

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Mentouri – Constantine
FACULTE DES SCIENCES
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

N° d'ordre :
Série :

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Magistère en
Biotechnologies Végétales.

THÈME

**Embryogenèse somatique et variation
somaclonale chez le blé dur et tendre (culture
d'embryons matures et immatures)**

Présenté par : M^{elle} KACEM Nadia Sandra

Soutenu le : / / 2005

Devant le jury :

Présidente : YKHLEF.N

Maître de conférences. Université Mentouri Constantine.

Rapporteur : DJEKOUN.A

Professeur. Université Mentouri Constantine.

Examineurs : BENBELKACEM.A

Dr. Sc. Agronomique. Directeur de recherche (ITGC)

Examineurs : KARA.Y

Maître de conférences. Université Mentouri Constantine.

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères et mon profond respect à Monsieur Djekoun A professeur à l'Université Mentouri pour ses orientations, ses conseils et son suivi permanent.

J'exprime ma gratitude et ma profonde reconnaissance à Mme Ykhlef N Maître de conférence à l'Université Mentouri pour sa disponibilité, son aide et ses conseils judicieux et qui me fait l'honneur de présider le jury.

Mes sincères remerciements vont à Monsieur Benbelkacem A Docteur et directeur de recherche à l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) pour son aide, sa sympathie et d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent à Monsieur Kara Y Maître de conférences à l'Université Mentouri et qui me fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie également Monsieur Belbekri N et Madame Tourki M ingénieurs de laboratoires pour leur disponibilité, aide et encouragement.

Je tiens à remercier toute personne ayant collaboré de près ou de loin à l'élaboration de ce document.

Sandra Nadia

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents.

LISTE DES ABBREVIATIONS

2.4-D : Acide 2,4 Dichlorophenoxyacétique

A : 10mg/l de 2,4-D

AIA : l'acide indolacétique

AIB : l'acide indole butyrique

ANA : Acide naphtalène acétique

B : 2 mg/l de 2,4-D

BAP :Benzylaminopurine=Benzyldénine

C: 2mg/l de 2.4D+1mg/l d'AgNO₃

Fig : figure

I : les embryons matures.

II : les embryons immatures.

KIN : Kinétine=6 fulfuryl aminopurine

Milieu A : 2.4-D à 7 mg/l

Milieu B : AIA à 2 mg/l

Milieu C : 2.4d à 2 mg/l

Milieu D : 2.4d à 2mg/l +AgNo₃ à 10 mg/l.

MS :Murashige et Skoog., 1962.

P.F : Poids Frais

P.S : Poids sec.

P.T : Poids turgescence

PEG : poly éthylène glycol

PH : Potentiel Hydrogène.

Pn : Photosynthèse.

Rs : Résistance stomatique.

TRE : Teneur Relative en Eau.

Sommaire

INTRODUCTION	1
---------------------------	---

CHAPITRE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1- Importance du blé	10
2- Méthodes traditionnelles utilisées dans l'amélioration génétique du blé	11
3- Création variétale par voie d'haplodiploïdisation.....	4
3-1- Androgenèse	11
3-2- Culture de microspores isolées	12
4- Création variétale par voie moléculaire	13
4-1- Marquage moléculaire	13
4-2- Utilisation de la mutagenèse	14
4-3- Transgenèse	14
4-4- Fusions de protoplastes	15
4-5- Embryogenèse somatique	15
4-5-1- Les premiers travaux	16
4-5-2- Induction de l'embryogenèse somatique	18
4-5-3- Modèles de l'embryogenèse somatique	18
4-5-3-1- Embryogenèse directe	18
4-5-3-2- Embryogenèse indirecte	19
4-5-4- Culture d'embryon somatique	19
4-5-5- Evaluation de la différenciation embryonnaire	20
4-5-6- Maturation et conservation des embryons somatiques	21
4-6- Culture d'embryons	22
4-6-1- Historique de la culture d'embryons	22
4-6-2- Culture d'embryon mature et immature	24
4-6-3- Appréciation de la valeur de la technique de la culture d'embryon	24
4-6-4- Origine de la mortalité des embryons	25
4-6-5- Croissance et survie des embryons	27
4-7- Callogenèse	28
4-7-1- Principaux facteurs contrôlant la callogenèse	28
4-7-1-1- Explant initial	28
4-7-1-2- Milieu de culture	29
4-7-1-3- Régulateurs de croissances	29
4-7-2- Facteurs de l'environnement	30
4-7-2-1- Lumière	30
4-7-2-2- Température	30
4-8- Etude de la variation somaclonale	31
4-8-1- Type de variation somaclonale	32
4-8-2- Caractères affectés par la variation somaclonale	33
4-8-3- Avantages et inconvénients de la variation somaclonale	34

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

1- Matériel végétal	36
2- Dispositif expérimental et conduite de l'essai	37
2-1- Installation de l'essai	37
2-2- Préparation du matériel végétale	30
2-3- Désinfection des caryopses matures et immatures	38
2-4- Choix du milieu de culture	31

2-5- Préparation du milieu de culture	39
2-5-1- Sels minéraux	39
2-5-2- Sucres	32
2-5-3- Vitamines et acides aminés	32
2-5-4- Régulateurs de croissances	40
2-5-5- Substances gélifiantes.....	41
2-6- Conservation du milieu de culture	33
2-7- Les différentes hormones utilisées pour l'induction de la callogenèse.....	34
2-8- Préparation du matériel	34
2-8-1- Stérilisation à pression	35
2-8-2- Stérilisation de la hotte	35
2-8-3- Stérilisation à sec	36
2-8-4- Stérilisation a l'alcool	44
2-8-5- Condition de travail	44
2-9- Préparation des échantillons	45
2-9-1- Dissection des grains matures	45
2-9-2- Dissection des grains immatures	37
2-9-3- Ensemencement des explants	38
2-10- Conditions physiques de culture des embryons matures et immatures ...	46
2-11- Repiquage des cultures.....	46
2-11-1- Milieux des repiquages	38
2-11-2- Premier repiquage	38
2-11-3- Deuxième repiquage	47
2-11-3-1- Découpage des cals.....	39
2-11-3-1-1-Cals cubiques et volumineux.....	40
2-11-3-1-2-Cals composés	48
2-11-4- Troisième repiquage	48
2-12- Induction de l'organogenèse.....	41
2-12-1- Les hormones utilisées pour la régénération des cals.....	41
2-12-2- Transfère en sol	50
2-13- Paramètres physiologiques	51
2-13-1- Principe du LCA 4	51
2-13-2- Mesures de la teneur relative en eau	43
2-14- Traitement statistique des résultats.....	44

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

1- Tailles des embryons matures et immatures	54
2- Durée nécessaire entre l'inoculation et la réaction du scutellum	54
3- Durée nécessaire entre l'inoculation et l'induction de cals	56
4- Pourcentage de callogenèse	57
5- Effet des différentes concentrations hormonales sur les embryons matures et immatures	59
5-1- Effet du 2.4-D à 10mg/l sur les embryons matures	60
5-1-1- Réaction des embryons.....	60
5-1-2- Surface des cals.....	60
5-2- Effet du 2.4-D à 2 mg/l en présence et en absence de l'AgNO ₃ sur la réaction des embryons	62
5-2-1- Matures	62
5-2-2- Immatures.....	63

5-3-Effet du 2.4-D à 2 mg/l sur la surface des cals	55
5-3-1- Dérivés des embryons matures	63
5-3-2- Dérivés des embryons immatures	64
5-4- Effet du 2.4-D à 2 mg/l + 1 mg/l d'AgNO ₃ sur la surface des cals	64
5-4-1- Embryons matures	64
5-4-2- Embryons immatures.....	65
6- Effet de l'âge de l'embryon sur la surface des cals	68
7- Effet variétal sur la surface des cals	68
8- Interactions entre les différents facteurs sur la surface des cals	69
9-Etude des corrélations	65
10- Taux de contamination	66
10-1- Après découpage des cals	74
10-2- Après transfert en tube	75
11- Aspects morphologiques des cals	76
11-1- Cals cubique	76
11-2- Cals volumineux	78
11-3- Cal en palmes	79
11-4- Cals embryogènes	Erreur ! Signet non défini.
12- Effet du poly éthylène glycol sur la croissance des cals	83
13- Effet du milieu MS sans hormones sur la régénération	87
14- Effet de l'AIB et la KIN sur la régénération	88
15- Effet de l'AIA et du BAP sur la régénération	90
16- Caractères morphologiques	95
17- Paramètre physiologiques	97
 CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION	Erreur ! Signet non défini.
 REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE	96
 ANNEXES	Erreur ! Signet non défini.

Revue bibliographique

1-Importance du blé:

Les céréales sont un constituant majeur des régimes alimentaires de l'homme et de l'animal partout dans le monde. Si l'on considère les superficies couvertes, le blé est la plante la plus cultivée sur terre.

Pratiquement toute la population consomme du blé en raison de son bon goût, d'une bonne assimilation par l'organisme, sa grande valeur nutritive, et sa teneur en protéines comme les protéines du gluten qui confèrent à la pâte ses propriétés de ténacité, d'élasticité et d'extensibilité, localisés principalement dans l'albumen, il s'agit des prolamines (40 à 50%) et des glutamines (30% à 40 %).

En Algérie, les céréales sont la base alimentaire de la population (220Kg / individu / an) elles occupent la première place en surface agricole. Le blé dur accapare 43% de la zone de production du pays, et le blé tendre vient au deuxième rang, avec 800.000 hectares (Anonyme., 2004):

Le gouvernement a eu à mobiliser annuellement près de 2,5 milliards de dollars pour assurer les importations alimentaires vu la faible production céréalière et particulièrement celle des blés (1.6 à 1.8 millions de tonnes en moyenne). Notre pays était le premier acheteur mondial de blé dur durant la période 1993-1996, en moyenne de 5.7 millions de tonnes / an.

En 2000, l'Algérie a importé 1,26 millions de tonnes de blé du Canada, 0,41 des Etats-Unis et 2,56 de l'Union européenne. La production algérienne était de 0,76 million de tonne (Anonyme., 2003).

Durant la période 2002-2003 la valeur des importations des céréales a baissé de manière significative soit 100000 tonnes de moins que l'année précédente, mais en dépit de cette évolution positive, l'Algérie occupe la 5^{ème} place dans le classement des pays les plus gros consommateurs, établi par le conseil international des céréales (CIC). Avec 4900000 tonnes de blé dur et tendre, l'Algérie vient en 5^{ème} position

derrière, respectivement, le Brésil, Maroc l'union européenne, l'Égypte et le Japon (Anonyme a., 2003).

2- Méthodes traditionnelles utilisées dans l'amélioration génétique du blé :

L'intervention de l'homme dans l'amélioration des cultures n'a rien de nouveau. Depuis des millénaires le sélectionneur cherche sans cesse à améliorer les plantes qu'il cultivait par rapport à des critères bien définis telle :la rusticité hivernale la tolérance à la sécheresse, la résistance au maladies et aux insectes, la résistance à la verse et à l'engrenage, la hauteur des plantes, le rendement grainier et l'aptitude à la récolte, tandis que la qualité du grain comprend des caractères tel que la forme, la couleur, le poids spécifique, la concentration et la nature des amidons et la performance de la farine.

L'approche se limite à utiliser la technique des croisements simples ou complexes, interspécifiques ou intergénériques entre les variétés présentant les caractères requis, les combinaisons souhaitées sont ensuite sélectionnées dans la descendance puis stabilisées et multipliées.

Ces méthodes de création variétale sont efficaces et éprouvées, cependant, l'amélioration génétique par ces techniques de sélection classique s'avère difficile à appliquer en raison du temps qu'elle demande 8 à 10 ans pour la fixation de la lignée de blé, de plus ces méthodes impliquent la manipulation de beaucoup de matériel végétal.

3- Création variétale par voie d'haplodiploïdisation:

3-1- Androgenèse :

La production de plantes haploïdes par culture d'anthers offre plusieurs avantages aux améliorateurs de plantes (Picard., 1984). En effet, l'androgenèse est un moyen de production rapide de lignées homozygotes, pour la création variétale (Foroughi-Wehr & Friedt., 1984 ; Dunwell., 1986).

Le succès de cette technique a déjà été démontré pour le blé hexaploïdes (*Triticum aestivum* L.) (Dunwell., 1985 ; Hassawi., Qi & Liang., 1990). En ce qui concerne le blé tétraploïde (*Triticum turgidum* .var) l'étape de la régénération des embryons reste un obstacle majeur. Le développement des embryons est soit bloqué (Foroughi-Wehr & Friedt., 1984) soit donne des plantes albinos (Zhu., Wang, & Sun., 1979) et peut aboutir à la formation d'un faible taux de plantes chlorophyllienne (Hadwiger., Heberle-Bors, 1986 ; Hadwiger., Sarrafi., Alibert., 1993).

L'androgenèse présente ainsi des limitations insolubles rendant cette technique inapplicable à la sélection et ni le changement de milieu ni la variation de plusieurs facteurs physiologiques et d'environnement n'ont permis de réduire le taux d'albinisme.

Pour surmonter cet handicap, diverses méthodes d'haplodiploïdisation ont été expérimentées, la culture d'anthers provenant de plantes issus de croisement interspécifique (blé tendre × blé dur), des croisements intergénériques (blé dur × *Hordrum bulbosum*, blé dur × maïs).

