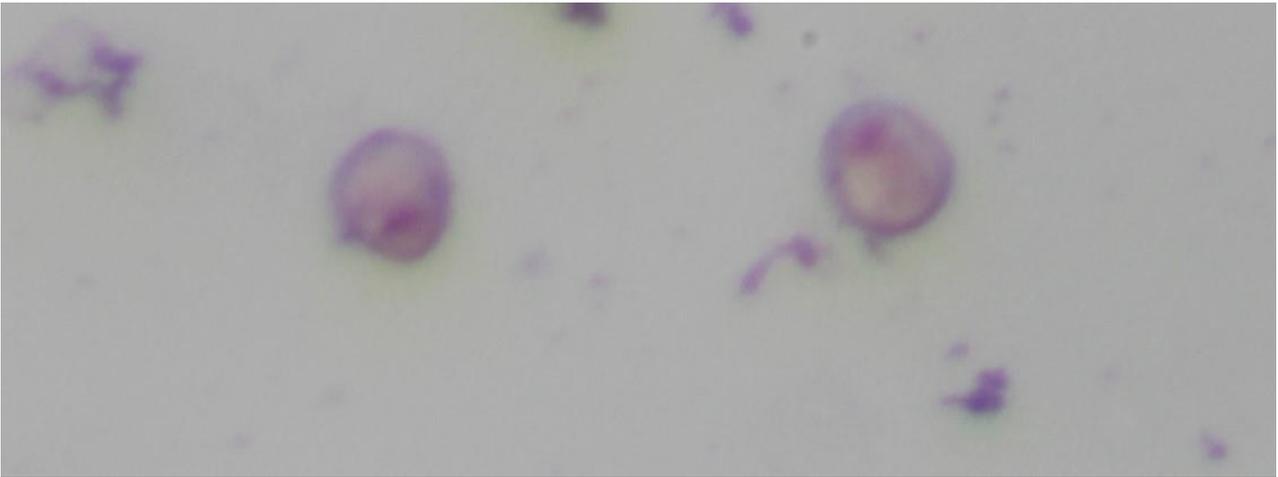
- Le premier groupe possédant une faible capacité de régénération des plantes vertes (5-8%) (l'orge à six rangs).
- Le second possède une capacité élevée de la régénération des plantes vertes (30-40%) (l'orge à deux rangs).

Les orges à deux rangs produisent 8 à 9 fois plus de plantes vertes que les orges à six rangs (**CISTUE et AL., 1999**).

### **III.6.3. Le stade cytologique des microspores :**

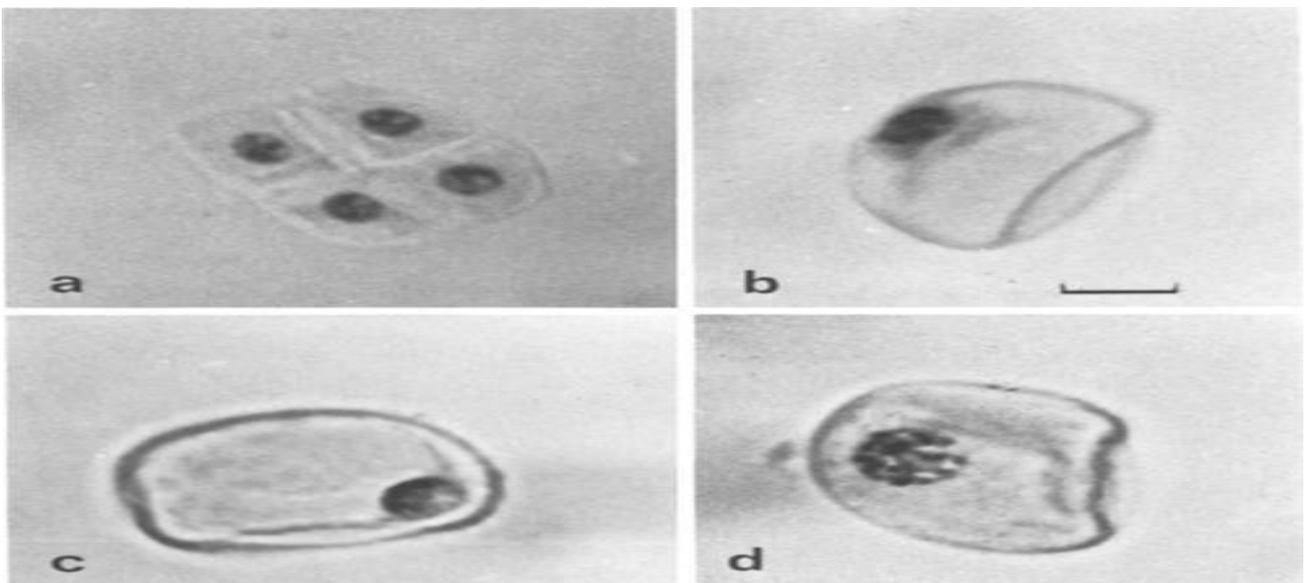
Il existe Une corrélation entre le stade phénotypique de la plante et le stade cytologique de la microspore, le stade favorable est déterminé par le nombre et la position des noyaux là où la microspore correspond au stade uni-nucléé médian à uni-nucléé tardif (**KIRARI, 2013**). La relation entre le stade phénotypique (plante) et le stade cytologique (microspore) dépend du génotype et du milieu. Ce marqueur phénotypique qui permet le repérage de l'épi au bon stade est associé à une distance entre la feuille étendard et l'avant dernière feuille (**RAMLA, 2004**).

Le choix des microspores au stade uni nucléé médian possède une forte influence sur la réponse des anthères à l'induction d'embryons et à la régénération de plantes chez l'orge (**HENTOUR et AL, 2016**). L'observation microscopique permet d'identifier ce stade (Figure 8) (**BRAHMI et AL, 2017**).



**Figure 7 :** Microspores au stade uni-nucléé médian (*BRAHMI et AL, 2017*).

Le développement des microspores passe aux étapes suivantes : a) Tétrade, b) stade uni-nucléé médian, c) microspore au stade uni nucléée plus développée. d) uni nucléé tardif (figure9) (*WHEATLEY et AL. 1986*).



**Figure 8 :** Étapes du développement des microspores chez *Hordeum vulgare* L. (*WHEATLEY et AL. 1986*).

#### **III.6.4. La composition de milieu de culture :**

En culture d'anthère, la composition du milieu de culture pour l'induction et la régénération jouent un rôle essentiel dans la régénération des plantes vertes (**HUSSEIN *et AL*, 2004**). Les premiers milieux déterminés au début des années 1960, les milieux MS (**MURASHIGE et SKOOG 1962**) et LS (**LINSMAIER et SKOOG 1965**). Ces milieux favorisaient la régénération et l'organogenèse des plantes en culture de tissus (**CISTUE *et AL*, 1995**).

**HUSSEIN *et AL.*, (2004)** ont étudié la régénération des plantes sur six compositions de milieux différents en utilisant six génotypes d'orge. Ils ont constaté que la régénération était améliorée séparément en préparant certains composants des milieux de culture. Bien que les milieux soient importants pour obtenir une réponse androgénique positive, la plupart des chercheurs concluent que la fréquence de formation de cals et d'embryons dépend du génotype (**SANCHEZ *et AL*, 2018**).

D'autres facteurs tels que l'état physique du milieu qui peut être solide, semi-liquide ou liquide, son pH, la température d'incubation, la luminosité, le photopériodisme, l'humidité relative de la chambre de culture ont tous été étudiés et on a pu démontrer leur influence sur les processus *in vitro* (**LAZARIDOU *et AL*. 2005**).

Chez l'orge, le milieu FHG mis au point par Hunter (1988) est le plus souvent utilisé en culture d'anthères et de microspores (**SAVASKAN *et AL*. 1999 ; LAZARIDOU *et AL*. 2005**), et aussi Les milieux conformes à ceux de Jacquard *et al* et le milieu de Murashige et Skoog avec quelques modifications (**RAMLA *et AL*.2017**).chez le blé une méthode efficace pour induire la formation d'embryons en grande quantité à partir de microspores isolées. Il s'agit de placer les anthères sur un milieu dépourvu de source carbonée et à la chaleur (37°C) pendant 8heures. Cette technique a permis d'induire la formation d'embryons avec une fréquence plus élevée pour 9 génotypes d'hiver (**TOURAEV *et AL*. 1996**).

Il existe d'autres milieux de cultures utilisés dans le cadre de la production d'haploïdes doublés chez l'orge sont : le milieu C17, le milieu N6, le milieu 190-2, le milieu B5, le milieu W14, et le milieu BAC3.

Ces milieux regroupent les mêmes éléments, Les différences existent dans la concentration des produits utilisés et certains éléments peuvent être remplacés par d'autres (**TAJI et AL.1984**).La composition des milieux doit être optimisée pour différents cultivars car la régénération des plantes vertes / plante albinos est très spécifique au génotype (**KUMARI et AL .2009**).

#### **III.6.4.1. Les sels minéraux :**

D'après **SANGARE(2008)**, les sels minéraux jouent un rôle primordial dans la régénération des plantes vertes en culture *in vitro* d'anthère chez l'orge, ces minéraux sont classés en deux groupes :

- Les macroéléments dont la dose idéale se situe entre 30 et 400 mg/L. Ces macroéléments sont : l'azote(N), le calcium (Ca), le potassium (K), le soufre (S), le magnésium (Mg) et le phosphore (P).
- Les microéléments : les doses à utiliser doivent être faibles, elles varient entre 1/100 à 5/10 de mg/L. Les microéléments sont : le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le magnésium (Mg), le molybdène (Mo) et le bore (B) (**GAUTHERET 1959**).

#### **III.6.4.2. Les substances organiques :**

En culture *in-vitro* d'anthères, les tissus végétaux cultivés ont besoin d'un apport en glucides pour l'activation de leur croissance. Le saccharose, le maltose et le mannitol sont les principales sources de glucides dans ces milieux en raison de leurs effets nutritionnels et osmotiques (**SANCHEZ et AL, 2018**).Le saccharose à des concentrations de 3à5% constitue la meilleure source de carbone utilisée en culture de tissus (**RAZDAN, 2002**).

Chez l'orge, l'utilisation de maltose est l'un des progrès les plus importants pour améliorer le taux de succès de la culture d'anthères (**HUNTER 1988, in SANGARE**).

### III.6.4.3. Les régulateurs de croissance (phytohormones) :

Les phytohormones les régulateurs de croissance (auxines, cytokines, entre autres) jouent un rôle fondamental en affectant grandement le développement de la microspore et en favorisant la division cellulaire dans les embryons et les cals (**SANCHEZ et AL, 2018**).

Les auxines favorisent la duplication des acides désoxyribonucléiques (ADN). Elles agissent suivant la dose et les interactions avec d'autres régulateurs de croissance (**AUGE et AL. 1989**). La dose optimale varie de 0.5 à 2 mg/L (**DEVAUX, 2005**). Si cette dose augmente de (0,1 mg/L à 2 mg/L) elle inhibe l'androgénèse (**COSSETTE, 1982**). Chez l'orge, les auxines ont été employées à basse concentration par rapport à toutes les autres espèces. Et certains cas, l'auxine a été totalement omise en laissant uniquement la BAP (une cytokinine) comme régulateur de croissance (**KIHARA et AL. 1994**). Il existe quatre principales auxines utilisés en culture d'anthère : acide indole-3-acétique (AIA), acide naphthalène acétique (ANA), acide phénylacétique (PAA) et acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4-D) (**Devaux, 2005**). En culture de tissus d'orge l'addition du Cuivre avec le 2,4-D et la benzylaminopurine (BA) dans le milieu permet d'augmenté la régénération des plantes vertes et réduire l'albinisme (**KUMARI et AL ,2009**).

Les cytokinines stimulent la formation des bourgeons et elles ont un effet sur la division cellulaire et la séparation des chromosomes lors de la division cellulaire (**AUGE et AL. 1989**). Chez l'orge, en culture d'anthères, la kinétine ou la BAP sont le plus souvent utilisées à des doses de 0.1 à 1 mg/L (**CAI et AL. 1992**). Les cytokinines utilisées sont : 6- benzylaminopurine (BAP), benzyladénine (BA), zéatine, kinétine, isopentényladéine (2-I- P) (**CAI et AL. 1992**).

### III.6.4.4. Acides aminés :

D'après **SANGARE(2008)**, l'addition des acides aminés aux milieux de culture est importante pour stimuler la prolifération des tissus. Ces acides aminés sont rapidement assimilés par les cellules des plantes. Les acides les souvent utilisés dans les milieux de cultures sont : l'hydrolysate de caséine, la L-Glutamine, L-Asparagine, L-Glycine, L-Arginine et L-Cystéine (**RAZDAN 2002**). Ces composés ne stimulent pas la croissance des cellules lorsqu'on les utilise séparément (**SANGARE, 2008**).

#### III.6.4.5. Les vitamines :

En culture *in vitro*, quelques vitamines essentielles sont synthétisées, mais en quantités insuffisantes, pour cela des compléments en vitamines sont nécessaires pour assurer une meilleure croissance des tissus (SANGARE, 2008). En culture de tissus les vitamines du groupe B sont les plus utilisées (GAUTHERET 1959) et dans ce groupe, la thiamine joue un rôle essentiel (GAMBORG *et AL.* 1976).

#### III.6.4.6. Les agents gélifiants :

D'après SANGARE(2008), les agents gélifiants sont utilisés pour préparer des milieux de culture semi-liquides ou solides. Dans un milieu totalement liquide et dépourvu d'agent gélifiant, les tissus sont submergés et meurent en raison du manque d'oxygène. Il existe plusieurs types de gélifiants : Agar, Gelrite, Ficoll, Phytigel.

#### A /Les milieux solides :

En androgenèse, l'état physique du milieu de culture *in vitro* est très important. Il influence la différenciation, l'embryogenèse et la régénération des plantes vertes. Le premier milieu de culture d'anthères, décrit par MURASHIGE et SKOOG (1962) est un milieu de type solide. Les agents de solidification les plus utilisés sont l'agar, l'agarose, l'agar noble et le Gelrite L'utilisation des milieux solides présente plusieurs inconvénients. Parmi lesquelles : La solidification des milieux freine le phénomène de diffusion, ce qui limite le mouvement des éléments nutritif vers les anthères et les embryons (JOHANSSON, 1986). Les milieux solides sont toutefois préférés à cause de leur faible coût de production.

L'agar est l'agent gélifiant le plus communément utilisé, mais celui-ci contient des substances qui inhibent l'androgenèse (SORVARI, 1986). Le milieu solide entraîne aussi une accumulation et une concentration de substances inhibitrices autour des anthères (JOHANSSON, 1986).

Ces substances inhibitrices peuvent être éliminées par l'ajout de charbon activé dans le milieu d'induction (ÉBERT *et AL.*, 1993). Le charbon activé adsorbe plusieurs composés des milieux de culture *in vitro*. Il adsorbe le 6-benzylaminopurine (BAP) et l'acide 2'4'-dichlorophénoxyacétique (2.4-D) et en diminue la concentration dans le milieu de culture (ÉBERT *et AL.*, 1993). En culture d'anthères d'*Anemonacandensis L.*, le charbon activé adsorbe l'ABA présent dans les anthères (JOHANSSON *et AL.*, 1982).

Le charbon activé adsorbe aussi les phénoliques produits par les tissus des anthères, des microspores, des embryoïdes ou même des cals en dégénérescences, et il n'adsorbe pas certaines substances, qui sont favorables à l'androgenèse (JOHANSSON, 1986).

### **B/Le milieu liquide :**

La culture en milieu liquide ajoute cependant un problème supplémentaire : les cellules immergées se retrouvent en condition d'anaérobie et l'accumulation de lactate et d'acides organiques contribuent à la régénération de plantules albinos (JACQUARD, 2007).

Les milieux liquides sont plus efficaces que les milieux solidifiés à l'agar pour la formation de cals en culture d'anthères chez l'orge (SORVARI, 1986). Par contre, les embryons produits en milieux d'induction liquides ont une aptitude plus faible à la régénération et ils régénèrent plus de plantes albinos que ceux produits sur des milieux solidifiés à l'agar (ZHOU *et AL.*, 1991). Le faible taux de régénération obtenu avec les milieux liquides provient de l'absence d'oxygène (conditions anaérobies) auxquelles les embryons sont confrontés au cours de leur développement (ZHOU *et AL.*, 1991). Les milieux de culture liquides produisent un taux élevé de cals ou d'embryons, dont une grande partie arrête cependant de se développer et meurt. Les causes principales de la mort de ces structures sont aussi les conditions d'anaérobies (Xu, 1990). Généralement, dans un milieu liquide des anthères et des microspores les tissus sont exposés à une faible teneur en oxygène, ce qui entraîne la production de l'acide lactique et des alcools déshydrogénases qui endommagent la structure interne et l'ADN des plastes, conduisant à la régénération des plantes albinos (KUMARI *et AL.*, 2009). Ce problème limite donc l'utilisation des milieux liquides en culture d'anthères (KAO, 1981). L'utilisation d'un milieu de culture liquide nécessite un ajustement du nombre d'anthères par unité de volume (JOHANSSON, 1986).

### **C/Les milieux semi-liquides :**

KAO (1981) ajoute du Ficoll (un polymère neutre) au milieu d'induction liquide pour obtenir un nouveau type de milieu pour la culture des anthères d'orge. L'utilisation du Ficoll comme agent gélifiant permet d'obtenir un milieu semi-liquide très favorable à la production d'embryons et de plantes (CISTUE *et AL.*, 1999).

Cet élément augmente la pression osmotique et la densité du milieu qui devient plus visqueux et empêche ainsi la noyade et l'asphyxie des anthères, des microspores, embryons ou des cals. L'ajout de Ficoll (40%) et d'une teneur élevée en saccharose (4,5%) au milieu d'induction a permis d'augmenter la proportion de plantes vertes de 0% à 50% (Kumari *et al.*, 2009). En culture d'anthères de blé, l'addition de 200g/l de Ficoll au milieu d'induction augmente la densité du milieu, le pourcentage de cals et le ratio plantes vertes/ plantes albinos (Zhou *et al.* 1992).

### **III.6.5. Le prétraitement :**

Le prétraitement des anthères permet de changer la voie d'orientation des microspores d'un programme gamétophytique vers un programme sporophytique et menant à la dédifférenciation cellulaire et la formation d'un embryon (**MARASCHIN *et AL.* 2005**). Le prétraitement des épis serait donc fortement impliqué dans l'amélioration de l'efficacité de la culture d'anthères (**KRUCZKOWSKA *et AL.* 2002**).

#### **III .6.5.1.Prétraitement au froid :**

Les basses températures peuvent stimuler ou inhiber l'effet d'androgénèse et la production des plantes vertes ou parfois n'avoir aucun effet. Cette influence a été évaluée chez plusieurs génotypes (**XU ET SUNDERLAND, 1984**). Le froid affecte la réplication de l'ADN des microspores. Après le passage au froid, les microspores se divisent rapidement et de façon synchrone ce que favorisent leurs développements sporophytique. (**SUNDERLAND ET COLL, 1984**).

D'après **POWELL (1988)** le prétraitement des épis à 4°C pendant 14 jours produit une amélioration considérable dans la production des plantes vertes, la réactivité des anthères progresse également de 3% à 52%.

L'efficacité du froid varie selon la durée du traitement, la température à laquelle il est effectué, l'espèce, le génotype, l'état et la qualité des plantes mères (**XU ET SUNDERLAND, 1984**).