Ce dernier croisement a permis d'obtenir des plantes haploïdes chlorophylliennes chez le blé dur, qui se développent normalement à partir d'embryons parfaitement formés. Cependant l'obtention de plantes d'un taux élevé d'embryons indifférenciés lors des croisements intergénériques reste un obstacle à lever (Laurie et Bennett., 1986 ; Kazuhio et Nakajima., 1989 ; O'Donoghue et Bennet., 1994).

3-2- Culture de microspores isolées :

La technique de culture de microspores ou de jeunes grains de pollen a permis d'élargir le champ d'action des biotechnologies. En effet, les microspores isolées constituent un matériel de choix pour les manipulations génétiques permettant l'obtention directe de plantes homozygotes transformées (Jähne et Lörz., 1995 ; Touraev et al., 1997) la culture de microspores isolées favorise également l'exploitation de la sélection *in vitro* et l'évaluation au niveau cellulaire de la résistance à divers stress biotiques et abiotiques. Cependant, le blé dur (*Triticum turgidum* L. var. *durum*)

contrairement au blé tendre (*Triticum aestivum*) est jusqu'ici considéré comme une espèce récalcitrante à la culture de microspores *in vitro* (Hadwiger et Heberte-Bors., 1986). En effet, le rendement en embryons et les taux de régénération de plantes est faibles et la plus part des plantes régénérées étaient albinos. Récemment chez *Triticum turgidum* var. *durum* des résultats encourageants ont été obtenus en culture de microspores isolées *in vitro* par Picard et al (1998).

4- Création variétale par voie moléculaire :

4-1- Marquage moléculaire :

Le développement des marqueurs moléculaires durant les dernières années offre la possibilité d'établir de nouvelles approches pour améliorer les stratégies de sélection. Les marqueurs moléculaires deviennent un outil essentiel dans les programmes de sélection du blé dur (*Triticum durum*) et tendre (*Triticum aestivum*). En effet, l'apparition des marqueurs moléculaires a permis l'élaboration de méthodologie pour localiser les gènes chez les blés, ceci devrait aboutir à l'établissement de cartes de marqueurs moléculaires qui doivent permettre de localiser les locis contrôlant la qualité du grain ainsi que la tolérance aux principaux stress abiotiques ce qui devrait améliorer l'efficacité de sélection de cette céréale.

Les marqueurs moléculaires les plus utilisés sont les microsatellites. Plusieurs travaux ont abouti à une carte de marqueurs moléculaires de blé dur, ainsi que l'établissement d'une banque BAC, cette banque pourra constituer un précieux outil pour identifier les gènes importants. La pression de sélection exercée par les variétés à résistance monogénique favorise le développement de nouveaux biotypes, ce qui nécessite la recherche continue et rapide de nouvelles sources de résistance. Cette recherche a été largement facilitée par l'avènement des techniques de marquage moléculaire. Dans cette voie, plusieurs gènes de résistance aux insectes et aux maladies ont été localisés dans le génome du blé tendre par l'établissement de liaisons entre ces derniers et des marqueurs moléculaires sur les différentes cartes génétiques (Gupta *et al.*, 1999 ; Yencho *et al.*, 2000 ; Langridge *et al.*, 2001).

4-2- Utilisation de la mutagenèse :

Cette méthode de création variétale combinant les techniques de cultures *in vitro* aux traitements physiques (irradiation au cobalt 60) ou chimiques (traitement au méthane, sulfonate d'éthyle...etc.) afin de provoquer des mutations est considérée comme une technique rapide et efficace pour l'obtention de nouveaux cultivars. Plus de 2000 variétés ont été créées à partir de mutations naturelles ou induites. Ces mutations peuvent être induites par : Radiations ionisantes, mutagenèse chimique ou variation somaclonale. L'utilisation de traitements mutagènes sur le blé se propose pour arriver à l'obtention de variant alliant les caractères désirés dont la tolérance au stress biotique et abiotique.

Cependant, les principales limites de cette méthode résident dans le fait que les résultats obtenus sont aléatoires. Ils permettent néanmoins l'acquisition de caractères nouveaux susceptibles d'apporter une amélioration ponctuelle d'un cultivar.

Cyanamid Crop Protection (maintenant BASF Canada) a mis au point une variété de blé qui résiste aux herbicides à l'imidazolinone par mutagenèse chimique produite au moyen d'azoture de sodium. Le Ministère a effectué une évaluation détaillée de ce blé conformément à ses Lignes directrices relatives à l'évaluation de l'innocuité des aliments nouveaux. Ces lignes directrices sont fondées sur des principes internationaux d'évaluation de l'innocuité des aliments qui ont des caractéristiques nouvelles (Anonyme., 2001).

4-3- Transgénèse :

La transformation génétique du blé est une technique relativement nouvelle pour l'insertion de gènes spécifiques dans le génome. Bien que de nombreux types de blé transgéniques soient en développement à l'heure actuelle, c'est le blé tolérant aux glyphosate de Monsanto (appelé blé de printemps = Roundup Ready = RR) qui est vraisemblablement le premier à être commercialisé.

Néanmoins, les producteurs de ce blé génétiquement modifié (Les Etats – Unis et le Canada) perdront des ventes parce que sur le plan international, plusieurs Etats se

sont déclarés opposer à l'importation de ce blé dont l'Algérie l'Union européenne, le Japon, l'Indonésie, la Malaisie, l'Égypte et l'Arabie Saoudite.

Etant donné les perturbations économiques et écologiques qui pourraient résulter de l'introduction de blé transgénique dans un programme d'amélioration du blé, il serait inutile et dangereux de l'approuver et de le commercialiser.

4-4- Fusions de protoplastes :

Maintenus sur un milieu approprié, ces protoplastes peuvent régénérer leur paroi et se diviser pour donner naissance à un cal puis à une plante entière. L'absence de paroi permet d'induire des fusions entre protoplastes appartenant à des espèces différentes sexuellement incompatibles grâce à des traitements favorisant les fusions. Cette hybridation somatique n'est pas sujette aux problèmes d'incompatibilité qui limitent souvent les croisements traditionnels.

La possibilité d'induire la fusion de protoplastes d'espèces éloignées, porte la création de nouvelles variétés par les techniques de la culture *in vitro* aux limites de l'imagination. Citons l'exemple de la tomate et de la pomme de terre sur lesquelles la technique est facilement réalisable. Malheureusement cette technique ne marche pas sur le blé, et en générale sur les céréales et les légumineuses car elle se heurte à d'importants problèmes de régénération (Yang., He., Scott., 1993) et de stérilité chez les quelques plantes régénérées.

4-5- Embryogenèse somatique :

La culture *in vitro* des tissus végétaux a été à l'origine de nouvelles formes d'embryogenèse. Aux embryons zygotiques observés *in situ* dans les graines, se sont ajoutés les embryons somatiques (Reinert, 1958., Steward., 1958) puis les embryons androgénétiques (Guha et Maheshwari., 1964., Nitsh., 1969) et les embryons gynogénétiques (San Naeum., 1976). Ces structures naturelles ou néoformées expérimentalement, ont en commun une évolution qui passe par des stades morphogénétiques précis, pour aboutir à la constitution d'un nouveau sporophyte.

L'embryogenèse somatique est un processus par lequel les cellules du sporophyte donnent naissance, sans fusion gamétique, à des embryons qui passent par des stades embryologiques caractéristiques.

L'embryogenèse somatique présente plusieurs avantages par rapport à la micropropagation conventionnelle :

- § Les embryons somatiques peuvent être induits à partir de cellules cultivées en suspension, ce qui rend possible une production en fermenteur et réduit considérablement le coût de production.
- § Les taux de multiplication sont généralement importants et chez certaines espèces, les embryons peuvent être encapsulés et traités comme des graines artificielles.
- § Des plantes complètes sont obtenues directement suite au processus de germination. Les manipulations sont donc simplifiées par rapport à la micropropagation traditionnelle qui nécessite plusieurs milieux différents pour le développement des tiges et des racines et l'obtention de plantules complètes.

Cependant, plusieurs difficultés subsistent en embryogenèse somatique :

- § L'induction du potentiel embryogène et la régénération restent souvent difficiles.
- § Les cultures de cals, et plus encore les cultures de cellules isolées, sont propices à l'apparition de mutations géniques pouvant être responsable d'une variabilité des plantes issues de la culture. Toutefois, dès que cette variabilité sera maîtrisée, l'embryogenèse somatique permettra de produire des quantités très élevées de plantes à faible coût. Certaines espèces, telles que le palmier dattier ou certains conifères font déjà l'objet d'une production industrielle par embryogenèse somatique.

4-5-1- Les premiers travaux :

Il est généralement admis que l'embryogenèse expérimentale a été observée sur la carotte pour la première fois par Reinert (1958) puis par Steward (1958), mais

les photographies ou les dessins que nous ont laissé des auteurs plus anciens, montrent à l'évidence qu'ils avaient déjà obtenus très certainement des embryons en culture, mais qu'ils ne les avaient pas reconnus comme tels les confondant avec de simple bourgeons.

Steward a attribué beaucoup d'importance au lait de coco dans la stimulation de l'embryogenèse. Cependant, Wetherell et Halperine (1963), choisissant comme matériel d'expérience la carotte sauvage, qui donnent des embryons mieux formés que ceux provenant de la carotte domestique, estiment que le lait de coco n'est pas indispensable au déclenchement de l'embryogenèse alors que l'ion ammonium par contre joue un rôle essentiel.

Cependant une embryogenèse somatique n'a été mise en évidence que depuis les années 80, de manière incontestable dans plusieurs cultures de céréales (Wernicke., Brettell., 1980 ; Vasil V., Vasil I.K., 1981 ; Vasil et *al.*, 1985). Le nombre d'espèce chez lesquelles l'embryogenèse somatique a été décrite ne cesse d'augmenter, atteignant 130 (Thorpe., 1988). Cependant la culture des tissus des dicotylédones est plus simple comparé aux monocotylédones (Reinert et Bajaj., 1977).

L'embryogenèse somatique a été décrite chez le blé (Bustamante., 1999 ; Baochun et *al.*, 2003) l'orge (Zdenko Regel., 1987) le maïs (Novak et *al.*, 1983) le riz (Rueb et *al.*, 1993) et avec lesquels des embryoïdes ou des embryons somatiques ont été observés, mais si la voie de l'embryogenèse a paru moins évidente dans ces cas, c'est probablement à la suite des difficultés rencontrées lors de la régénération. Certains auteurs reportent le processus de germination à l'organogenèse (Fernandez et *al.*, 1999).

Cependant, chez d'autres espèces telle que la patate douce, carotte, céleri, luzerne et la vigne, l'embryogenèse somatique constitue la voie la plus efficace concernant la régénération chez ces plantes. En effet, la technique permet d'obtenir un taux élevé et inégalable de multiplication. En plus, le processus de l'embryogenèse aboutit à la production de structures bipolaires, c'est-à-dire comprenant un axe apical et racinaire. (Sihachakr et *al.*, 1994).

4-5-2- Induction de l'embryogenèse somatique :

Il est indispensable que l'explant soit, dans un premier temps placé dans un milieu primaire contenant de l'auxine où les cellules subissent un processus de différenciation. Durant cette période, les cellules se multiplient pour former des amas globulaires ou amas proembryogène (PEM). Les cellules constituées de ces amas sont caractérisées par un cytoplasme dense et une taille réduite. Après cette période d'initiation embryonnaire, le transfert dans un milieu secondaire sans auxine permettra le développement des embryons somatiques.

Ces structures sont hautement organisées et consistent soit en primordia racinaires soit en tissus méristématiques capables de régénérer des pousses feuillées et des racines (Cure et Mott, 1978 ; Wernicke et *al.*, 1982) .

4-5-3- Modèles de l'embryogenèse somatique :

L'hypothèse émise par Sharp et *al.* (1980) stipule qu'il y a deux modèles pour l'embryogenèse :

4-5-3-1- Embryogenèse directe :

Dans ce cas, l'embryon apparaît directement sur l'explant mis en culture. Ces embryons sont issus de cellules déjà prédéterminées. Elles sont appelées : « PEDC » : Pre-Embryonic Determined Cells.

L'environnement *in vitro* sert uniquement à déclencher le processus de divisions organisées menant à l'embryogenèse.

L'embryon peut se former au sein d'une masse qui peut être assimilée à un cal. Cependant, sur le plan histologique cette masse est formée presque entièrement de proembryons. Ce cas est généralement considéré comme faisant partie de l'embryogenèse directe. La masse résulte de la multiplication des cellules PEDC et donc de leur clonage (PEDC cloning).

4-5-3-2- Embryogenèse indirecte :

Dans ce cas, une phase intermédiaire de callogenèse est nécessaire à l'embryogenèse. La culture *in vitro* conduit à la reprise de la mitose mais aussi à la détermination de certaines cellules dites « IEDC » : Induced Embryonic Determined Cells.

4-5-4- Culture d'embryon somatique :

Un apport important de la technique des cultures *in vitro* à la biologie, a montré que des cellules somatiques pouvaient produire des structures comparables à des embryons, méritant l'appellation d'embryons somatiques ou d'embryoïdes.

Leur culture qui nécessite des besoins nutritifs plus complexes a permis d'avoir des connaissances plus précises sur le rôle de l'endosperme durant les premiers stades de l'embryogenèse. Ceci a servi en particulier à la détermination des relations métaboliques et des substances qui se forment dans l'endosperme.

Au début, les chercheurs cultivaient des embryons partiellement développés dans un milieu enrichi en acide aminé et en vitamines. Mais la culture d'embryons plus petits (cordiforme) n'a été réussie qu'avec l'usage du lait de coco contenant d'autres substances inconnues à l'époque.

La culture d'embryons somatiques peut se réaliser aussi bien en milieu gélosé qu'en milieu liquide. Ce dernier possède l'avantage de permettre une meilleure observation des embryons.

Les embryons somatiques présentent certains avantages pour la multiplication des plantes. Ils proviennent en principe d'une seule cellule et ils devraient donner des plantes génétiquement uniforme, l'embryogenèse somatique apparaît donc comme une alternative intéressante pour la propagation des plantes.

4-5-5- Evaluation de la différenciation embryonnaire :

Si l'on suit le développement d'un embryon de capselle depuis le début de sa formation jusqu'au stade adulte, qui correspond à la possibilité de germer, on s'aperçoit que sa morphologie et son développement s'effectue selon une séquence de stades définis : le stade globulaire, le stade cordiforme (cœur), le stade torpille, et le stade cotylédonaire (fer à cheval) (Fig : I-1).

Les stades successifs du développement embryonnaire ont été définis par Rijiven (1952) puis par Ragavan et Torrey (1963) ces stades sont indiqués sur le tableau : I-1.

Tableau : I-1 : Evolution morphologique d'un embryon (Rijiven., 1952 ; Ragavan ; Torrey., 1963).

Longueur (μm)	Type
20-60	Globulaire jeune
60-80	Globulaire âgé
80-150	Cordiforme jeune
150-250	Cordiforme âgé
250-450	Pince
450-700	Torpille
700-1000	Canne
1000-1700	Fer à cheval
>1700	Embryon mûr

4-5-6- Maturation et conservation des embryons somatiques :

L'évolution des embryons somatiques en plantes semble poser de sérieux problèmes. Ces difficultés sont signalées dans de nombreux articles. En effet malgré l'abondance des embryons au stade globulaire et cordiforme rare sont ceux qui atteignent les stades supérieurs.

Les populations d'embryons ne sont pas uniformes, les embryons somatiques peuvent être transformés en semences artificielles. Ils sont enrobés par un gel composé d'alginate avec les éléments nutritifs nécessaires à la germination de l'embryon. L'ensemble est protégé de dessiccation par un film de résine soluble dans l'eau (polyox) (Kitto et Janick., 1985).

La durée de conservation est actuellement faible mais pourrait s'allonger par l'induction de la dormance. Actuellement les graines artificielles ne peuvent être conservées, à l'état humide et au froid, qu'une huitaine de jours. Il reste donc de nombreux problèmes à résoudre.

4-6- Culture d'embryons :

L'embryon lui-même est le résultat du développement qui a suivi la formation du zygote issu de la fusion des deux gamètes parentaux. Le patrimoine héréditaire de l'embryon est la réunion des facteurs géniques apportés par chacun des deux gamètes parentaux.

Par ailleurs, avec la découverte des hormones de croissance et le développement des techniques de morphogénèse *in vitro*, l'environnement naturel de l'embryon est bien connu mais devient de plus en plus complexe à cause des interactions des substances chimiques et de leurs interventions sur le développement de l'embryon et la morphogénèse en général.

4-6-1- Historique de la culture d'embryons :

L'évolution de la technique de culture d'embryons dans le temps est différente de celle de la culture des tissus végétaux, elle la précède beaucoup. Le tableau : I-2 montre les grandes dates de découvertes et d'applications de la culture d'embryons *in vitro*.

Tableau : I- 2: Les grandes étapes historiques de la culture d'embryons (Monnier., 1995).

Chercheurs et Années	Découvertes et applications
Charles Bonnet 1754	Culture d'embryons mûrs de la fève sur milieu artificiel.
Hanning 1904	Culture d'embryons prématurés des Crucifères sur un simple milieu
Brown 1906	Découverte de l'effet stimulant de la glutamine.
Laibach 1925	Sauvetage d'embryons issu d'un croisement interspécifique <i>in vitro</i> .
Kögl et al 1934	Découverte de l'auxine AIA (Acide Indole Acétique).
Li 1934	Addition de l'extrait de l'albumen du Ginkgo au milieu de culture d'embryons.
Tukey 1934	Culture d'embryons prématurés des arbres fruitiers à maturation précoce.
Raghavan & Torrey 1936	Développement des plantes issues des embryons de 60 µm de taille sur un milieu artificiel.
La Rue 1936-1938	Culture d'embryons à germination précoce pour les monocotylédones.
Nobécourt & Gantheret 1937	Utilisation pour la première fois de l'AIA dans la culture <i>in vitro</i> des embryons
Van Overbeek et al 1941	Addition de lait de coco au milieu de culture d'embryon <i>Datura</i> .
Randolph 1945	Réduction du cycle de développement de l'Iris par la rupture de dormance.
Rijiven 1952	Effet de la pression osmotique sur le développement d'embryons <i>in vitro</i> et l'effet stimulant de la glutamine.
Norstog & Smith 1963	Addition de l'acide malique au milieu de culture des embryons d'orge.
Norstog 1965	Développement des plantes issues des embryons de 60 µm de taille sur un milieu artificiel.
Monnier 1970	La toxicité de la forte concentration des sels minéraux sur le développement des embryons.
Monnier 1971	Développement des plantes issues des embryons de 50µm des tailles sur un milieu artificiel.
Monnier 1973	Développement d'une nouvelle solution moins toxique et stimule la croissance des embryons.
Monnier 1976	Différents changements en exigences nutritionnelles pour la maturation des embryons précoces.
Rhagavan 1973	Effet des composés azotés sur la culture d'embryons.
Norstog & Monnier 1986	La dépendance de la différenciation des embryons à sa durée passée dans l'ovule.

4-6-2- Culture d'embryon mature et immature :

L'obtention *in vitro* de cultures de tissus de monocotylédones est signalée moins fréquemment dans la littérature que celle de tissus de dicotylédones (Gautheret., 1959). Citons ceux de (Shimada., 1978 ; Schaeffer et *al.*, 1979) sur le blé ceux de Green (1982) sur le maïs

La technique de culture d'embryon s'est beaucoup améliorée ces dernières années. Un des critères qui permet d'apprécier cette évolution est la taille minimale de l'embryon qu'il est possible de cultiver. Hanning (1904) cultivait des embryons de 2 millimètres de long sur un milieu relativement simple, l'amélioration des conditions de culture a permis à La rue (1938) de cultiver avec succès des embryons de 500µm.

En 1941, Van Overbeek et *al.*, ajoutèrent du lait de coco au milieu et obtinrent des plantules à partir d'embryons de 15µm. Raghavan et torrey., (1963) ont signalé le début de développement d'embryons de 60µm.

Dans différents laboratoires d'amélioration des plantes de l'INRA la culture d'embryons immatures a permis d'obtenir des plantes hybrides dont certains sont inédits :

- § L'orge (*Hordum vulgare*) une espèce voisine du blé (*Triticum timopheevin*)
- § Les radis (*Raphanus sativus*)
- § Le chou (*Brassica oleracea*)
- § Le tournesol (*Helianthus annus*).

4-6-3- Appréciation de la valeur de la technique de la culture d'embryon :

- 1- Les croisements entre des plantes dont les caractères sont éloignés sont généralement infructueux à cause de l'impossibilité pour l'embryon de se développer sur la plante mère, cette inaptitude du zygote à produire un embryon viable est due à des phénomènes d'incompatibilité entre l'embryon et l'albumen, ce dernier est alors incapable d'assurer une nutrition

convenable à l'embryon et finalement il n'y a formation que de rares graines dont beaucoup avortent. La culture d'embryons permet de surmonter cette incompatibilité par sauvetage d'embryons.

- 2- L'observation de la morphogénèse d'un embryon va permettre d'analyser celle-ci plus communément que la fastidieuse méthode des coupes.
- 3- Grâce à l'emploi de milieux nutritifs appropriés il est possible de modifier à volonté le mode de développement et connaître les facteurs déterminants de l'embryogenèse ainsi que d'expliquer quelques problèmes fondamentaux *in situ*, tels que la nutrition de l'embryon dans l'ovule.
- 4- Un gain de temps, une réduction de la durée entre deux générations, on peut ainsi cultiver plusieurs génération par ans et accélérer les procédures classiques de la sélection.
- 5- La culture *in vitro* d'embryons permet de réduire fortement la dormance des graines fraîchement récoltées, les causes de la dormance se trouvent soit dans l'embryon lui-même, c'est à dire au niveau de l'expression génotypique des cellules, soit par des inhibitions se trouvant dans l'environnement naturel de l'embryon au sein de la graine.
- 6- Obtention de variants qui augmentent la variabilité génétique chez les espèces (Nozeran et Bancilohon., 1972).

4-6-4-Origine de la mortalité des embryons :

Les jeunes embryons, particulièrement fragiles, ont une survie qui varie beaucoup suivant la nature du milieu de culture. En dépit de l'amélioration des conditions de culture par un meilleur équilibre des concentrations ioniques, la mortalité des très jeunes embryons demeure très importante. Il apparaît que l'effet nuisible de la solution minérale ne peut être complètement supprimé.

Quand nous examinons un embryon de type cordiforme à la fin de la culture nous observons généralement, à sa base, une tache brune, cette tâche se reconnaît bien sur les embryons après coloration histologique car elle est très chromophile. La tâche brune est composée d'un certain nombre de cellules dont le protoplasme contracté révèle qu'elles sont mortes, après, pour quelques une d'entre elles, avoir considérablement augmenté leur paroi (Thomas et Monnier., 1976). Il s'agit d'une réaction de la partie blessée de l'embryon après coupure du suspenseur. Le milieu pénètre dans l'embryon à travers la brèche ouverte, sans contrôle, et lèse l'aire hypophysaire seule les cellules se trouvant en position éloignée de cette région peuvent grandir et, si l'embryon est très petit, formé d'un petit nombre de cellules, aucune de celles-ci ne restent vivantes. De nombreuses observations viennent appuyer cette hypothèse.

C'est ainsi que si l'on met en culture pendant des temps variés 2, 8, 16 heures des embryons munis de leurs suspenseurs, on peut mettre en évidence la progression de la nécrose depuis la partie basale du suspenseur vers l'embryon en utilisant le bleu d'Evan (Monnier., 1984) ce colorant à la propriété de pénétrer dans les cellules et d'en colorer les protéines (Gaff et Okog,o-Ogola., 1971) Fig :I-2.

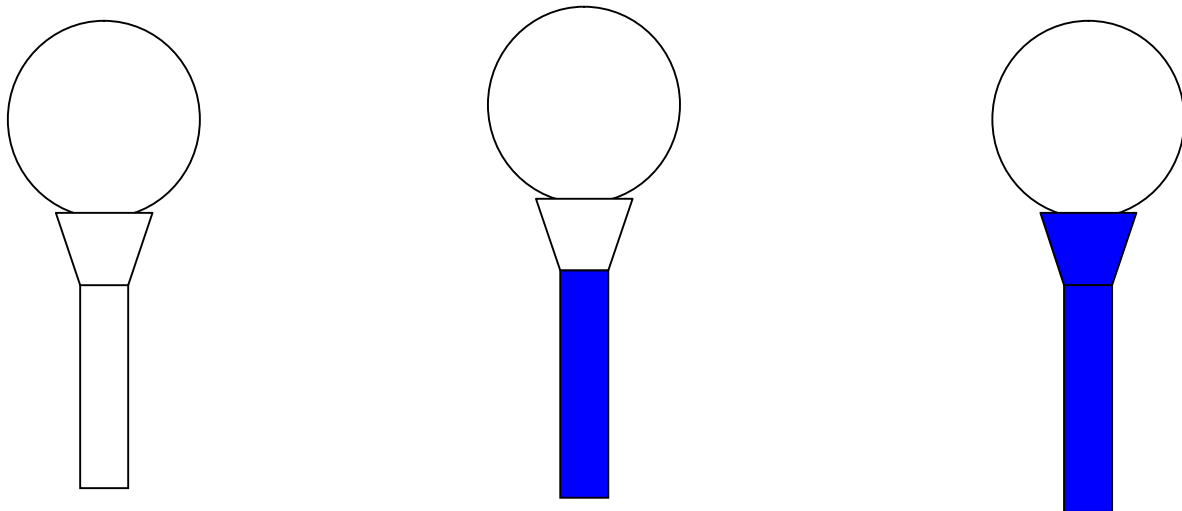


Figure : I-2 : embryons schématisés après 6, 8 et 16 heures de culture Monnier (1984).

D'autres hypothèses ont été formulées par Monnier (1995) pour expliquer la mortalité des embryons de petites tailles :

-L'albumen approvisionne l'embryon avec des substances spéciales, lesquelles sont manquantes dans le milieu dans ce cas, le sauvetage des très petits embryons exige des améliorations du milieu qui doivent encore être trouvées.

-L'explication est basée sur l'effet protecteur de la masse de tissus qui représente l'ovaire. Donc, la culture d'ovaires est probablement un ajustement du milieu au besoin de l'embryon par l'albumen, au moins au début de la culture, parce qu'il dégénère au cours du temps.