#### **III.6.5.2. Le prétraitement au mannitol :**

Le prétraitement au mannitol stimule l'androgénèse chez l'orge. Il existe une relation positive entre la concentration en mannitol du milieu de prétraitement et le nombre de plantes vertes régénérées en androgénèse *in vitro* (**CISTUE *et AL.*, 1994**). Le prétraitement au mannitol permet d'augmenter le ratio plantes vertes/plantes albinos. **CISTUE (1994)** rapporte que le meilleur prétraitement consiste à placer les anthères trois jours sur un milieu contenant une concentration de 0,7 M de mannitol. Chez l'orge un prétraitement du matériel végétal de 4 jours à 25°C sur un milieu contenant 32 g/l de mannitol est supérieur en régénération des plantes vertes à un prétraitement de 14 jours à 4°C sur le même milieu (**ROBERTS- OEHLISCHLAGER ET DUNWELL, 1990**). Le mannitol stimule l'absorption du sucre ; une grande concentration de glucose s'accumule dans les tissus de l'anthère pendant le prétraitement au mannitol (**ROBERTS-OEHLISCHLAGER ET DUNWELL,1990**).

Chez *N. tabacum*, un prétraitement de deux jours au mannitol (0,5 M) provoque un stress hydrique qui stimule la formation de plantes (HARADA et IMAMURA, 1982). Donc les effets du mannitol varient en fonction de l'espèce végétale utilisée, de la durée, la température, et de la concentration en mannitol dans le milieu de prétraitement (CISTUE et AL., 1994).

### III.6.5. 3. Le prétraitement au mannitol et au froid :

Chez l'orge le prétraitement des épis au mannitol et au froid semble retarder la division nucléaire et permettre la régénération de plantes vertes (KASHA et al. 2001). CHLYAH et SAIDI (1991) rapportent qu'en combinant l'action du choc osmotique (le traitement au mannitol) et du choc thermique (le traitement au froid), l'effet du froid est optimal pour une durée d'application de deux jours au lieu de huit jours quand le froid est appliqué seul. il existe une sorte de synergie entre ces deux types de traitements.

### III.7. Exemple de l'application de la culture en Algérie :

Les travaux consultés, montrent que la culture d'anthères a fait l'objet de plusieurs applications en Algérie. Ainsi, nous pouvons citer les essais menés par MAMECHE et MENAD (2008), AKROUR et BOUCHEKKOUT (2011), KIRARI FATMA (2013), BAKIR IMENE (2013) et RAMLA (2017). Ces essais ont été menés respectivement sur les trois hybrides d'orge (*Esterel x Ras El Mouch* ; *Saida x Express* ; *Saida x Rihane*), les cinq hybrides (*Saida x Exito* ; *Saida x Plaisant* ; *Saida x Express* ; *Saida x Esterel*), sur l'hybride (*Express x Ras El mouche*), l'hybride (*Ras El mouche x Express*) et les deux hybrides (*Tichedrett x Express* et *Tichedrett x Plaisant*).

Il y a lieu de signaler que tous ces hybrides sont issus de croisements entre variétés locales (*Saida*, *Tichedrett*, *Ras El mouche*) et variétés introduites (*Esterel*, *Express*, *Rihane*, *Exito* et *Plaisant*).

Au cours de ces essais, dans l'objectif d'optimiser la technique et d'augmenter son rendement (augmentation du pourcentage en plantes verte régénérées), les auteurs se sont intéressés à l'étude de deux facteurs : **le génotype et le prétraitement.**

**Concernant les prés traitements testés, MAMECHE I et MENAD DJ., (2008)** ont soumis les épis des hybrides utilisés (*Esterel x Ras El Mouch ; Saida x Expres ; Saida x Rihane*) à 4°C pendant 21 et 28 jours. **AKROUR et BOUCHEKKOUT (2011)** ont prétraité les épis des hybrides utilisés à 4°C pendant 07, 21, 28 et 35jours. Les épis de l'hybride (*Ras El mouche x Express*) ont été soumis à 4 °C pendant 7 et 21 jours (**BAKIR IMENE 2013**). **RAMLA (2017)** a utilisé sur **les épis des hybrides** hybrides (*Tichedrett x Express et Tichedrett x Plaisant*) un prétraitement de 21 et 28 jours à 4°C. Enfin **KIRARI FATMA (2013)** a prétraité les anthères isolées au mannitol (trois concentrations : 0M ; 0,3M ; 0,7M) et au froid (4°C) pendant 4 jours.

Tous ces essais, ont en effet porté sur l'étude de l'effet des génotypes utilisés et des prétraitements au froid sur la culture d'anthères.

### **Les résultats obtenus par ces auteurs :**

**MAMECHE et MENAD** ont montré que les trois hybrides ont réagi tous de la même manière et il n'y a eu aucune différence significative entre les réponses des trois hybrides, aucun effet génotype n'a donc été mis en évidence. Par contre, il y'a eu une différence significative entre les deux durées de traitement au froid (21 et 28 jours) sur la réaction des anthères en culture. Pour la moyenne des trois génotypes, le taux de formation de cals le plus élevé est obtenu pour la durée de traitement au froid de 21 jours avec une moyenne de (29,70%) comparativement au taux obtenu pour 28 jours de prétraitement (18,54%). Le taux d'induction obtenu pour l'hybrides *Saida x Express* est de (23,54%). Les résultats obtenus lors de la phase de régénération montre qu'il y'a un effet significatif du génotype sur la régénération des plantes vertes et albinos. Pour la régénération des plantes vertes, l'hybride *Esterel x Ras El Mouch* a donné le taux le plus élevé de plantes vertes. Pour les plantes albinos, le taux le plus élevé a été obtenu par l'hybride *Saida /Express*.

**BAKIR (2008)** observe, pour **07 jours** de prétraitement au froid, **731** anthères réactives sur les 3600 mises en culture. Ceci représente ainsi un taux de réactivité, ayant donné des néoformations, de **19,03%**. Pour le prétraitement au froid de **21 jours**, **2040** anthères ont été mises en culture et **249** anthères, représentant **27,7%**, ont réagi positivement et données des néoformations. Le taux total de la réponse androgénique est de : AR= **23,4%**. Cependant, l'analyse de la variance a révélé un effet non significatif des différentes durées de prétraitement au froid. Pour l'étude de **RAMLA**, Le taux moyen d'induction de néoformations (cals et/ou embryons) obtenu dans le cadre de cet essai de production d'HDs, pour les deux hybrides est de 17,8 %, le taux le plus élevé a été obtenu à partir de l'hybride *Tichedrett x Express* (20,48 %) alors que 11,81 % d'induction est obtenu par *Tichedrett x Plaisant*.

**AKROUR et BOUCHEKKOUT (2011)** ont observé pour la durée de 21 jours de traitement au froid, que l'hybride (F1) **Saïda × Esterel** présente le pourcentage d'anthères réactives le plus élevé alors que le pourcentage le plus faible a été obtenu par l'hybride (F1) **Saïda × Plaisant**. Pour la durée de traitement de 28 jours, l'hybride (F2) **Saïda × Esterel** a montré le pourcentage le plus élevé et l'hybride (F1) **Saïda x plaisant** a présenté le pourcentage le plus bas. Pour la durée de 35 jours, l'hybride (F1) **Saïda x Plaisant** a permis d'obtenir le pourcentage le plus élevé alors que l'hybride (F1) **Saïda x Esterel** a donné le pourcentage le plus bas. Le classement des moyennes d'induction obtenues pour les différentes durées de traitement au froid montre que 28 jours de traitement est la durée qui a permis l'obtention du plus haut pourcentage moyen de réactions en comparaison avec les moyennes obtenues pour 21 et 35 jours de traitement. Toutefois, ces auteurs indiquent, que la mise en évidence d'un effet très hautement significatif de l'interaction entre le génotype et la durée du traitement au froid ne permet pas de mettre en évidence une seule durée de traitement optimale pour l'ensemble des génotypes, quant à la réponse des anthères à la culture. Ainsi pour l'hybride (F1) **Saïda x Plaisant**, ils constatent que le meilleur résultat a été obtenu pour la durée de traitement au froid de 35 jours.

Dans son essai, **KIRARI FATMA (2013)** obtient pour le traitement (0 M de mannitol à 4°C) 375 anthères réactives qui régénèrent 135 plantes soit un taux de (36%). Pour le traitement (0,7 M de mannitol à 4°C), 711 anthères réactives sont obtenues, elles permettent la régénération de 358 plantes soit (50,3%), 156 plantes étaient vertes (31 %) et 202 albinos (28,3%). L'analyse de la variance a montré un effet significatif du traitement en mannitol.

### III.8. Proposition du protocole :

Le protocole proposé ici, est celui que nous proposons de réaliser si l'état sanitaire n'avait pas imposé un confinement nous obligeant à l'arrêt de notre expérimentation.

### Matériel et Méthodes

#### III.8.1. Le matériel végétal :

Le matériel végétal qui devait être étudié au cours de notre expérimentation est composé de trois variétés locales d'orge (*Hordeum vulgare L.*) : Saida ; Tichedrett, et El- Fouara (tableau 3).

Les trois variétés existent dans le programme national de multiplication de semences.

**Tableau 3 :** Fiches descriptive des variétés étudiées

Variétés	Description
Saida	<ul style="list-style-type: none"><li>- Obtenteur : ITGC de Saida 183</li><li>- Pedigree : sélection dans la population locale</li><li>- Origine : locale</li><li>- Demandeur : ITGC</li><li>- Type de variété : lignée pure</li></ul>
El Fouara	<ul style="list-style-type: none"><li>- Obtenteur : ITGC de Sétif</li><li>- Pedigree : Deir Alla 106/strain 205//Gerbel ICB 85-1376-0AP-2AP</li><li>- Origine : ICARDA(Syrie)</li><li>- Demandeur : ITGC</li><li>- Type de variété : lignée pure</li></ul>
Tichedrett	<ul style="list-style-type: none"><li>- Obtenteur : ITGC de Sétif</li><li>- Pedigree : C95203S F4N°21 1998/99</li><li>- Origine : station de l'amélioration des plantes en 1931</li><li>- Demandeur : ITGC</li><li>- Type de variété : lignée pure</li></ul>

### **III.8.2 Méthodes :**

#### **III.8.2.1. Semis :**

Les pots utilisés à un volume de 2 L. Les pots sont remplis d'un mélange de terre, sable et terreau, pour une proportion de (1 :1 :1). Ces pots présentent des trous de drainage afin d'évacuer l'excès d'eau d'irrigation. Le semis des graines de chaque variété a été effectué manuellement à une profondeur d'environ 1 cm. à raison de 5 graines par pot. Trois semis échelonnés ont été effectués.

#### **III.8.2.2. Irrigation**

L'irrigation devrait se faire régulièrement de façon rigoureuse.

#### **III.8.2.3. Désherbage**

Le désherbage devrait se faire à chaque reprise des mauvaises herbes.

#### **III.8.2.4. Protocole de la phase *in vitro***

#### **III.8.2.5. Prélèvement des épis**

Le stade du prélèvement des épis doit être déterminé sur la base de critères cytologiques (**BRAHMI *et AL*, 2017**). Quand ce stade cytologique requis est déterminé, les épis sont prélevés tôt le matin.

- **Critères cytologiques**

L'induction d'embryons et à la régénération de plantes est fortement liée à l'utilisation des microspores au bon stade, à savoir le stade uni nucléé médian. Les épis qui renfermant des microspores au stade uni nucléé médian seulement devaient être prélevés et gardés pour la mise en incubation de leurs anthères (**BRAHMI *et AL*, 2017**).

Ainsi pour déterminer ce bon stade nous aurions, sur un épi récolté, prélevé un épillet central, puis les trois étamines sont fixées et colorées dans le mélange du carmin acétique, elles sont ensuite écrasées entre lame et lamelle afin de dissocier les cellules les unes des autres et libérer les microspores. Le stade des microspores est alors observé au microscope (x 40).

### III.8.7.3.Prétraitement des épis

Les prétraitements proposés :

- Traitement au froid ; les épis sont prélevés, non dégagés de la gaine de la dernière feuille, enroulés dans du papier filtre imbibé d'eau et du papier aluminium et mis au réfrigérateur à 4°C pendant 21 jours à l'obscurité, 28, 35 et 40 jours
- Les épis sont dégagés de la gaine, ébarbés et déposés dans des boîtes de Pétri contenant une goutte d'eau. Ces boîtes sont fermées avec du parafilm puis placées dans un réfrigérateur à 4°C pendant 3 à 4 semaines. Car le prétraitement au froid produit une amélioration considérable dans la production des plantes vertes (**LTIFI et AL., 2017**).
- Prétraitement au mannitol : les anthères sont incubées dans des boîtes de Pétri contenant du mannitol à 0.7M pendant 3 jours à 25 °C (**FERDAOUS et AL., 2013**).
- Prétraitement au CuSO<sub>4</sub> .5H<sub>2</sub>O et mannitol : les anthères sont incubées dans une solution contenant (5.0 mg L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> .5H<sub>2</sub>O et 62 g L<sup>-1</sup> de mannitol) et placées à l'obscurité, à 4°C pendant 4 jours (**SRIDEVY et AL., 2015**).

### III.8.7.4.Mise en culture d'anthères *in vitro*

Pour les milieux d'induction et de régénérations nous proposons d'utiliser le milieu utilisé par (**RAMLA., 2017**) qui conformes à ceux de **JACQUARD et AL. (2006)** avec deux modifications : le remplacement de la thiamine-HCL par les vitamines FHG et l'agarose par du phytigel (3g/l). Le milieu de développement est le milieu de **MURASHIGE et SKOOG (1962)** modifié (la concentration en sel est diminuée de moitié et addition de 0,5 mg/l d'acide indol- butyrique (AIB) et de 3 g/l de phytigel).

Après prétraitement, les anthères sont mises en culture dans des boîtes de Pétri contenant du milieu d'induction (tableau 4), à raison de trente anthères par boîte de Pétri de 5 cm de diamètre. Les boîtes Scellées avec Parafilm doivent être maintenues dans une chambre de culture à 26 ± 2 ° C, à l'obscurité pendant 21-28 jours.

## Régénération des plantules haploïdes

Les anthères, qui auraient montré des réponses, contenant des embryons ou du cal sont collectées et transférées sur le milieu de régénération (**tableau4**).

**Tableau.4** : Composition des milieux de culture d'anthères chez l'orge

Composantes du milieu		Milieu MS	Milieu d'induction	Milieu de régénération	Milieu de développement
Sels et bases	<b>Microelements</b>	<b>Macro MS</b>	<b>Macro FHG</b>	<b>Macro FHG</b>	<b>MS</b> <sup>1/2</sup>
	-KNO <sub>3</sub>	1900 mg/l	1900 mg/l	1900 mg/l	
	-NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 mg/l	165 mg/l	165 mg/l	
	-CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440 mg/l	440 mg/l	440 mg/l	
	-MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370 mg/l	370 mg/l	370 mg/l	
	-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/l	170 mg/l	170 mg/l	
	<b>Microelements</b>	<b>Micro MS</b>	<b>Micro FHG</b>	<b>Micro FHG</b>	
	-KI	0,83 mg/l	0,83 mg/l	0,83 mg/l	
	-MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3 mg/l	22,3 mg/l	22,3 mg/l	
	-ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6 mg/l	8,6 mg/l	8,6 mg/l	
	-Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25 mg/l	0,25 mg/l	0,25 mg/l	
	-CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l	0,025 mg/l	0,025 mg/l	
	-CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l	2,5 mg/l	2,5 mg/l	
	-H <sub>3</sub> Bo <sub>3</sub>	6,2 mg/l	6,2 mg/l	6,2 mg/l	
	<b>Fer</b>	<b>FerMS</b>	<b>Fer MS</b>	<b>Fer MS</b>	
	-FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8 mg/l	27,8 mg/l	27,8 mg/l	
	-Na <sub>2</sub> EDTA	37,3 mg/l	37,3 mg/l	37,3 mg/l	
Source de carbone	Maltose	-	62 g/l	-	-
	Sucrose	30 g/l	-	30 g/l	<b>30 g/l</b>

Source d'acides amines	Glutamine	100 mg/l	752 mg/L	752 mg/l	-
Polyols	Myo-inositol	100 mg/l	100 mg/l	100 mg/l	<b>100 mg/l</b>
Vitamines	Thiamine Nicotinicac id Pyridoxine	0,1mg/ 1 0,5mg/ 1 0,5- mg/l	0,4mg/ 1 0,5mg/ 1 0,5mg/ 1	0,4 mg/l 0,5 mg/l 0,5 mg/l	<b>Vitamines MS</b>
Hormones  -auxines	NAA A/B	- -	2mg/l -	0,4 mg/l -	<b>0,5mg/l</b> -
-cytokinins	BAP	-	0,4mg/l	0,4 mg/l	-
Agent osmotique	Mannitol	-	32g/l	32g/l	-
Agent gélifiant	phytagel	-	3 g/l	3g/l	<b>3g/l</b>

**Mameche et Menad (2013).**

### **III.8.7.5. Analyse statistique des résultats :**

Analyse de l'effet des génotypes, utilisés dans cet essai, et des différents prétraitements sont réalisés sur les paramètres :

- Pourcentage d'anthères réactives à travers le nombre d'embryons et de cals induits.
- Pourcentages de plantules régénérées (total, verte et albinos), ils doivent être établis par rapport au

nombre total d'anthères mises en culture.

Le traitement statistique des données expérimentales est réalisé par une analyse de variance à deux facteurs. La comparaison des moyennes, si l'effet est significatif, est abordée avec le test de la plus petite différence significative (PPDS) à 5% avec un programme d'analyse statistique. Ces analyses permettront d'analyser l'influence du génotype et des prétraitements.

## CONCLUSION

Notre étude a porté sur l'optimisation de quelques paramètres d'obtention des haploïdes doublées chez trois variétés locales d'orge (Saida, Tichedrett, Fouara). Mais à cause de la propagation de la maladie de covid-19-que Dieu nous protège-, la pratique a été annulée. Nous avons donc dû modifier notre thème, comme nous l'avons annoncé dans le résumé, nous avons consulté les mémoires et travaux disponibles, qui traitaient des moyens d'améliorer le processus de culture d'anthères de l'orge, afin d'en extraire le protocole le plus efficace que nous aurions mis en œuvre.

L'haplo diploïdisation est une technique très importante pour la création variétale et amélioration des plantes, qui permet d'obtenir des lignées homozygotes en un temps plus court. Cette dernière possède plusieurs techniques parmi lesquelles la culture d'anthère qui passe par plusieurs étapes (l'obtention des plantes mères, le prélèvement des épis, les prétraitements, la mise en culture des anthères, la phase d'induction et la régénération). D'autre part le génotype joue un rôle très important dans la proportion de régénération des plantes vertes et albinos.

Par conséquent, il est nécessaire de mener des expérimentations et des essais qui permettent de tester et d'analyser les différents les facteurs qui influencent cette technique et ce pour optimiser son rendement, tel avait été notre objectif.

## Références bibliographiques

-A-

**ABBAS, K. A. ABDELGUERFI. 2008.** Evaluation of a regenerated natural meadow in a semi -arid area of Algeria. Option Méditerranéenne série A. 79 : 179-185.

**ADJABI A., H. BOUZERZOUR, A. BENMAHAMMED. 2014.** Stability analysis of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) grain yield. Journal of Agronomy, 13: 131-139.

**AIT ABDALLAH F., 1989.** Essai d'obtention des plantes haploïdes d'orge F1 par la méthode <<Bulbosum>> et comparaison des variétés parentales. Mém, doctorat, phytotechnie.

**AIT SALAH B, 2005.** Etude phenologique et sélection de quelques variétés du blé dur introduites et cultivées dans plusieurs environnements. Mém. Magister. Université Saad Dahlab de Blida faculté des sciences agronomiques et vétérinaires. Algérie, 99p.