4-6-5- Croissance et survie des embryons :

Généralement, lorsque des embryons de différentes longueurs sont excisés et déposés sur un milieu nutritif, on peut constater que la survie des embryons augmente avec leur taille. En effet, lorsqu'un embryon est plus de 200µm, il n'est pas influencé par les conditions de culture (Monnier., 1995).

Les embryons doivent disposer d'une source de sucre et généralement, le saccharose s'est révélé être la meilleure source énergétique. De nombreux auteurs ont montré que la concentration de saccharose doit être plus élevée que la concentration que l'on emploie ordinairement dans les milieux utilisés pour la culture des tissus. C'est ainsi que Rietsema., Satina et Blakelee (1953) ont montré que la survie varie de façon importante avec la concentration en saccharose.

D'autre part, Hannig signala dès 1904 que l'asparagine était un acide aminé très efficace pour exalter la croissance embryonnaire. Cependant, Paris et al (1953) montrèrent que la glutamine est supérieure à l'asparagine.

Toujours dans le but de stimuler la croissance des embryons en culture, de nombreux auteurs ont ajouté au milieu de culture des extraits de plantes. Cette idée

vient principalement à l'esprit quand on sait que l'embryon croît à l'intérieur de la graine par assimilation de l'endosperme. Li (1934) ajouta au milieu de culture un extrait de l'endosperme qui stimula considérablement le développement des embryons en culture. Les effets du lait de coco sur les embryons de *Datura* ont souvent été reportés.

D'autre part Veen (1963) et Raghavan et Torrey (1964) ont montré que les cytokinines et les auxines sont susceptibles d'augmenter la survie des embryons en culture.

Il est observé que le taux de survie des embryons cultivés *in ovulo* est toujours plus supérieure que celui des embryons isolés, bien qu'il ne soit pas possible de cultiver des embryons isolés de 25µm, ces embryons survivent toujours dans des ovules cultivés *in vitro*. Dans ce cas le taux de survie arrive à 40% (Monnier., 1984).

4-7- Callogenèse :

En culture *in vitro*, le cal est le tissu de néoformation produit par l'explant initial ou après des repiquages successifs (Margara., 1989).

4-7-1- Principaux facteurs contrôlant la callogenèse :

4-7-1-1- Explant initial :

L'aptitude à la callogenèse peut varier suivant plusieurs facteurs dont l'explant que l'on met en culture et ainsi qu'à l'espèce à laquelle dérive l'explant.

L'induction de la callogenèse est effectuée *in vitro* à partir de divers explants de blé : caryopses (Gosch-Wackerle., Avivi & Galuns., 1979) ; scutellum (Bommineni, Jauhar., 1996) ; mesocotyles (Yurkova et al., 1981 ; Yurkova., et al ., 1982) ; Inflorescence (Chu., Wang & Sang., 1987 ; Gosch-Wackerle., Avivi & Galuns., 1979 ; Maddok et al., 1983) ; feuilles (Ahuja., Pental & Cocking., 1982), protoplasmes (Yang., He et Scott., 1993). Toutefois, les embryons zygotiques excisés demeurent les explants les plus utilisés, ils constituent une bonne source d'explant chez les monocotylédones et

chez un grand nombre de dicotylédones. Nombreux sont les auteurs ayant travaillé sur les embryons matures de blé (Mohamand & Nabors., 1991 ; Mendoza., Kaepler., 2002). Cependant divers auteurs estiment que les embryons immatures excisés présentent des capacités remarquable pour la régénération (Yurkova et *al.*, 1981 ; Ozias-Akins and Vasil., 1982 ; Maddock et *al.*, 1983 ; Machii et *al.*, 1998)

4-7-1-2- Milieu de culture :

Le choix du milieu de culture est arbitraire dans la culture *in vitro*. Selon Monnier (1995) la croissance et la survie des embryons sont considérablement affectés par la composition minérale du milieu.

Le processus de croissance - développement des plantes est en grande partie étroitement liée à la composition du milieu de production.

La plus part des auteurs commencent par essayer le milieu MS (Murashige et Skooge., 1962) il est généralement le plus utilisé lorsqu'il s'agit d'organogenèse, d'embryogenèse et de callogenèse, il est caractérisé par sa composition en éléments minéraux nécessaires aux différentes activités du métabolisme cellulaire (Kirkby et Mengel., 1979) le fer constitue un élément essentiel pour la croissance.

Les milieux liquides sont employés essentiellement pour les cultures de cellules et des protoplastes, très peu pour les explants de tailles supérieures. Le problème rencontré est l'oxygénation du milieu, c'est pourquoi les cultures en milieu liquide sont souvent en agitation (agitateurs rotatifs) ou sur du papier filtre imbibé Heller (1953).

4-7-1-3- Régulateurs de croissances :

Ils constituent la classe la plus importante pour l'induction de cals. En effet, l'initiation des cultures n'est possible que si le milieu contient des concentrations relativement importante d'auxine ($>10^{-5}$ M). L'auxine synthétique la plus efficace est probablement le 2.4-D, cependant d'autres auxines ont été utilisées comme l'ANA, le

dicamba, le 2, 4,5 -T et le picloram (Udvardy. *et al.*, 1976 ; Collins., Vian and Phillips., 1978).

Généralement, si l'on cultive des fragments d'organes dans un milieu contenant une auxine on peut observer cinq actions, suivantes la stimulation de la multiplication cellulaire : callogenèse, rhizogenèse, inhibition des bourgeons, stimulation ou freinage de la croissance des feuilles, transformation hyper hydrique.

Les cytokinines, dont l'existence dans la plus part des végétaux a été mise en évidence (Skoog *et al.*, 1966) sont utilisés maintenant couramment pour les cultures des tissus, elles ont cependant, montrées des cas d'inhibition.

Bien que les auxines et les cytokinines soient souvent considérées comme antagonistes, leur utilisation simultanée à parfois un effet synergique sur certains processus physiologiques. Skoog et Millier (1957) ont montré qu'une prédominance d'auxines favorise le développement racinaire.

4-7-2-Facteurs de l'environnement :

4-7-2-1- Lumière :

La lumière peut stimuler la prolifération et la croissance des cals, cette dernière pourrait aussi contribuer à la formation des cals (Briggs., 1964), de façon générale le début de croissance nécessite une faible intensité lumineuse (500 à 1000 lux) avec 12 à 16 heures de photopériodes. Pour les tissus cultivés à l'obscurité, la photosynthèse n'est pas une activité nécessaire, puisque l'énergie est fournit sous la forme de glucides.

4-7-2-2- Température :

La température des salles de culture est habituellement réglée de façon constante à 22 ± 25 C°. Cependant, la température réelle des tissus à l'intérieur des récipients de culture peut être supérieure de 2 à 4 C°, c'est pourquoi il est préférable de régler la température de la salle à 2 C° au-dessous de celle que l'on désire, pour favoriser la callogenèse la plupart des auteurs utilisent des températures de 22 ± 25 C°.

4-8- Etude de la variation somaclonale :

Le terme variation somaclonale à été introduit par Larkin et Scowcrof, (1981) qui désigne la variation génétique découverte chez les somaclones.

Alors que la micropropagation produit généralement des plantes d'une grande uniformité génétique, un taux élevé de variation peut être induit en culture *in vitro* lorsque les cultures sont réalisées en conditions particulières Sibi (1974).

Gautheret (1955) a décrit en détail des observations sur des souches de cals de carotte, cultivées dans son laboratoire depuis plusieurs années, qui étaient devenues brutalement « habituées à l'auxine ».

Chautuverdi et Mitra (1975) a observé chez *Citrus grandis* que certains cals formant habituellement des tiges, devenaient capables de former des embryons somatiques. Selon Zheng et al (1989) des variations soudaines de caractères comme la pigmentation la vitesse de croissance, la friabilité des cals, le taux de production d'alcaloïdes ont également été décrites chez plusieurs espèces comme l'ognon, le tabac, la tomate, la canne à sucre, le cotonnier, les fenouils et la laitue et d'autres.

La variation somaclonale, induite par une culture plus ou moins longue des cellules en conditions artificielles, est bien connue chez les plantes Skirvin et al (1994) une partie de cette variation est due à des mutations de gènes. Ces mutations ne diffèrent pas essentiellement de celles qui apparaissent spontanément ou sont induites par des traitements mutagènes. Pour autant que la régénération des plantes à partir des cultures soit efficace, la variation somaclonale est une source de diversité complémentaire, parfois utilisable en sélection, en raison du grand nombre de cellules susceptibles d'être atteintes.

Les résultats de nombreux travaux ont montré que les techniques de culture *in vitro* sont les plus adéquates pour la sélection de variants sans apport étranger. Les variants sélectionnés à ce jour pour la tolérance au stress hydrique chez le blé ont été obtenus par des méthodes de sélection fondées sur la mise en œuvre d'une pression sélective ; le PEG a été utilisé en de nombreuses investigations comme agent sélectif

(Janes., 1966 ; Milache., 1970). McClendon & Blinks (1952) utilisaient le polyéthylène glycol bien avant 1952, pour créer un stress osmotique. Le PEG a aussi été utilisé dans plusieurs autres investigations (Michel., 1970 ; Kaufmann & Eckard., 1971 ; Ruf et al., 1967) afin de créer le stress hydrique chez plusieurs espèces. Le même principe est appliqué pour la sélection de plantes tolérantes à la salinité on cite les travaux de Piri et al (1994) effectués sur des plantes androgénétiques de blé tendre. Chez le riz par exemple, des taux importants de variants somaclonaux ont été obtenus *in vitro* pour la tolérance au stress abiotique (Bertin et Bouharmont., 1997).

La variation somaclonale a amené à de nouveaux caractères intéressants telle la résistance au stress biotique, la résistance aux maladies, la précocité de floraison, accroissement de vigueur, couleur et forme des fleurs. Ainsi que de corriger les défauts des variétés déjà existantes, en introduisant ces nouveaux caractères. Des génotypes résistants à certains virus, ont été obtenus chez la tomate et la pomme de terre (Evans., 1989). Des plantes de canne à sucre présentant un taux de sucre plus important ont été isolées.


4-8-1-Type de variation somaclonale :

Selon Evans et al (1984) il existe deux types de variations somaclonales :

- **Variation héritable** : Ce type de variation est stable à travers le cycle sexuel ou renouvelée à travers une propagation asexuée.
- **Variation épigénique** : Elle peut être instable même quand elle est propagée asexuellement.

La variation somaclonale bien qu'elle constitue un inconvénient quand on cherche la production conforme peut être une source très utile pour l'amélioration des plantes (Wang et al., 1994). Le tableau : I-3 : illustre les niveaux relatifs acceptés de variation somaclonale dans la culture *in vitro*.

Tableau I-3 : Niveaux relatifs généralement acceptés de variation somaclonale dans la culture *in vitro* de matériel végétale (Wang et al., 1994).

Méthode de culture de tissus	Niveau relatif de variation
§ Méristèmes (apicaux +axiliaires)	BAS
§ Masses embryogéniques -embryons somatiques -embryons gamétogéniques	
§ Cal inorganisé -bourgeons adventifs	
§ Suspensions cellulaires	
§ Protoplastes	

4-8-2- Caractères affectés par la variation somaclonale :

Les caractères affectés concernent les caractères morphologiques, physiologiques, phytopathologiques (Chaugardieff., 1985 ; Kumar., 1994).

Les premières expériences incluant des pressions sélectives, effectuées par Carlson (1975) chez le tabac, ont donné des résultats positifs mais à cette époque ces expériences difficiles à interpréter furent controversées.

Selon Meulmans (1984) la variation somaclonale touche le plus souvent les caractères monogéniques, parfois les caractères polygéniques. D'autres auteurs estiment que les variations somaclonales peuvent être les résultats soit de la culture de cals, soit de la culture de cellules ou de protoplastes.

4-8-3- Avantages et inconvénients de la variation somaclonale :

La variation somaclonale permet l'élargissement de la variabilité génétique qui constitue la base de tout programme d'amélioration des plantes pour la création variétale. A cela s'ajoute le fait qu'elle permet de corriger les défauts des variétés déjà existantes, en introduisant de nouveaux caractères (Ducreux et Rossignol., 1986). Selon Kumar (1994) elle fournit d'excellentes opportunités pour les changements génétiques au sein d'une plante.

En effet, depuis la sélection *in vitro*, tous les types de caractéristiques ont de plus en plus été tentées, et de nombreux auteurs les ont signalées. Par exemple, la résistance aux maladies (Crocomo., Ochoa-Alejo., 1983 ; Sacristán., 1986), aux herbicides (Chaleff., 1986 ; Huges., 1983), aux sels minéraux (Borst., Greaves., 1987), et au froid (Chen et Gusta., 1986), aux traumatismes (Tal., 1983).

Toutes ces recherches sont très stimulantes pour l'amélioration des plantes dans la mesure où ces nouvelles potentialités avantageuses sont maintenues dans la plante régénérée.

Cependant, la variation somaclonale présente un certain nombre d'inconvénients liés essentiellement à sa nature incontrôlable et imprévisible, à sa dépendance des cultivars et à la faible fréquence des changements désirables et héréditaires par rapport à la fréquence totale des variants obtenus.

Matériels et méthodes

1- Matériel végétal :

Nous avons utilisés au cours de notre expérimentation trois variétés de blé dur (*Triticum durum*): Oued Zenati, Djenah khetifa et Waha, ainsi que trois variétés de blé tendre (*Triticum aestivum*): Aïn Abid, Mexipak et Mahon Demis, présentant des origines variables, afin de tester leurs aptitudes à la callogenèse.

Les variétés consistent en une sélection de la station expérimentale ITGC (Institut Technique des Grandes Cultures), le tableau ci-dessous résume les principales caractéristiques des variétés. (Tab : II-1).

Tableau : II-1 : Caractéristiques principales des variétés de blé tendre.

Variétés (Blé tendre)	Abréviation	Origine	Caractères
Mexipak	MX	Mexique - Pakistan. Sélection 1973 (Obtenteur CIMMYT)	Modérément tolérante à la sécheresse, bon rendement, bonne qualité, modérément résistante aux maladies
Mahon Demias	MD	Iles Baléares. Sélection généalogique ITGC/ Sidi-Bel- Abbés.	Tolérante à la sécheresse, très adapté aux hauts plateaux bonne qualité, sensible à la verse, tolérante à la rouille jaune et au charbon.
Aïn-Abid	AA	Introduction en 1986 (Espagne). Culture algérienne.	Tolérante à la gelée et à la sécheresse, résistantes à plusieurs maladies, très bon rendement, très bonne qualité.

Tableau : II-2 : Caractéristiques principales des variétés de blé dur.

Variétés (Blé dur)	Abréviation	Origine	Caractères
Waha	WH	ICARDA- Sélection ITGC/EI Khroub.	Moyennement tolérante, bon rendement et stable résiste à différentes maladies, bonne qualité semoulière,
Oued Zenati	OZ	Station de Guelma 1936.H	Bonne tolérance, variété tardive, bonne qualité semoulière, sensible à la verse, tolérante à la septoriose.
Djenah Khetifa	DK	Variété population sélectionnée depuis les premiers botanistes.	Assez tolérante à la sécheresse

2- Dispositif expérimental et conduite de l'essai :

2-1- Installation de l'essai :

Les grains matures ont été pré germés en boîtes de Pétri à l'obscurité et à une température ambiante de 25°C.

5 à 6 grains au maximum sont disposés régulièrement espacés de manière à éviter un chevauchement des racines pouvant aboutir à une cassure au moment du transfert.

Les plantules ainsi obtenues ont été semées le 02-01-2004 dans des pots en plastiques de 5 kg environ (30 cm de diamètre et 40 cm de profondeur) contenant un mélange de sable et de sol (2 /3 sol, 1/3 sable).

60 pots ont été semés, les plantules sont semées à raison de 5 par pot ceci étant pour les 6 variétés (10 pots / variété)

Les pots sont ensuite placés sous serre sous éclairage naturel. L'arrosage est effectué régulièrement avec l'eau de robinet chaque 2 à 3 jours.

La culture d'embryons immatures interrompt la phase de maturation de la graine. Les caryopses sont prélevés 14 jours après l'anthèse, vu que la majorité des travaux effectués donne de bons résultats avec cette date de prélèvement.

2-2 Préparation du matériel végétale :

Les précautions exigées pour maintenir l'asepsie des cultures de tissus sont d'un ordre supérieur car elles sont sans défense (Volcani., Riker et Hildebrandt., 1953).

La difficulté de stérilisation tient de la nécessité absolue de la destruction totale des micro-organismes par les produits employés sans que les cellules de tissus (qui sont au moins aussi sensible que les bactéries et au champignons) soient abîmés. Il faut donc respecter un temps de trempage bien précis. Selon Boulay (1993) la durée des bains varie selon le type de grain et la concentration du désinfectant plus la concentration en hypochlorite est forte plus le temps de passage dans la solution du désinfectant doit être court.

De même, plus la graine est fragile plus la concentration du désinfectant devra être faible et la durée d'immersion courte.

2-3- Désinfection des caryopses matures et immatures :

Les caryopses sont plongés dans de l'éthanol à 70% en agitant fortement afin de dissoudre les substances cireuses pouvant imprégner leur tégument, ils sont ensuite débarrassés de l'éthanol par lavage à l'eau distillée stérile.

Les caryopses égouttés sont immergés dans une solution d'eau de javel commerciale à 12% diluée 2 fois pendant 20 minutes sous une hotte à flux laminaire, en agitant fortement, suivi de 5 rinçages successifs à l'eau distillée stérile.

Après avoir subi l'action de l'hypochlorite, les grains sont transportés au moyen d'une pince stérile, dans des boîtes de Pétri stérile contenant du papier filtre imbibé d'eau distillée stérile.

Les boîtes sont ensuite placées à l'obscurité et à une température ambiante de 25°C environ, afin de provoquer le gonflement des caryopses.

2-4- Choix du milieu de culture :

Les embryons zygotiques ont été cultivés sur une multitude de milieux comme le milieu B5 (Gamborg et *al.*, 1968) et LS (Linsmaier et Skoog., 1965) ce dernier est fréquemment utilisé pour la culture d'embryons matures du maïs et du blé, mais le milieu MS (Murashige et Skoog., 1962) et de loin le plus utilisé lorsqu'il s'agit de callogenèse.

Nous avons ainsi adopté le milieu de Murashige et Skoog (1962) de façon à assurer la survie et la croissance des embryons matures et immatures.

2-5- Préparation du milieu de culture (Annexe 1):

Il s'agit d'une étape essentielle, car il est généralement admis que les erreurs dans la préparation des milieux de culture représentent la source principale de coûteux échecs Street (1977). Les éléments contenus dans notre solution nutritive sont les suivants :

2-5-1- Sels minéraux :

Composés de macro et de micro éléments : les solutions mères préparées doivent être stockées au froid (2°C) et à l'obscurité, pour une durée limitée.

L'équilibre minéral mis au point par Murashige et Skoog (1962) a été défini à partir de travaux sur la croissance des cals de tabac cultivés *in vitro*, il se trouve qu'il donne de bons résultats pour beaucoup de culture (embryons, méristèmes).

2-5-2- Sucres :

Le saccharose constitue en général la meilleure source de carbone et on l'apporte à la concentration de 20 g/l.

Le passage à l'autoclave provoque une altération des sucres par hydrolyse mais ceci ne présente pas d'inconvénients sur le plan de la croissance.

2-5-3- Vitamines et acides aminés :

Les vitamines utilisées sont : la Thiamine-HCL, la Pyridoxine-HCL, la Glycine et l'acide Nicotinique. Il a été démontré par plusieurs chercheurs, que l'emploi de diverses vitamines dans un milieu de culture favorise le développement des cultures *in vitro* Boccon-gibod (1980).

Comme il peut être long et fastidieux de peser les produits nécessaires à chaque préparation du milieu, l'utilisation des solutions mères dont les ingrédients sont incorporés au préalable est recommandée (Jensen., 1977 ; Anonyme., 1999 et Shama., 1999).

2-5-4- Régulateurs de croissances :

Ces substances sont utilisées à des doses faibles qui varient entre 10^{-2} mg/l et 10 mg/l, mais sont d'une importance considérable (Norstog., 1961).

Plusieurs régulateurs de croissances sont dégradables par la lumière en solution aqueuse comme la KIN, d'autres sont dégradés par la chaleur comme l'AIA, mais certains sont stables à 120° C tel que l'ANA, le 2.4-D, le BAP et la KIN.

Les régulateurs de croissances ne sont pas solubles dans l'eau, ils sont préalablement solubilisés dans des solvants appropriés (Tab : II-3).

Tableau : II-3 : Les différents types d'hormones de croissance et leurs solvants.

Hormone	Solvant approprié
2,4-D	1N NaOH ou EtOH
AIA	1N NaOH ou EtOH
AIB	1N NaOH ou EtOH
BAP	1N NaOH ou EtOH
KIN	1N NaOH ou EtOH

2-5-5- Substances gélifiantes:

On utilise de l'agar à 7 mg/l, c'est une substance extraite des algues marines appelés agar-agar ou gélose, elle se dissout à 100° C, et donne un gel transparent au-dessous de 40° C.

Après avoir mélanger les différentes quantités requises d'agents actifs pour chacune des formulations du milieu de culture, le pH sera ajusté à 5,7 avec du NaOH ou du HCL sous agitation permanente, on ajoute graduellement sur une plaque chauffante les sucres et l'agar d'une manière uniforme à la solution préparée jusqu'à ébullition où la plupart des moisissures et des levures seront détruites.

2-6-Conservation du milieu de culture :

Les milieux stérilisés sont généralement conservés à une température qui varie entre 4°C et 5° C mais ceci n'est pas absolument nécessaire. En revanche, les milieux contenant les substances de croissance seront conservés de préférence au froid.

Ces milieux seront conservés un mois au plus, car au-delà, il y a un risque de dessèchement.

2-7- Les différentes hormones utilisées pour l'induction de la callogenèse :

La plupart des travaux relatifs à l'induction des cals embryogènes à partir d'embryons matures et immatures rapportent l'utilisation du 2,4-D à l'ordre de 2mg/l, plusieurs auxines comme l'AIA et l'ANA et des cytokinines comme la KIN et le BAP ont été également employés.

Afin d'induire la callogenèse nous avons utilisé le 2.4-D avec deux concentrations différentes, on a testé également l'effet de l'AgNO₃ sur la concentration la moins élevée. Seul les meilleurs résultats seront retenus pour la culture d'embryons immatures des six génotypes de blé (Tab : II-3).

L'effet des trois milieux (A, B, C) sur les embryons cultivés *in vitro* est évalué jusqu'à la fin de la phase callogène.

Tableau:II-4: les différentes combinaisons hormonales additionnées pour l'induction de la callogenèse.

A	B	C
10mg/l de 2,4-D	2 mg/l de 2,4-D	2mg/l de 2.4D+1mg/l d'AgNO ₃

2-8- Préparation du matériel :

L'asepsie constitue un élément très important qui conditionne la réussite de la culture d'embryons, car certaines irrégularités des résultats, concernant notamment leur survie, semblaient dues à des différences dans les conditions de stérilisation (Monnier., 1971). Cette importance a suscité la prise en considération d'un certain nombre de mesures :

2-8-1- Stérilisation à pression :

La stérilisation du milieu de culture, est assuré par l'autoclave à une température de 120°C et une pression de 15 psi pendant 20 minutes. La technique de culture *in vitro* exige cette température de stérilisation ou plus pendant 15 à 20 minutes, afin de s'assurer de la destruction des bactéries endosporulantes.

La présence d'une seule bactérie dans un tube à culture donnera naissance en moins d'une ou deux semaines à une colonie de bactéries visible à l'œil nu.

La durée de la stérilisation est très importante et doit varier en fonction du volume des milieux contenus dans les récipients (Annexe 3) (Torres., 1989).

Dans le cas de tubes renfermant de 10 à 20 ml de solution nutritive, on peut se contenter d'une durée de 15 minutes. Par contre, des ballons ou des erlenmeyers contenant 3 à 4 litres liquide doivent séjourner à la l'autoclave pendant 40 minutes et même pendant 1 heure s'il s'agit de milieux gélosés car ceux-ci ne s'échauffent que lentement.

Les sucres sont altérés lorsqu'on les chauffe en solution aqueuse, cette altération ne présente aucun inconvénient pour la pratique courante, car elle se traduit par un accroissement de leur valeur nutritive (Ball., 1953).

2-8-2- Stérilisation de la hotte :

Avant chaque manipulation, la hotte doit être nettoyée d'abord avec de l'eau de javel (12%) puis on vaporise à l'alcool (70%) à l'intérieur des parois et la surface de travail ainsi que tout le matériel de travail et les instruments nécessaires.

La stérilisation est complétée en lavant les autres paillasse, sol...etc., on allume par la suite le bec bunsen et la hotte pendant 30 minutes avant manipulation.

2-8-3- Stérilisation à sec :

Tous les instruments métalliques (pince, pointe ,bistouri) ou verreries (Becher, boîte de Pétri) sont enrobés avec du papier d'aluminium, et sont mis à l'étuve pour une stérilisation à sec à une température de 170°C pendant deux heures de temps avant chaque manipulation. On évite ainsi le contact des instruments avec l'humidité lors de l'utilisation de l'autoclave, car durant la stérilisation sous pression, une portion de l'eau dans l'autoclave est changée en vapeur, ce qui implique l'oxydation des instruments métalliques .

2-8-4- Stérilisation à l'alcool :

Au cours des manipulations, les instruments sont plongés dans de l'alcool à 70°C, puis passés à la flamme du bec bunsen afin de brûler l'alcool.

La stérilisation se fait par le passage dans l'alcool, le passage à la flamme ne sert qu'à éliminer l'alcool (on garde l'instrument stérilisé toujours dans la sphère stérile).

2-8-5- Condition de travail :

Les techniques de culture *in vitro*, sont assez proches des techniques chirurgicales et micro chirurgicales, elles exigent, comme celles-ci beaucoup de soin dans le maintien des conditions d'asepsie car la présence d'une seule bactérie ou champignon suffit à envahir un milieu de culture c'est pourquoi il vaut mieux respecter le maximum de règles, quitte à les simplifier, il serait donc nécessaire de veiller à ce que tous les instruments stérilisés soient déposés dans la sphère stérile, de façon à avoir le moindre geste à faire au cours des manipulations et dans l'air stérile.

Les mains seront frottées souvent à l'alcool (70%), tout au moins systématiquement après qu'elles aient été en contact avec du matériel non stérile même sous la hotte à flux laminaire (Boulay., 1993).