**AKROUR I et BOUCHEKKOUT I, 2011.** Analyse de l'effet de génotype et du traitement au froid sur la réponse à la culture d'anthers de quelques hybrides d'orge (*Hordeum vulgare* L.) issus de la variété locale Saïda. Mém, Production végétales et amélioration des plantes. Univ, Saad Dahleb Blida, Algérie, P 21-42.

**ANDERSEN SB, DUE IK, OLSEN A (1987)** the response of anther culture in a genetically wide material of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant. Breed. 99:181–186.

**ANNONYME, 2016.** <http://www.agro.basf.fr>

**ARAUS, J.L., SLAFER, G.A., REYNOLDS, M.P., AND ROYO, C. (2002).** Plant Breeding and Drought in C3 Cereals: What Should We Breed For. Ann. Bot. 89, 925–940. 41

**ARBOUCHE H.S., ARBOUCHE Y., ARBOUCHE F., ARBOUCHE R., (2008).** Valeur nutritive de quelques variétés d'orge algériennes pour l'alimentation des ruminants. Recherche agronomique. n° 22. PP 67-72.

**ASAKAVIČIŪTĖ R, JACQUARD C, CLEMENT C (2006)** Study of chlorophyll a and b in etiolated and androgenic plants of barley (*Hordeum vulgare* L.). JSPB. Two: 10–15.

**ASAKAVIČIŪTĖ R, PAŠAKINSKIENĖ I (2006)** Androgenises in anther culture of Lithuanian

spring barley cultivars. *Biologija* 4:37–40

**AUGE R, BEAUCHESNE G, BOCCON J, GIBOD L, DECOURTYE B, DIGAT R, JALOUZOFT R, MINIER JP, REYNOIRD D, STRULLU G, VIDALIE H (1989)** La culture in vitro et ses applications horticoles. (ed.). Technique et documentation Lavoisier, Paris, 225 p.

**-B-**

**BAKIR I, 2013.** Influence du Prétraitement des Anthères au Froid sur la Réponse Androgénétique d'un Hybride d'Orge (Express X Ras El Mouch) F2. Mém, Production et amélioration des plantes. Univ, Saad Dahleb Blida, Algérie, p 22-37.

**BENMAHAMMED A., 2004.** La production de l'orge et possibilités de développement en Algérie. *Céréaliculture*, n° 41, 1er semestre. PP 34 - 38.

**BESSAOUD O. (1997).** Le paradigme de l'agriculture coloniale et la modernisation au Maghreb. *Options méditerranéennes*, Sér. A/n° 29. PP 129-137.

**BESSAOUD O. (1999).** L'Algérie agricole : de la construction du territoire à l'impossible émergence de la paysannerie. *Revue d centre de recherche en Anthropologie sociale et culturelle « INSANIYET »*. n° 7. Janvier - avril 1999. Oran. Algérie. 30 p. 42.

**BOHANEK, B. (2009).** Doubled Haploids via Gynogenesis. In *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, D.A. Touraev, D.B.P. Forster, and D.S.M. Jain, eds. (Springer Netherlands), pp. 35-46.

**BONJEAN A (1995)** L'orge revisitée. *Biofutur*, juillet août 147:28–32.

**BONNEUIL CHRISTOPHE, DEMEULENAERE ELISE, 2007.** Une génétique de pair à pair L'émergence de la sélection participative In : F. Charvolin, A. Micoud et L. K. Nyhart.

Les sciences citoyennes. Vigilance collective et rapport entre profane et scienti\_que dans les sciences naturalistes, Ed. De l'Aube, pp.122-147. <hal-00175991>.

**BOUCHETAT F, et AISSAT A, 2018.** Analyse génétique de quelques génotypes d'orge (*hordeum vulgare l.*) Et de leurs descendants en vue d'une évaluation de quelques caractères a intérêt agronomiques. Vol 8(1) pp ou : 792-801.

**BOULAL H, ZAGHOUANE O, EL MOURID M, REZGUI S., 2007.** Guide pratique de la conduite des céréales d'automne (blé et orge) dans le maghreb (Algerie, Maroc, Tunisie). ITGC, INRAA, ICARDA. 176 P.

**BOURGIN JP, NITSCH JP (1967)** Obtention de *Nicotiana* haploïds à partir d'étamines cultivées in vitro. *Ann. Physiol. Veg.* 9:337–382.

**BRAHMI et al. , (2017).** Création de lignées haploïdes doublées d'orge (*Hordeum vulgare*) tolérantes à la sécheresse par culture d'anthers. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology, CSIEA* (35), 2870-2876.

**BRISIBE EA, OLESEN A, ANDERSEN SB (1997)** Characterization of anther culture-derived cell suspensions exclusively regenerating green plantlets in wheat (*Triticum aestivum L.*). *Euphyt.* 93:321–329.

**-C-**

**CAI Q, SZAREJKO I, POLOK K, MALUSZYNSKI M (1992).** The effect of sugars and growth regulators on embryoid formation and plant regeneration from barley anther culture. *Plant. Breed.* 109:218–226 43

**CAREDDA S, CLEMENT C (1999)** Androgenesis and albinism in Poaceae: influence of genotype and carbohydrates. P. 211–228 In: Clément C, Pacini E, Audran JC (eds). *Anther and Pollen: from biology to biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg, Tokyo.

**CAREDDA S, DEVAUX P, SANGWAN RS, PROULT I, CLÉMENT C. 2004.** Plastid ultrastructure and DNA related to albinism in androgenetic embryos of various barley (*Hordeum vulgare*) cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76: 35-43.

**CASTILLO, A.M., AND CISTUÉ, L. (1993).** Production of gynogenic haploids of *Hordeum vulgare L.* *Plant Cell Rep.* 12, 139–143.

**CASTILLO AM, CISTUÉ L, ROMAGOSA I, VALLÉS MP (2001)** Low responsiveness of six-rowed genotypes to androgenesis in barley does not have a pleiotropic basis. *Genome* 44:936–940.

**CECCARELLI, S., S. GRANDO, A. IMPIGLIA. 1998.** Choice of selection strategy in breeding barley for stress environments. *Euphytica*, 103 : 307-318.

**CHEN, F.Q., AND HAYES, P.M. (1989).**A comparison of *Hordeum bulbosum*-mediated haploid production efficiency in barley using in vitro floret and tiller culture. *Theor. Appl. Genet.* 77, 701–704.

**CHALEFF, R.S., 1983.** Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. *Science* 219: 676-682.

**CHLYAH H, SAIDI N (1991)** Analyse des capacités androgénétiques de génotypes marocains de

*Triticum durum*. P. 135-148 In : AUPELF-UREF (ed). L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides. Paris.

**CHLYAH H., CHERKAOUI S., SAIDI N., LAMSAOURI O., MDARHI-ALAOUI M., CHLYAH O., BENKIRANE H., AMAIL O., CHLYAH A.B., IN : HAMON SERGE (ED.). PARIS (FRA) ; Journées Scientifiques du Réseau AUF : Biotechnologies Végétales : 44 Amélioration des Plantes et Sécurité Alimentaire, 7. Montpellier (FRA), ISBN 2-7099-1472-7 (2001) 235-254.**

**CISTUÉ, L., RAMOS, A., CASTILLO, A.M., AND ROMAGOSA, I. (1994).** Production of large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol. *Plant Cell Rep.* 13, 709–712.

**CISTUÉ L, ZIAUDDIN A, SIMION E, KASHA KJ (1995).** Effects of culture conditions on isolated microspore response of barley cultivar Igri. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 42:163–169.

**CLEMENT J M, MAZOYER M., 2002.**Le monde paysan aux XX le siècle-Larousse agricole. Larousse. Paris. PP : 766.

**COSSETTE F (1982)** La production de lignées d'orge haploïdes et diploïdes homozygotes par culture d'anthères. Mémoire de maîtrise, Université Laval. 96 p.

**CISTUÉ L, RAMOS A, CASTILLO AM (1999)**Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 55:159–166.

**CISTUÉ L, VALLES MP, ECHAVARRI B, SANZ JM, CASTILLO A (2003)** Barley anther culture. P. 29–34. In: Maluszynski M, Kasha K, Forster BP, Szarejko I (eds.). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Kluwer Academic, Dordrecht.

**COMEAU A, NADEAU P, PLOURDE A, SIMARD R, MAÈS O, KELLY S, HARPER L, LETTRE J, LANDRY B, ST-PIERRE CA. 1992.**Media for *in ovulo* culture of pro-embryos of wheat and wheat derived interspecific hybrids and haploids. *Plant. Sci* 81: 117-12.

**-D-**

**DEVAUX P, PICKERING R (2003)** Haploids in the improvement of Poaceae. P 215–242 in: Palmer CE., Keller WA., and Kasha KJ (eds.). Haploids in Crop Improvement II, Series: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

**DEVAUX P, PICKERING R (2005)** Haploids in the improvement of Poaceae. P 215–242 in: Palmer CE., Keller WA., and Kasha KJ (eds.). Haploids in Crop Improvement II, Series: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

**DJERMOUN, (2009).** La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques. Revue Nature et Technologie. (01/juin 2009).Pp 45 à 53.

**DODDS JH, ROBERTS LW (1985)** Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press, Cambridge, 232 p.

**DORE C., 2006.** Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées. INRA Quae. 812 P.

**DUNWELL JM, FRANCIS RJ, POWELL W (1987)**Anther culture of *Hordeum vulgare* L.: a genetic study of microspore callus production and differentiation. Theor. A. Gen. 74:60–64.

**-E-**

**EBERT, A., F. TAYLOR ET J. BLAKE, 1993.** Changes of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. Plant Cell Tissue Organ Cult. 33: 157-162.

**ELHADDOURY J(2005).** biotechnologie et sécurité alimentaire. INRA, laboratoire de biotechnologie. p.1-4

**ELLIS, R.P., AND RUSSELL, G. (1984).** Plant development and grain yield in spring and winter barley. J. Agric. Sci. 102, 85–95. 46

**EVANS DA, SHARP WR, MEDINA-FILHO HP (1984)** Somaclonal and gametoclonal variation. Am. J. Bot. 71:759–114.

**-F-**

**FOSSARD, R.A., 1974.** Summary: method for producing haploids. p. 145-151 Dans K.J.Kasha (ed.). Haploids in higher plants. Advances and potentials. Univ. of Guelph Press, Guelph, Ontario, Can, 421 p. 45

**FOROUGHI-WEHR B, MIX G (1979)** In vitro response of *Hordeum vulgare* L. anthers cultured from plants grown under different environments. Environ. Exp. Bot. 19:303–309.