Généralement, le travail se fait toujours prêt du bec bunsen dans un rayon

de 30 cm (Morel., 1956) Mais pour plus de commodité, les manipulations sont réalisées entre deux flammes assurées par le bec bunsen, afin d'assurer une atmosphère stérile.

2-9- Préparation des échantillons :

2-9-1- Dissection des grains matures :

180 grains matures stériles, ayant séjournés pendant 17 heures dans les boites de Pétri, sont désormais prêts à la dissection. Cette dernière est réalisée sous la hotte à flux laminaire et sous une loupe binoculaire nettoyée à l'alcool à 70% et après séchage elle est placée près du bec benzène.

L'incision est réalisée au niveau de la face dorsale du côté opposé à la brosse à l'aide d'une pince et d'un bistouri stérile, le capuchon du tube doit être maintenu de façon à ne pas le poser sur la paille.

L'incision fait ressortir les constituants liquides de la graine, l'embryon se trouve suspendu dans ce liquide, il est tout de suite récupéré à l'aide d'une autre pince stérile et déposé sur le milieu de culture approprié de façon à ne pas l'endommager.

2-9-2- Dissection des grains immatures :

Après récupération des épis, 120 grains âgés de 14 jours sont collectés et immédiatement stérilisés comme décrit précédemment puis disséqués sous la hotte dans des conditions d'asepsie total, l'utilisation de la loupe binoculaire est essentiel dans ce cas, pour la dissection vue la taille minime des embryons.

2-9-3- Ensemencement des explants :

L'ensemencement des embryons est réalisé sous la hotte près du bec benzène, les embryons sont disposés de part et d'autre à raison de trois embryons par boite de Pétri afin d'éviter tout risque de contamination.

Les embryons sont déposés de façon à ce que le scutellum soit bien en contact avec le milieu de culture.

2-10- Conditions physiques de culture des embryons matures et immatures :

Les boîtes ensemencées contenant les embryons matures et immatures sont placées dans une chambre de culture et maintenues à une température diurne de 25°C environ avec une photopériode de 16 heures de lumière.

2-11- Repiquage des cultures:

On procède au repiquage des cals sur un milieu frais, afin d'éviter les nécroses dues à l'épuisement des substances nutritives contenues dans le milieu.

La fréquence des repiquages est généralement de quatre semaines pour les transferts.

2-11-1- Milieux des repiquages :

Le milieu adopté pour les repiquages est toujours le milieu de base MS, il renferme tous les éléments nécessaires à la prolifération des tissus.

2-11-2- Premier repiquage :

Le premier repiquage a pour but d'éliminer les embryons n'ayant pas induit de cals, et ne garder ainsi que ceux qui sont capables de fournir de véritables cultures de tissus, il peut donc être considéré comme un prélèvement de second ordre.

La conduite des manipulations doit toujours être guidée par le souci de ne pas transporter dans les milieux neufs les germes qui peuvent contaminer certaines parties

ou la totalité du cal. Il est donc nécessaire de respecter toutes les conditions de stérilisation décrite précédemment.

Chaque cal est examiné individuellement et soigneusement afin de noter les différents aspects, ainsi que de repérer les régions qui ont le mieux proliférées.

Durant la phase d'induction les plumules allongées profitent mieux des composantes du milieu et inhibent la croissance des cals, ces inhibiteurs sont supprimés durant le premier transfert pour que les cals reprennent leur croissance avec une bonne activité.

2-11-3- Deuxième repiquage :

Les repiquages ultérieurs ont simplement pour but d'entretenir la prolifération de masses tissulaires, il suffit de transférer les explants produisant des cals.

C'est au cours de cette phase que l'on procède au découpage des cals, ces derniers ont désormais proliférés pendant deux mois sur le milieu de base MS.

Les cultures conservées seront alors examinées avec soin afin de déceler les contaminations.

Après avoir éliminé ces cultures infectées on rejettera encore celles qui présentent des colorations brunes. On procède de la même manière pour tous les repiquages successifs.

2-11-3-1- Découpage des cals:

Le cal primaire formé par l'embryon est très hétérogène car sous cette couche épidermique de cellules réactives demeurent des tissus différenciés non proliférants qui auront tendance à se nécroser en culture, il est donc déconseillé d'utiliser le cal

primaire directement pour la néoformation de plante. La manière dont on réalise ce découpage est la suivante (Gautheret., 1938) :

2-11-3-1-1- Cals cubiques et volumineux:

On voit parfois apparaître sur les cals des parties nécrosées ou des régions molles faites de tissus dissociés ayant plus au moins perdu la faculté de proliférer. Dans ces cas là on commence par isoler le cal le plus volumineux au moyen d'un bistouri stérile et on le transporte immédiatement dans sur un milieu frais.

Une fois le nettoyage étant terminé, on prend un second bistouri stérile puis on débite le cal en fragments cubiques. La rapidité ici consiste à séparer le cal de l'embryon qui peut renfermer occasionnellement des microorganismes.

2-11-3-1- 2- Cals composés :

A l'aide d'une pince à branches coudées et stériles on repique les nodules séparément, de tailles variables, sur un nouveau milieu de régénération.

2-11-4- Troisièmes repiquages :

50% des cals issus d'embryons matures et 50% des cals issus immatures sont transférés sur un milieu stressé contenant 10% de polyéthylène glycol. Il est à préciser que le PEG est un polymère non toxique et soluble dans l'eau il agit par pénétration dans les cellules de plusieurs espèces végétales (Lawler., 1970., Yaniv & Werker., 1983) et fait diminuer l'eau libre dans le milieu extracellulaire et l'eau disponible aux cellules (Hsissou & Bouharmont., 1994).

La manière dont la pression sélective est exercée est à considérer. Beaucoup de chercheurs appliquent des pressions sélectives faibles ou par palier en augmentant progressivement leur intensité, permettant ainsi une adaptation des cellules, cette adaptation se perd au cours d'un passage ultérieur sur milieu non sélectif et ne se

retrouve donc pas dans les plantes régénérées (Bouharrmont., 1991) par conséquent, on a préféré appliquer la pression d'emblée pendant 30 jours.

2-12- Induction de l'organogenèse :

Les cals ont été initiés à partir d'embryons matures et immatures et cultivés pendant 2 mois sur le milieu de base MS avant d'être soumis au stress (PEG) pendant 30 jours.

Après avoir bien respecté toutes les conditions d'asepsie on procède à la l'étape suivante dans laquelle on transfère tous les cals dans des tubes en verre y compris ceux présentant des nécroses.

2-12-1- Les hormones utilisées pour la régénération des cals:

L'effet des hormones sur l'organogenèse a été signalé par plusieurs chercheurs ayant étudié les techniques de culture *in vitro*. Le milieu de culture utilisé est toujours le milieu de base MS (Murashig et Skoog., 1962).

Dans un premier temps on a utilisé le milieu MS sans hormones puis l'AIB et la KIN et en dernier l'AIA et le BAP ceci étant pour les deux types d'embryons issus des six variétés de blé (Tab : II-5).

Des modifications ont été apportées au milieu de base MS additionné à l'AIA et le BAP, ceci au niveau de la concentration des macroéléments.

D'autres modifications ont été également portées au niveau de la concentration du saccharose, qui sera portée à 30 g/l car des valeurs plus élevées sont parfois utilisées pour modifier le comportement ultérieur des cultures, en particulier au niveau de l'organogenèse.

Tableau : II-5: Différentes hormones utilisées pour la régénération.

1 ^{er} mois	MS sans hormones
2 ^{ème} mois	1mg/l d' AIB+ 0.25mg/l de KIN
3 ^{ème} mois	1mg/l d' AIA+ 0.25 mg/l de BAP

2-12-2- Transfert en sol :

D'après les recherches qui ont été effectuées sur cette importante étape de transition Lee., Wetzstein et Sommer (1985) constatent que les principaux facteurs de réussite sont : le choix du substrat, arrosages, température, humidité relative, lumière, sans oublier un point fondamental qui est le contrôle stricte de l'état sanitaire du milieu.

Afin d'éviter la fanaison par perte d'eau excessive des feuilles, dont le système vasculaire et les cuticules foliaires sont peu développées, on commence par préparer les plantules au transfert pour éviter le choc du changement d'environnement (Jensen., 1976) ainsi deux jours avant la transplantation, les tubes sont placées dans un dessiccateur contenant de l'eau au dessus du niveau du support.

Les plantules sorties des tubes sous la hotte, doivent être soigneusement débarrassées du milieu de culture subsistant, puis placées à l'intérieur du dessiccateur.

Ainsi, après 8 mois de culture pour les embryons matures et 5 mois pour les embryons immatures issus des six variétés, les plantules présentant un bon système racinaire sont désormais prêtent pour le transfert en pots. Le substrat utilisé est un mélange stérile de sable de terre et de terreau avec des proportions de 1 :1 :1 par volume.

Les plantules sont placées individuellement dans les pots, ces derniers sont maintenus dans la chambre de culture, sous les mêmes conditions physiques de culture des embryons matures et immatures.

2-13- Paramètres physiologiques :

2-13-1- Principe du LCA 4 :

C'est un appareil portatif de mesure en circuit ouvert, analyseur de CO₂ et collecteur de données. Il mesure en plus les échanges d'eau où la feuille, *in situ* est enfermée dans une chambre d'assimilation étanche transparente en plexiglas de type (ADC'PLC) il permet de mesurer plusieurs paramètres, les paramètres suivants sont les seuls retenus :

- Photosynthèse nette ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
- Résistance stomatique en ($\text{m}^2\text{s mol}^{-1}$)

La feuille non détachée de la plante, repose entre la face supérieure (transparente) et la face inférieure (métallique) de la chambre d'assimilation, la mesure est enregistrée après stabilisation de l'appareil. Généralement le temps de mesure ne dépasse pas 60 secondes.

2-13-2- Mesures de la teneur relative en eau :

Elle est déterminée, selon la méthode de Clarck et McGaig en 1982, par le pourcentage d'eau présente dans la feuille excisée à la base du limbe et immédiatement pesée c'est le poids frais, l'extrémité sectionnée est trempée dans de l'eau distillée l'ensemble est maintenu à une température ambiante et à l'obscurité pendant 24 heures afin d'obtenir un taux maximum de réhydratation.

La feuille est ensuite retirée et passée dans un papier buvard afin d'absorber l'eau de la surface puis pesée c'est le poids de turgescence.

La feuille est enfin séchée à l'étuve à une température de 85°C pendant 48 heures puis pesée une dernière fois c'est le poids sec.

La teneur relative en eau (TRE %) a été mesurée à partir de la formule suivante :

$$\text{TRE (\%)} = \frac{\text{P.F} - \text{P.S}}{\text{P.T} - \text{P.S}} \times 100$$

2-14- Traitement statistique des résultats:

L'interprétation des données concernant l'effet des différentes hormones utilisées, est réalisée par une analyse de variance en utilisant le logiciel "STATITCF" Version 4 suivi d'une comparaison des moyennes au test Fisher au seuil de 5%. La séparation des groupes homogènes observée entre plusieurs moyennes est faite suivant le test de NEWMAN-KEULS au seuil de 5%.

Résultats et discussions

1- Taille des embryons matures et immatures :

Les embryons immatures collectés 14 jours après l'anthèse, ont une taille presque invisible à l'œil nu, mesurant 1 mm en moyenne. Les embryons récupérés sont plats et correspondent à une tâche minuscule suspendue dans un liquide transparent représentant l'albumen, mais dans la plupart des cas les grains ne comprennent pas d'embryons. Contrairement aux embryons immatures les embryons matures, ont une taille nettement supérieure mesurant 4 mm en moyenne.

Différent types d'embryons ont été distingués par leurs âges, leurs longueurs et leurs couleurs. Le tableau ci-dessous résume les différents paramètres :

Tableau : III-1: Tailles des embryons matures et immatures.

Type	Age (jours)	Longueur (mm)	Couleur
Embryons immatures	14	1	-Transparent à blanchâtre.
Embryons matures	>16	3 - 5	-Blanchâtre. -Blanchâtre.

2- Durée nécessaire entre l'inoculation et la réaction du scutellum :

Les embryons les plus âgés ont une activité précoce de la couche scutellaire durant cette courte période (Fig : III-1). Les embryons immatures mettent nettement plus de temps pour réagir avec le milieu. En effet, le gonflement du scutellum des embryons matures peut être observé en 53 heures en moyenne depuis la mise en culture tandis que, la réaction des plus jeunes n'est visible qu'au bout de 140 heures en moyenne.

Une variabilité interspécifique a été identifiée au sein d'un même type d'embryon. En effet, chez les embryons matures, les scutellums issus des génotypes de blé dur se gonflent plus rapidement (48 heures en moyenne) par rapport aux génotypes de blé tendre (58.56 heures en moyenne) et il en est de même chez les embryons immatures

où le gonflement du scutellum se fait en 144 heures en moyenne chez les génotypes de blé tendre, et en 136 heures en moyenne chez les génotypes de blé dur.

La variété Oued Zenati dérivée d'embryon immature, peut être considérée comme une variété précoce par rapport à l'ensemble des génotypes, vu que les scutellums de cette variété réagissent les premiers (120 heures en moyenne) (Fig : III-1) . En revanche, chez les embryons matures on note que les scutellums de tous les génotypes de blé dur se gonflent en même temps (48 heures en moyenne) (Fig : III-1).

Les résultats obtenus indiquent que la réaction du scutellum varie en fonction du génotype et de l'âge de l'embryon. Les embryons immatures exigent nettement plus de temps (140.04 heures en moyenne) en comparaison avec les embryons les plus âgés où la réaction des scutellums paraît plus précoce (53.28 heures en moyenne).

Cette différence dans les réactions des scutellums, peut être attribuée d'une part à l'état physiologique des embryons en particulier les taux de réserves qui sont plus concentrés chez les embryons matures, se traduisant ainsi par la précocité du gonflement (Kammoun et Daaloul., 1990). Et d'autre part, à la présence d'auxine et d'AgNO₃ dans le milieu de culture MS (Fig : III-1) (et qui seront discuté par la suite).

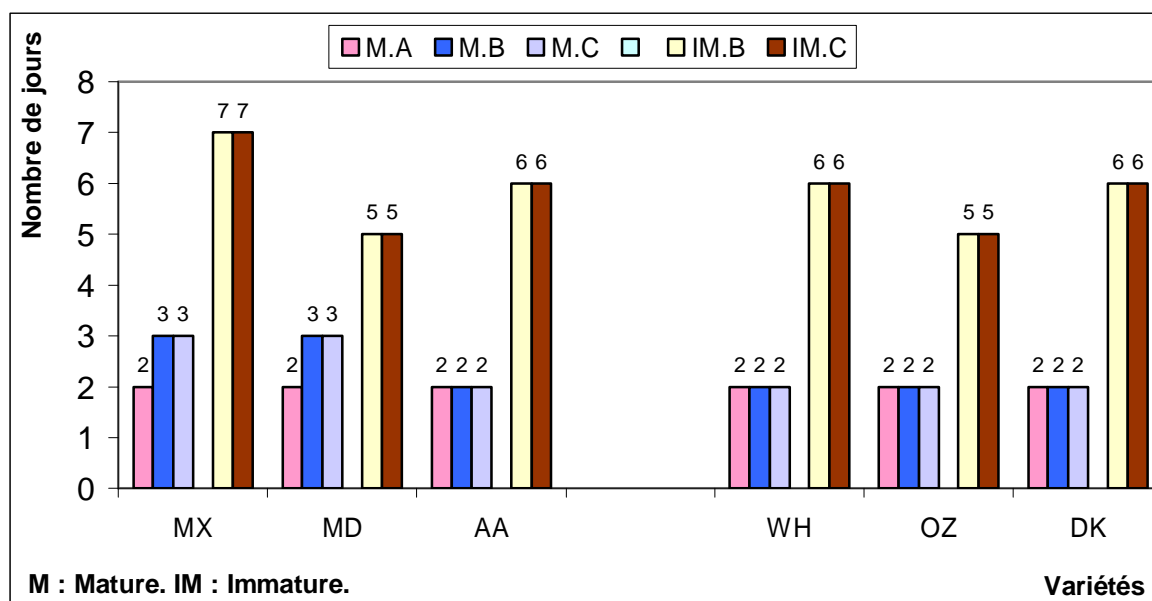


Figure III-1 : Durée moyenne entre l'inoculation et le gonflement du scutellum issus des embryons matures et immatures.

3- Durée nécessaire entre l'inoculation et l'induction de cals :

La rapidité du gonflement du scutellum des embryons matures chez les génotypes de blé dur, est suivie par une induction rapide de la callogenèse pour les deux types d'embryons (Fig : III-2). En effet, l'initiation des cals a eu lieu sur la quasi-totalité des embryons matures de blé dur au bout de 101 heures en moyenne, mais elle se généralise au bout 162 heures en moyenne sur les génotypes de blé tendre. D'autre part, l'induction de cals chez les embryons immatures n'est perceptible qu'au bout de 231 heures en moyenne chez les génotypes de blé tendre et de 199 heures pour les génotypes de blé dur.

Nos résultats arborent encore une fois que les embryons matures présentent des réactions plus précoces pour l'induction de la callogenèse (132 heures en moyenne) par rapport aux embryons immatures (216 heures en moyenne). Il en est de même pour ce qui est des deux espèces de blé et où les génotypes de blé dur induisent le cal en premier (140 heures en moyenne) par rapport aux génotypes de blé tendre (190 heures en moyenne). Ces comportements paraissent alors liés au génotype ainsi qu'à l'âge de l'embryon où l'état de différenciation cellulaire paraît plus actif chez les embryons matures de blé dur, favorisant ainsi la prolifération précoce des cals à la surface de leurs scutellum (kammoun et Daaloul., 1990).

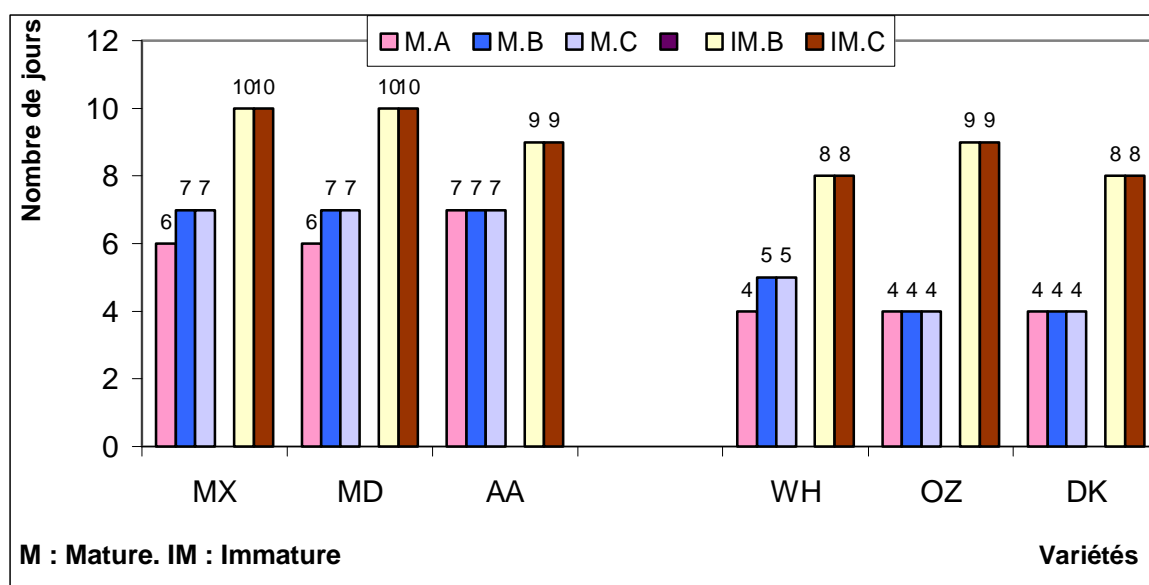


Figure III-2 : Durée moyenne entre l'inoculation et l'induction de cal issus des embryons matures et immatures.

4- Pourcentage de callogenèse :

Le pourcentage d'induction est réalisé depuis la mise en culture jusqu'à la fin de la phase d'induction. Cette période correspond selon Dale et Deambrogio (1979) à 30 jours après l'inoculation (Annexe 2). De même, il a été suggéré par Halperin (1967) que c'est pendant la première phase de l'initiation des cultures que certaines cellules pouvaient acquérir la capacité d'exprimer leur totipotence.

A la fin de la phase d'induction, on constate que les variétés issues des embryons matures, détiennent le pourcentage le plus élevé, s'évaluant à l'ordre de 98.33%. Les deux espèces appartenant à cette catégorie d'embryon présentent des taux pratiquement similaires avec une légère avance pour les génotypes de blé dur et qui est de l'ordre de 1.11% (Fig : III-3).

Le pourcentage de callogenèse est moins élevé chez les embryons immatures (Fig : III-4), ceci étant, pour les deux espèces de blé, il s'évalue à l'ordre de 80%. Toutefois, la comparaison entre les deux espèces révèle une légère avance pour les génotypes de blé dur et qui se rapporte à l'ordre de 10%.

Seulement 1.67% des embryons matures sont restés à l'état embryonnaire, et n'ont pas développés de cals, ceci est principalement dû à l'indifférenciation cellulaire et à l'incapacité des cellules à exprimer leur totipotence (Kammoun et Daaloul., 1990).

En revanche, 20% des embryons immatures n'ont pas réussi à former de cals ni à réagir avec le milieu de culture ; facteur qui a probablement contribué à l'abaissement du taux de callogenèse chez cette catégorie d'embryons (Fig : III-5). La réaction de ces embryons peut être attribuée au fait que les embryons n'ayant pas atteint leurs maturités ont de petits scutellums faiblement différenciés et ne peuvent donc pas induire de cal (Kott., 1985).

On a obtenu des cals sur les 3 milieux avec des proportions presque égales (Fig : III-3). Chez les génotypes de blé tendre, tous les embryons de la variété Mahon Demias ont induit des cals. Chez les variétés de blé dur, seule la variété Waha n'a pas atteint le 100%.

Depuis les figures : III-3 et III-4 ; on constate que l'âge de l'embryon a un rôle très important dans la formation de cals par rapport au génotype ainsi qu'à la concentration du 2.4-D employée, étant donné que le taux enregistré chez un même génotype, donne des réponses variables en fonction de l'âge de l'embryon. Ces différences dans la réaction des embryons rejoignent l'hypothèse émise par Green et Philips (1975) travaillant sur le maïs et qui stipule que les embryons récoltés à différents âges donnent des réponses variables.

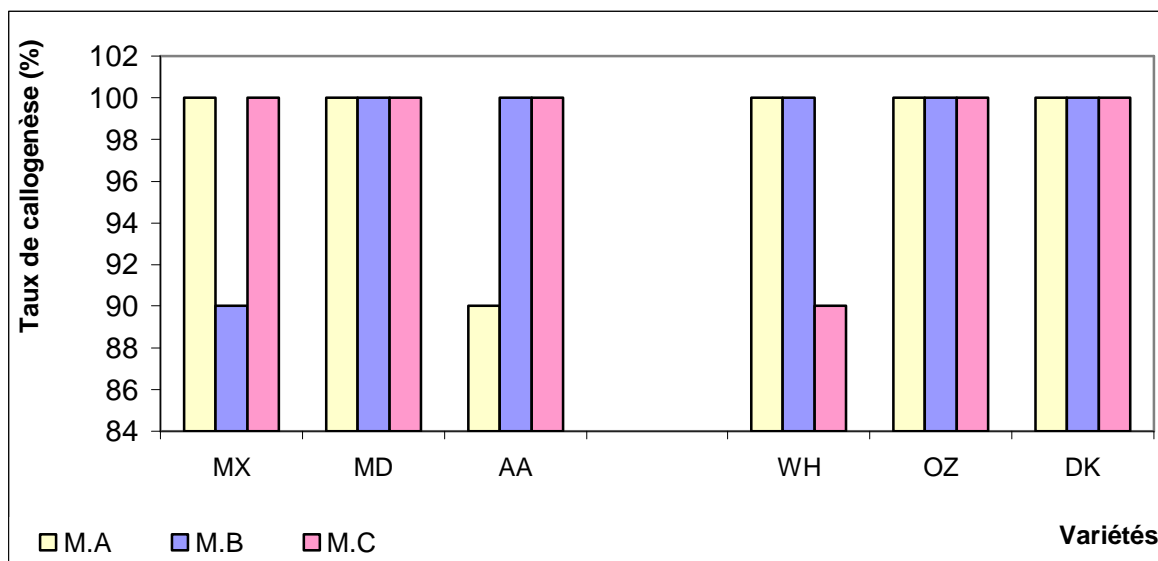


Figure III-3 : Pourcentage d'induction de cals des 6 variétés de blé dérivées d'embryons matures.

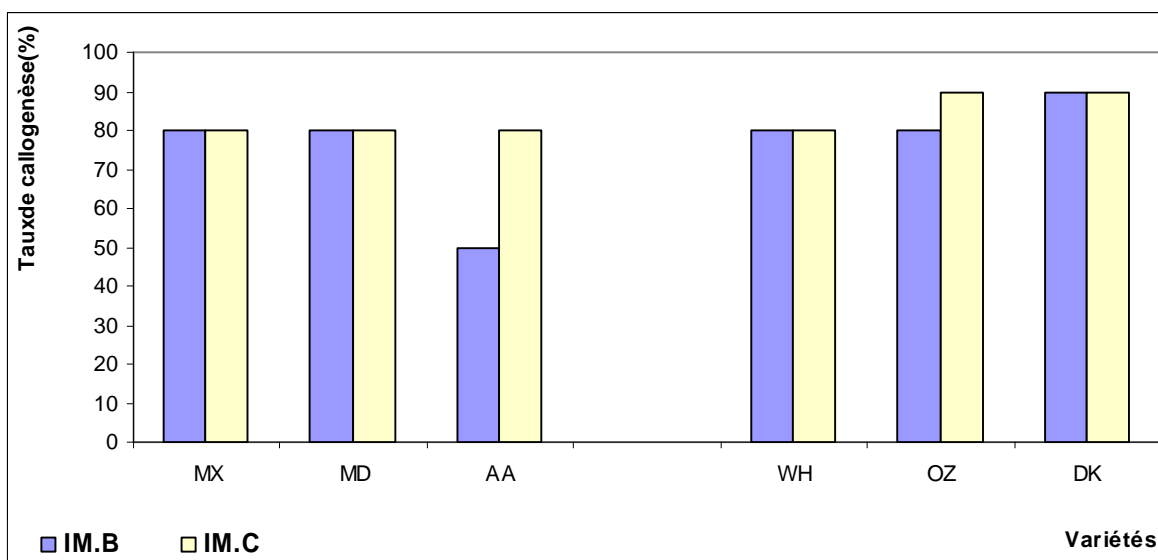


Figure III-4 : Pourcentage d'induction de cals des 6 variétés de blé dérivées d'embryons immatures.