**FOROUGHI-WEHR B, FRIEDT W (1984)** Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant *Hordeum vulgare* lines by anther culture. Theor. A. Gen. 67: 377–382.

**FOROUGHI-WEHR, B. ET G. WENZEL, 1993.** Andro- and parthenogenesis. p. 261-277

Dans Hayward, M.D., N.O. Rosemarket 1. Romagosa (eds.). Plant Breeding: principles and prospects. Chapman & Hall, London, Eng.

**-G-**

**GALLAIS A, BANNEROT H., 1992.** Amélioration des espèces cultivées. Objectifs et critères de sélection. INRA. Paris. PP 43-98.

**GALLAIS A, (2011).** Méthodes de création de variétés en amélioration des plantes .paris : édition Quæ. 287p

**GALLAIS A. 2013.** De la domestication à la transgénèse. Evolution des outils pour l'amélioration des plantes. Editions Quæ. 175 pages.

**GAMBORG OL, MURASHIGE T, Thorpe TA, Vasil IK (1976)** Plant tissue culture media. In vitro 12:473–478

**GAUTHERET RJ (1959)** La culture des tissus végétaux. (ed.). Masson, Paris, 849 p.

**GENECH DE LA LOUVIRE T., 1971.** Manuel d'agriculture. Synd. Agricole, Lille p. 92-95. 47

**GEORGET M., 1997.** Le blé à l'INRA : recherches et innovations. Mensuel INRA, 53, p.38-47.

**GIBAN, M., MINIER, B., MALVOSI, R. 2003.** Stades du blé ITCF. ARVALIS. Institut du végétale. Pp 68.

**GOMEZ-PANDO LR., J. JIMENEZ-DAVALOS, A. EGUILUZ DE LA BARRA, E. AGUILAR-CASTELLANOS, J. FALCONI-PALOMINO, M. IBANEZ-TREMOLADA, M. VARELA, JC. LORENZO. 2009.** Field performance of new in vitro androgenesis-derived double haploids of barley. Euphytica, 166: 269-276. DOI 10.1007/s10681-008-9840-0.

**GOUMI ET AL., (2017).** Effect of Cold Pretreatment, Anthers Orientation, Spikelet Position and Donor Tiller on the Callusing Response in Barley Anther In vitro Culture. Int J Med Biotechnol Genetics. (03)33-38.

**Guasmi F, Elfalleh W, Marzougui N, Tebra Triki et Ferchichi A., 2009-** Création de variétés tolérantes au stress abiotique chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.) par culture d'anthères Acta Botanica Gallica, 157:3, 445-450, DOI : 10.1080/12538078.2010.10516221.

**Guasmi F, Elfalleh W, Hannachi H, Feres K, Touil L, Marzougui N, Triki T, and Ferchichi A, (2013).** INFLUENCE OF VARIOUS PHYSICAL PARAMETERS ON ANTHHER CULTURE OF BARLEY, Journal of Plant Nutrition, 36:5, 836-847. Institut des Régions Arides de Médénine,

Laboratoire d'Aridoculture et Cultures Oasiennes, ' Medenine, Tunisia. To link to this article:  
<http://dx.doi.org/10.1080/01904167.2012.759230>.

**GUHA S, MAHESHWARI SC (1964)** In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. Nat. 204:497

-H-

**HADRIA, R. 2006.** Adaptation et spatialisation des modèles strics pour la gestion d'un périmètre céréalier irriguée en milieu semi-aride. Thèse de doctorat. Univ Cadi AYYAD Samlalia- Marrakech.

**HAKIMI, M. 1989.** Les systèmes traditionnels basés sur la culture de l'orge. Proc. Symp. On the agrometeorology of rainfed barley based farming systems. Eds. WMO/ ICARDA pp: 179-183.

**HAKIMI M., 1993.** L'évolution de la culture de l'orge : le calendrier climatique traditionnel et les données agro météorologiques modernes. *In the agrometeorologyof rainfed barley-based farming systems*. Proceeding of an International symposium (6 - 10 march 1989, Tunis). Ed. Jones M., Marthys G., Rijks D. PP157 - 166.

**HARADA, H. ET J. IMAMURA, 1982.** Studies on physical, chernicd andphysiologycai factors affecting tobacco pollen embryogenesis and plantlet formation. p. 525-526 Dans Fujiwara, A. (ed.). Plant tissue culture 1982. The Japanese Association fort plant Tissue Culture, Tolqo, **Japan**

**HENTOUR .S, BENBACHIR. M ,BENCHEKROUN.M, EL GOUMI.Y, FAKIRI.M, LAMSAOURLO.,2016-** Effet de prétraitement au froid et au mannitol sur l'androgenèse et la gynogenèse chez des variétés d'orge de printemps (*Hordeum vulgare* L.) .*Université Hassan I, faculté des sciences et techniques, laboratoire de recherche Agroalimentaire & santé, B.P. 577, 26000 Settat, Maroc.*

**HENTOUR ET AL., (2016).** Effet de prétraitement au froid et au mannitol sur l'androgenèse et la gynogenèse chez des variétés d'orge de printemps (*Hordeum vulgare* L.). J. Mater. Environ. Sci. 7 (7) 2583-2594.

**HEBERLE-BORS E (1984).** Genotypic control of pollen plant formation in *Nicotiana tabacum* L. Theor. A. Gen. 68:475-479.

**HOU L, ULLRICH SE, KLEINHOF S A (1994)** Inheritance of anther culture traits in barley. Crop Sci. 34:1243-1247. 49

**HUANG B, SUNDERLAND N (1982)** Temperature-stress pretreatment in barley anther culture.

Ann. Bot. 49: 77–88.

**HUNTER CP (1988)** Plant generation from microspores of barley *Hordeum vulgare* L. PhD. Thesis. London, Wye College, Ashford, Kent. 195 p.

**HUSSEIN, E.H.A., MADKOUR, M.A., ASSEM, S.K. AND RADWAN, A.M.A. 2004.** Embryogenic callus formation and plant regeneration from immature embryos of some barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.). *Arab J. Biotech.* 7: 111-122.

**-I-**

**INSTITUT DE LA STATISTIQUE (2006)** Superficie des grandes cultures, rendement à l'hectare et production par région administrative. [http://www.stat.gouv.qc.ca/donstat/econm\\_finnc/filr\\_bioal/culture/culture/am110006](http://www.stat.gouv.qc.ca/donstat/econm_finnc/filr_bioal/culture/culture/am110006). htm accessible le 02 avril 2006.

**IRIKOVA T, KINTZIOS S, GROZEVA S AND RODEVA V. 2016.** Pepper (*Capsicum annuum* L.) anther culture: fundamental research and practical applications. *Turkish Journal of Biology* 40(4): 719-726. Doi: 10.3906/biy-1506-79

**-J-**

**JACOBSEN E, SOPORY SK (1978)** The influence of possible recombination of genotypes on the production of microspore embryoids in anther cultures of *Solanum tuberosum* and dihaploid hybrids. *Theor. A. Gen.* 52:119–123

**JACQUARD C., 2007-** Embryogenèse pollinique chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.) : importance du prétraitement. Mém. doctorat, Biologie et Physiologie Végétales., Univ. Reims Champagne, Ardenne, 106p. 50

**JACQUARD C, ASAKAVISIUTE R, HAMALIAN A. M, SANGWAN R. S, DEVAUX P, CLEMENT C., 2006.** Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis and albinism. *Plant Cell Rep.* 25. PP: 375-381.

**JÄHNE A., H. LÖRZ. 1995.** Cereal microspore culture. *Plant Science*, **109**: 1-12.

**JÄHNE A, LÖRZ H (1995)** Cereal microspore culture. In Study of chlorophyll a and b in etiolated and androgenic plants of barley (*Hordeum vulgare* L.): from JSPB..2:10–15.

**JESTIN L. ; 1992.** L'orge. pp.55.70. In : GALLAIS A et BANNEROT H. amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de sélection. INRA édition France.

**JOHANSSON, L.B., B. ANDERSON ET T. ERIKSSON, 1982.** Improvement of anther culture techniques: activated charcoal bound in aga. Medium in combination with liquid medium and elevated CO<sub>2</sub>; Concentration. *Physiol. Plant.* 54: 24-30.

**JOHANSSON, L.B., 1986.** Effects of activated charcoal, cold treatment and elevated CO<sub>2</sub>-concentration on embryogenesis in anther cultures. p. 257-264 Dans Walter de Gruyter & Co. (eds), *Genetic Manipulation in Plant Breeding.* New York, U.S.A. 909 p.

**Journal of Plant Nutrition, 36:836–847, 2013.** Copyright C Taylor & Francis Group, LLC ISSN: 0190-4167 print / 1532-4087 online DOI: 10.1080/01904167.2012.759230 INFLUENCE OF VARIOUS PHYSICAL PARAMETERS ON ANTHER CULTURE OF BARLEY

**-K-**

**KAO, K.N., 1981.** Plant formation from barley anther cultures with Ficoll media. **2.** *Pflanzenphysiol.* 103: 437-443. 51

**KAO, KN., M. SAIEEM, S. ABRAMS, M. PEDRAS, D. HOM ET C. MAILARD, 1991.** Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods. *Plant Cell Rep.* 9: 595-601.

**KARSAI I, BEDO Z, HAYES PM (1994)** Effect of induction medium pH and maltose concentration on in vitro androgenesis of hexaploid winter triticale and wheat. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 39:49–53

**KASHA KJ, KAO KN. 1970.** High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) and utilization in barley breeding. *Nature*, (London), 225: 874-876.