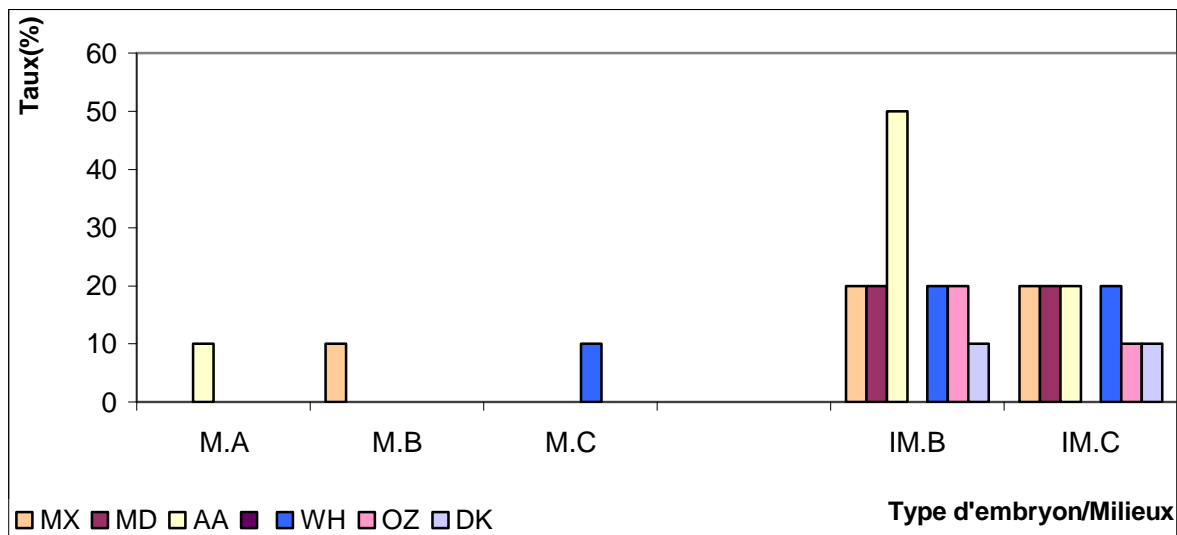


Figure III-5 : Nombre d'embryons n'ayant pas induit de cals chez les embryons matures et immatures

5- Effet des différentes concentrations hormonales sur les embryons matures et immatures:

La technique de Dale et Deambrogio (1979) nous a facilité l'estimation de la surface des cals (Annexe 2) sans avoir recours à des mesures sous des conditions stériles qui par la suite engendrent des contaminations.

L'analyse de variance pour ce paramètre indique un effet très hautement significative pour les embryons matures (Annexe 5) et immatures (Annexe 7).

La comparaison des moyennes au test Fisher au seuil de 5% et la séparation des groupes homogènes suivant le test de NEWMAN-KEULS au seuil de 5%, nous permet de déceler ces différences et de déterminer par la suite la concentration ou la combinaison la plus favorable pour la prolifération des cals.

5-1- Effet du 2.4-D à 10mg/l sur les embryons matures :

5-1-1- Réaction des embryons:

L'action favorable de cette concentration auxinique se traduit dès la mise en culture et concerne la totalité des génotypes. En effet, les embryons cultivés sur ce milieu réagissent les premiers pour le gonflement du scutellum et qui a lieu en 48 heures seulement en moyenne chez les génotypes de blé dur et tendre (Fig : III-1).

Pour l'induction de cals, on note également que tous les embryons cultivés sur ce milieu induisent le cal en premier, mais le temps d'induction paraît plus court chez les génotypes de blé dur (96 heures en moyenne) que chez les génotypes de blé tendre (152 heures en moyenne) (Fig : III-2).

5-1-2- Surface des cals:

Durant les deux premières semaines de culture, la surface des cals cultivés sur le 2.4-D à 10 mg/l, a surpassé considérablement les surfaces enregistrées sur les deux autres milieux MS additionnés à 2 mg/l de 2.4-D en présence et en absence de l'AgNO₃. A ce stade de culture, la forte concentration de 2.4-D paraît avoir une action puissante sur la callogenèse (Fig : III-6). En effet, la surface moyenne est de l'ordre de 51.67 mm² et où les génotypes de blé dur enregistrent la surface moyenne la plus élevée (65.67 mm²) en comparaison avec celle des génotypes de blé tendre et qui est de l'ordre de 37.67 mm².

En revanche, le suivi du développement des cals révèle que l'action favorable de cette auxine n'est pas suivie de prolifération cellulaire intense. En effet, la comparaison établie entre les différentes moyennes enregistrées chez les deux autres milieux MS, additionnés à 2 mg/l de 2.4-D en présence et en absence de l'AgNO₃, révèle à la fin de la phase d'induction une diminution de la viabilité des cals, voir même un arrêt de croissance (Fig : III-6). Les cals présentent une surface moyenne de 43.67 mm² chez les génotypes de blé tendre et de 68.67 mm² chez les génotypes de blé dur.

Du point de vu morphologique, la forte concentration d'auxine provoque une transformation importante, se traduisant par une coloration brunâtre. De plus, lors du repiquage, on constate que les cals acquièrent une texture très dure et ceci malgré le respect de la fréquence des transferts.

Cette transformation peut être expliqué par le fait que la forte concentration du 2.4-D provoque l'effet Feed-back. L'auxine devient toxique avec le temps, ainsi les tissus des régions internes s'asphyxient progressivement car la périphérie devient imperméable, par la suite les constituants du milieu de culture ne parviennent plus aux régions capables de proliférer et finissent par mourir (Morel., 1956).

L'arrêt de la prolifération cellulaire s'est confirmé par la suite sur le milieu dépourvu de PEG, de plus, ces cals n'ont présenté aucun signe d'organogenèse sur le milieu de régénération.

Généralement les auxines sont susceptibles d'augmenter la survie et la croissance des embryons en culture (Veen., 1963 ; Raghavant et Torrey., 1964) mais dans notre cas il parait évidant qu'une concentration trop élevée de cette auxine constitue un facteur limitant de la croissance des cals.

On se basant sur ces résultats on a préféré éviter d'utiliser le 2.4-D à 10 mg/l pour la culture d'embryons immatures. La comparaison entre les deux types d'embryons n'a alors portée que sur le 2.4-D à 2mg/l en présence et en absence de l'AgNO₃.

Afin de maintenir l'action favorable de départ, Il serait peut être préférable de réduire progressivement la concentration du 2.4-D au cours des repiquages ou bien d'utiliser une concentration moins élevée dès la mise en culture.

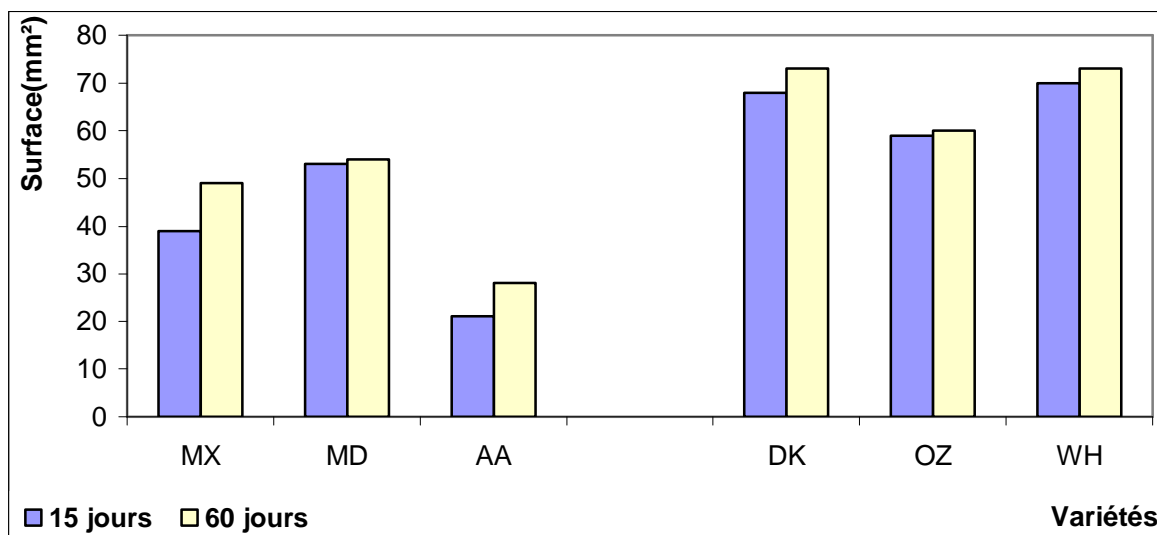


Figure : III-6 : Surfaces moyennes des cals issus d'embryons matures et cultivés sur le milieu MS+10mg/l de 2.4-D après 15 et 60 jours de culture.

5-2- Effet du 2.4-D à 2 mg/l en présence et en absence de l'AgNO₃ sur la réaction des embryons :

5-2-1- Matures:

Les embryons cultivés sur ces deux milieux présentent des réactions similaires. En effet, la réaction des scutellums des embryons matures cultivés sur le 2.4-D à 2mg/l additionné ou non à l'AgNO₃, a lieu au bout de 48 heures en moyenne pour les variétés de blé dur et de 64 heures en moyenne pour les variétés de blé tendre (Fig : III-1).

On note que la différence dans la réaction des scutellums ne concerne que les génotypes de blé tendre issus des embryons matures, vu que les génotypes de blé dur issus du même type d'embryon et cultivés sur les trois milieux (MS+ 10mg/l de 2.4-D ; MS+2mg/l de 2.4-D ; MS+2mg/l de 2.4-D+1mg/l d'AgNO₃) réagissent tous au bout de 48 heures pour le gonflement du scutellum (Fig : III-1).

Des réactions analogues entre les deux milieux MS additionnés à 2 mg/l de 2.4-D en présence et en absence de l'AgNO₃ ont été également relevées concernant l'induction de cals (Fig : III-2). Toutefois, le temps d'induction varie suivant l'espèces de blé et qui paraît plus long chez les variétés de blé tendre (168 heures en moyenne) que chez les variétés de blé dur (104 heures en moyenne).

5-2-2- Immatures:

Chez ce type d'embryons, les réactions du scutellum (Fig : III-1) ainsi que l'induction de cals (Fig : III-2) sont plus tardives comparativement aux embryons matures. Ces réactions le sont encore plus lorsqu'il s'agit de génotypes de blé tendre. En effet, le gonflement du scutellum chez ces derniers se fait en 144 heures en moyenne, alors que chez les génotypes de blé dur il paraît moins élevé (134 heures en moyenne). Même constatation relevée pour ce qui est de l'induction de cals (Fig : III-2) et où les génotypes de blé dur induisent les cals en premier. L'induction se fait en 199 heures en moyenne chez les variétés de blé dur, alors que chez les génotypes de blé tendre elle met un peu plus de temps (232 heures en moyenne).

A ce stade de culture, on constate, alors que l'utilisation du 2.4-D à 2mg/l seul ou combiné à l'AgNO₃ induit les mêmes réactions pour le gonflement du scutellum ainsi que pour l'induction de cals, au niveau des embryons matures et immatures mais de façon plus tardive pour ces derniers.

D'autre part, les variétés de blé dur issues d'embryons matures ou immatures, présentent les réactions les plus précoces par rapport aux variétés de blé tendre, tant pour le gonflement du scutellum que pour l'induction de cals.

5-3- Effet du 2.4-D à 2 mg/l sur la surface des cals :

5-3-1- Dérivés des embryons matures :

Après les deux premières semaines de culture, les embryons matures cultivés sur ce milieu enregistrent une surface moyenne de l'ordre de 37.59 mm², à ce niveau de culture, se sont encore les génotypes de blé tendre qui présentent la surface moyenne la moins élevée (18.05 mm²) par rapport aux génotypes de blé dur (55 mm²) (Fig : III-8)

Cependant, au bout de 60 jours de culture, tous les cals ont considérablement proliférés, la surface moyenne enregistrée est l'ordre de 121.12 mm² pour tous les embryons matures et où les génotypes de blé dur (135.62 mm²) présentent la surface moyenne la plus élevée par rapport aux génotypes de blé tendre (106.6mm²) (Fig : III-10).

5-3-2-Dérivés des embryons immatures :

Après deux semaines de culture, les embryons cultivés sur ce milieu produisent de petits cals de l'ordre de 16.75 mm². Chez ce type d'embryon les génotypes de blé dur présentent pareillement la surface moyenne la plus élevée (22.88 mm²), comparativement au génotype de blé tendre (11.29 mm²) (Fig : III-9)

Au bout de 60 jours de culture, la surface moyenne enregistrée sur ce milieu s'élève à 64.51 mm², cette augmentation concerne la totalité des génotypes, où les variétés de blé dur prolifèrent le mieux (83.97 mm²) comparativement aux génotypes de blé tendre (45.03 mm²) (