**KASHA KJ AND MALUSZYNSKI M. 2003.** Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. pp. 1-4. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP and Szarejko I (eds.). *Doubled haploid production in crop plants: A Manual.* Springer, Dordrecht. 428 p. doi: 10.1007/978-94-017-1293-4\_1.

**KIHARA M, FUKUDA K, FUNATSUKI H, KISHINAMI I, AIDA Y (1994)** Plant regeneration through anther culture of three wild species of *Hordeum* (*H. murinum*, *H. marinum* and *H. bulbosum*). *Plant. Breed.* 112:244–247.

**KINTZIOS S, FISCHBECK G (1994)** Anther culture response of *Hordeum spontaneum*-derived winter barley lines. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 37:165–170.

**KIRARI F., (2013).** L'influence du prétraitement des anthères au mannitol sur la réponse

androgénétique d'un hybride d'orge (Express × Ras el mouch) en F2. Production et amélioration des végétaux., Univ. Saad Dahleb Blida. Algérie, 85p.

**KNUDSEN S, DUE IK, ANDERSEN SB (1989)** Components of Response in Barley Anther Culture. *Plant. Breed.* 103:241–246.

**KRUCZKOWSKA H, PAWŁOWSKA H, SKUCINSKA B (2002)** Influence of anther pretreatment on the efficiency of androgenesis in barley. *J Appl Genet* 43(3):287–296. 52

**Kumari, M., Clarke, H.J., Small, I. and Siddique, K.H.M. 2009.** Albinism in plants: A major bottleneck in wide hybridization, androgenesis and doubled haploid culture. *Critical Reviews in Plant Science.* 28: 393-409.

-L-

**LABBANI Z, 2007**-Réorientation androgénétique des microspores de *Triticum turgidum subsp.durum* (Desf) Husn.L'albinisme peut-il être partiellement maîtrisé.Mém.doctorat, Biotechnologie Végétale, Université Mentouri Constantine, Algérie,125p.

**LAISSAOUI D., 2011.** Effet de l'irradiation aux rayons gamma (60Co) sur la culture d'anthères d'une variété d'orge Algérienne cv Tichedrett (*Hordeum vulgare* L.). Mémoire d'ingénieur d'état en biologie 2010-2011. Univ. Saad Dahleb Blida, Algérie. 8p.

**LA MEDINA (2002).**Le couscous d'orge, un produit du terroir. Revue La Médina. Edition du 17septembre2002.Version électronique disponible <http://www.couscousdari.com/fr/terroir.htm>

**LANGE W (1971)** crosses Between *Hordeum vulgare* L. and *H.Bulbosum* L. *Euphytica.* 20:14–29.

**LARKIN PJ, SCOWCROFT LVR (1981)** Somaclonal variation, a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. A. Gen.* 60:197–214.

**LARSEN E.T., I.K.D. TUVESON & S.B. ANDERSON, 1991.**-Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Gen.*, **82**, 417-420.

**LAUMONT P., 1937.** La céréaliculture algérienne. Extrait de « populations Indigènes d'Algérie et politique économique », Alger. 32 p.

**Law CN, Worland AJ (1972)** Aneuploidy in wheat and its uses in genetic analysis. P. 25–65 In. *Plant. Breed* (ed). Inst. Annual Rep, Cambridge, UK. 53

**LAZAR MD, SCHAEFFER GW, BAENZIGER PS (1984)** Cultivar and cultivar X environment effects on the development of callus and polyhaploid plants from anther cultures of wheat. *Theor. A. Gen.* 67:273

**LAZARMD, SCHAEFFER GW, BAENZIGER PS.** 1990. The effects of culture environment with genotype on wheat (*Triticum aestivum*) anther culture response. *Plant Cell Reports*8: 525-529.

**LAZARIDOU TB, LITHOURGIDIS AS, KOTZAMANIDIS ST, ROUPAKIAS DG (2005)** Anther culture response of barley genotypes to cold pretreatments and culture media. *Russ. J. Plant Physiol.* 52:696–699.

**LEONARD, W. H. & J. H. MARTIN (1973)** Cereal Crops. The MacMillan Company, New York. Orge: pp. 478-543; Avoine, pp. 544-603.

**LINSMAIER EM, SKOOG F (1965)** Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18:100-127.

**LI, H., AND DEVAUX, P. (2005).** Isolated microspore culture overperforms anther culture for green plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Acta Physiol. Plant.* 27, 611–619.

**LUCKETT DJ, SMITHARD RA (1992)** Doubled haploid production by anther culture for Australian barley breeding. *Austr. J. Agr. Res.* 43:67–78.

**LUCKETT, DJ, ET R.A. SMITHARD, 1995.**A comparison of several published methods for barle: antber culture. *Plant Ceii Rep.* 14: 763-767.

**-M-**

**MAGLIONE R., 2016.** Étude de l'intégrité du génome chloroplastique de l'orge (*Hordeum vulgare*) en culture de microspores isolées. *Mém. Maîtrise en biologie végétale, Univ.LAVAL.* Québec, Canada, 44p. 54

**MA H., RH. BUSCH, O. RIERA-LIZARAZU, HW. RINES, R. DILL-MACKY. 1999.** Agronomic performance of lines derived from anther culture, maize pollination and single-seed descent in a spring wheat cross. *Theor Appl Genet*, 99: 432-436.

**MALUSZYNSKI, M., KASHA, K.J., FORSTER, B.P. AND SZAREJKO, I. (EDS). 2003.** Doubled Haploid Production in crop plants: A Manual. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.

**MAMECHE I, MENAD DJ., 2012.** Essai d'obtention de plantes haploïdes d'orge (*Hordeum vulgare* L.) à partir de la culture d'anthères de trois hybrides (F2) issus de croisements entre variétés locales (Saida, Ras El Mouch) et introduites (Rihane,Esterel,Express). Thèse. Doctorat, production

et amélioration végétales, Univ. Saad Dahleb Blida, Algérie, 3p.

**MANNINEN MO (1997)** Optimizing anther culture for barley breeding. In Study of chlorophyll a and b in etiolated and androgenic plants of barley (*Hordeum vulgare* L.): from JSPB. 2:10–15.

**MANNINEN MO (2000)** Associations between anther-culture response and molecular markers on chromosomes 2H, 3H and 4H of barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor. A. Gen. 100:57–62.

**MARSOLAIS, A.A., G. SEGUIN-SWARTZ ET K.J. KASHA, 1984.** The influence of anther colc pretreatments and donor plant genotypes on in vitro androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult. 3: 69-79.

**MARASCHIN S., DE PRIESTER W., SPAINK H. ET WANG M. (2005a)** Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. Journal of Experimental Botany 56(417): 1711-1726.

**MARCHAND E, FONQUERNE G, CLERMONT I, LAROCHE L, HUYNH TT, BELZILE JF (2008)** Androgenic response of barley accessions and F1s with Fusarium head blight resistance Plant Cell rep. 27:443–451. 55

**MAYER, K.F.X., WAUGH, R., LANGRIDGE, P., CLOSE, T.J., WISE, R.P., GRANER, A., MATSUMOTO, T., SATO, K., SCHULMAN, A., MUEHLBAUER, G.J., ET AL. (2012).** A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. Nature.

**MAZOYER M, AUBINEAU M, BERMOND A, BOUGLER J, NEY B, ESTRADE JR (2002)** Larousse agricole. (ed.). Larousse, Paris, 767 p.

**MCMULLEN M, JONES R, GALLENBERG D (1997)** Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. Plant. Dis 81:1340–1348.

**MCMULLEN, M., BERGSTROM, G., DE WOLF, E., DILL-MACKY, R., HERSHMAN, D., SHANER, G., AND VAN SANFORD, D. (2012).** A Unified Effort to Fight an Enemy of Wheat and Barley: Fusarium Head Blight. Plant Dis. 96, 1712–1728.

**MENAD, A., N. MEZIANI, H. BOUZERZOUR, A. BENMAHAMMED. 2011.** Analyse de l'interaction génotype x milieu du rendement de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) : application des modèles AMMI et la régression conjointe. Nature & Technology (Université Chlef) 5: 99-106.

**MESFIN A., K.P. SMITH, R. DILL-MACKY, C.K. EVANS, R. WAUGH, C.D. GUSTUS & G.J. MEZIANI, N., H. BOUZERZOUR, A. BENMAHAMMED, A. MENAD, A. BENBELKACEM. 2011.** Performance and adaptation of Barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.)

to diverse locations. *Advances in Environmental Biology*, 5: 1465-1472.

**MOULE C., 1971.** Céréales II .La maison rustique. Paris PP: 108-131.

**MUEHLBAUER, 2003.**-Quantitative trait loci for *Fusarium* head blight resistance in barley detected in a two-rowed by six-rowed population. *Crop Sci.*, **43**, 307-318.

**MURASHIGE, T. A F. SKOOG, 1962.**A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Planta.* 15: 473-497. 56

**-N-**

**NANCY L. JOHNSON, NINA LILJAB, JACQUELINE A. ASHBY, 2003.**Measuring the impact of user participation in agricultural and natural resource management research. *Agricultural Systems* 78, p. 287–306

**NAVARRO-ALVAREZ W, BAENZIGER PS, ESKRIDGE KM, SHELTON DR, GUSTAFSON VD, HUGO M (1994)** Effect of sugars in wheat anther culture media. *Plant. Breed.* 112:53–62

**NUUTILA A., AIKASALO R., RITALA A., KAUPPINEN V. ET TAMMISOLA J. (2000)** Risk assessment of transgenic barley. Innovation in the barley-malt-beer chain, Nancy (France), Institut national polytechnique de Lorraine

**-O-**

**Ohnoutkova L et al., (2019).** Barley Anther Culture In book: *Barley: Methods and Protocols*. New York : ed Springer (pp.37-52)

**ORSHINSKY BR, SADASIVAIAH RS (1997)** Effect of plant growth conditions, plating density, and genotype on the anther culture response of soft white spring wheat hybrids. *Plant Cell rep.* 16:758–762.

**OUEDRAOGO JT (1995)** Effet des acides aminés et de régulateurs de croissance sur l'androgénèse in vitro de l'orge (*Hordeum vulgare* L.). Mémoire de maîtrise, Université Laval, QC, Canada 102 p.

**OUYANG JW, ZHOU SM, JIA SE. 1983.** The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum*. *Theor. Appl. Genet* 66: 101-109. 57

**OUYANG JW, HE DG, FENG GH, JIA SE (1987)** The response of anther culture to culture temperature varies with growth conditions of anther-donor plants. *Plant Sci.* 49:145.

**-P-**

**PICARD E, DE BUYSER J, HENRY Y.** 1978. Technique de production d'haploïdes de blé par culture d'anthers *in vitro*. *Le Sélectionneur Français* 26: 25-37.

**PICARD E., 1988.**Sélection du blé : l'intégration des biotechnologies. *Biofutur* : p. 48- 58.

**PICARD E, CRAMBES E, MIHAMOU ZIYYAT A (1994)** L'haplodiploïdisation : un outil multi-usage pour la génétique et l'amélioration des céréales. P. 355–369 In : AUPELF-UREF (ed). *Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?* John Libbey Eurotext, Paris.

**PICKERING RA, DEVAUX P(1992)**Haploid production: approaches and use in plant breeding. P.519-547. In Shewry PR (ed.). *Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology*. Biotechnologies en agriculture series no. 5. Wailingford, Oxon, UK.

**POWELL W, HAYTER AM, WOOD W, DUNWELL JM HUANG B (1984)** Variation in the agronomic characters of microspore-derived plants of *Hordeum vulgare* cv. Sabarlis. *Hered.* 52:19–23.

**POWELL W (1988).**The influence of genotype and temperature pre-treatment on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 12:291-297.

**PRAKASH, J. ET K-L.Giles,** 1987. Induction and growth of androgenic haploids. *Int. Rev. Cytol.* 107: 273-292.

**-R-**

**RAMLA D., (2004).** HETEROSIS F2 CHEZ L'ORGE (*Hordeum vulgare* L.) :I- Relation avec la diversité génétique II- Essai de production de plantes haploïdes à partir de la F2.Production végétale.Institut National Agronomique-El-Harrach-Alger, 127p.

**RAMLA D., (2017).** Intérêt de l'androgenèse et de la mutagenèse dans l'amélioration de la production et de la résistance à la strie foliaire chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.).Mém. Doctora. Sciences agronomiques.Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA d'El-HARRACH).Algérie, 137p.

**RAMLA et al., (2017).**Évaluation de la performance de quelques haploïdes doublés d'orge (*Hordeum vulgare* L.) et identification des lignées transgressives dans une zone semi-aride

Algérienne. Ecole National Supérieure d'Agronomie, PP 7-14.

**RAZDAN MK, (2002)** Introduction to plant tissue culture. (ed.). Science Publishers, Inc, USA, 330 p. Reinert J. 1977. Chapter II. Haploid. pp. 249-340. In: Reinert J and Bajaj YPS (eds.). Applied and fundamental aspects of plantcell, tissue and organ culture. Springer, Berlin-Heidelberg-New York.803 p.

**ROBERTS-OEHISCRUAGER, S.L. ET J.M. DUNWELI, 1990.**Barley anther culture: pretreatment on mannitol stimulates production of microspore-derived embryos. Plant Cell Tissue Organ Cdt. 20: 235-240.

-S-

**SAINT PIERRE C-A. et GENDRON G.1982.** Les céréales .Ed. Presses de l'université .Laval . saint- foy, 219P.

**SÁNCHEZ MA, MORILLO Y, MORILLO AC, 2018-**Androgenic studies in the production of haploids and doubled haploids in *Capsicum* spp, 73(1): 9047-9056. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame>. Consulté le 8 November, 2018

**SANGARE M., 2008.** Optimisation de la culture d'anthères chez l'orge de printemps à six rangs (*hordeum vulgare*).Mém, obtention du grade de maître ès sciences (m.sc.), faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation université laval, québec,95p. 59

**SATISH, P., O.L. GARNBORG ET M.W. NABORS, 1995.** Rice anther culture: callus initiation and androclonal variation in progenies of regenerated plants. Plant Cell Rep. 14: 432-436.

**SAVASKAN Ç, SZAREJKO I, TOKER CM (1999).** Callus production and plant regeneration from anther culture of some Turkish barley cultivars. Turk. J. Bot.23: 359–365.

**SCHULTE, D., CLOSE, T.J., GRANER, A., LANGRIDGE, P., MATSUMOTO, T., MUEHLBAUER, G., SATO, K., SCHULMAN, A.H., WAUGH, R., WISE, R.P., ET AL. (2009).** The International Barley Sequencing Consortium—At the Threshold of Efficient Access to the Barley Genome. Plant Physiol. 149, 142–147.

**SHAHZAD A et AL., (2017).**Historical Perspective and Basic Principles of Plant Tissue Culture in book: Plant Biotechnology: Principles and Applications. Singapore: Ed springer (pp.1-36)

**SIMMONDS J (1989).** Improved androgenesis of winter cultivars of *Triticum aestivum* L. in response to low temperature treatment of donor plants. Plant Sci. 65:225–231.

**SKOOG F (1957).** Conference on tissue culture. Jour. Nat. Cancer. Inst .19:578–579.

**SNAPE JW, SITCH LA, SIMPSON E, PARKER BB (1988)** Tests for the presence of gametoclonal variation in barley and wheat doubled haploids produced using the *Hordeum bulbosum* system. *Theor. A. Gen.* 75:509–513.

**SOLEIMANI VD, BAUM BR, JOHNSON DA (2006)**. Quantification of the retrotransposon BARE-1 reveals the dynamic nature of the barley genome. *Genome* 49:389–396.

**SORVARI, S., 1986A**. The effect of starch gelatinized nutrient media in barley anther cultures\**Am. Agr. Fem.*, 25: 127-133.

**SRIDEVY S, SAMERI M**. Estelle Lerceteau-Köhler and Anna Westerbergh\* Increased Recovery of Green Doubled Haploid Plants from Barley Anther Culture *crop science*, vol. 55, november–december 2015. 60

**SUNDERLAND N, HUANG B, HILLS GJ (1984)** Disposition of pollen in situ and its relevance to anther/pollen culture. *J. Exp. Bot.* 85:521–530.

**SZAREJKO I (2003)**. Anther culture for doubled haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). P.35–42 In: Maluszynski M, Kasha K, Forster BP, Szarejko I. (eds). *Doubled haploid production in crop plants. A manual*. Kluwer Academic, Dordrecht.

**-T-**

**TAJI A, KUMAR PP, LAKSHMANAN (1984)** *In vitro* plant breeding. (ed.). Food Products Press, London.

**THOMAS WTB, BP. FORSTER, B. GERTSSON, 2003**. Doubled haploids in breeding. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP and Szarejko I, eds. *Doubled haploid production in crop plants: a manual*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp: 337-349.

**TIANCI H, 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.

**TOUNSI M., 1986**. Industrie céréalière et stratégie agro-alimentaire en Algérie. Options méditerranéennes. CIHEAM. PP 93-104.

**TOURAEV A, INDRIANTO A, WRATSCHKO I, VICENTE O, HEBERLE-BORS E.1996**. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sexual Plant Reproduction* 9: 209–215.

**TOURAEV A., M. PFOSSER, E. HEBERLE-BROS. 2001**. The microspore: a haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research*, 35: 53-109. 61

**TROTTIER MC, COLLIN J, COMEAU A (1993)** Comparison of media for their aptitude in wheat anther culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 35: 59–67.

**-U-**

**ULLRICH S.E. (2001)** Barley: production, improvement, and uses .p.3.

**-V-**

**VAROQUAUX FABRICE, PELLETIER GEORGES, 2002.** Evolution des techniques, outils et. Méthodes en amélioration des plantes. *Journal de l'A.S.F. "Le Sélectionneur Français"* (53), p. 55-68.

**VON BOTHMER R. ET JACOBSEN N. (1985)** Origin, taxonomy and related species. In : D. Rasmusson (éds). *Barley, Agronomy Monograph.* 26 : 19-26.

**VON BOTHMER R., JACOBSEN N., BADEN C., JORGENSEN R.B. ET LINDE-LAURSEN I. (1995)** Anecogeographical study of the genus *Hordeum*. *Systematic and ecogeographic studies on crop gene pools 7.* Rome, IBPGR.

**-W-**

**W.D.Dar, (2014).** Introduction: Biotechnological Interventions for Crop Improvement: Answers to Global Challenges In book: plants biotechnology : experience and future prospects. Switzerland: Ed springer (pp.1-10). 62

**WHEATLEY WG, MARSOLAIS AA, KASHA KJ (1986)** Microspore growth and anther staging in barley anther culture. *Plant Cell rep.* 5:47–49

**-X-**

**XU ZH, SUNDERLAND N (1981)** Glutamine, inositol and conditioning factor in the production of barley pollen callus in vitro. *Plant Sci. Lett.* 23:161–168.

**Xu, Z.H. et N. SUNDERLAND, 1984.** DNA microphotometry of *Hordeum vulgare* pollen during cold pretreatment. *Nat. Resour. Environ. Ser. Vol.* 22: 4445.

**XU, Z.H., 1990.** Barley (*Hordeum vulgare* L.): anther culture and the production of haploids p. 125-175 Dans Bajaj, Y.P.S. (ed.). *Haploids in crop improvement 1.* Biotechnology Agriculture and Forestry vol. 12, Springer-Verlag, Heidelberg.

**-Z-**

**ZHOU, H., Y. ZHEN ET C.F. KONZAK, 1991.** Osmotic potential of media affecting green plant percentage in wheat anther culture. *Plant Cell Rep.* 10: 63-66.

**ZHOU, H., S.T. BAIL ET C.K. KONZAK, 1992.** Functional properties of Ficoll and their influence on anther culture responses of wheat. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 30: 77-83













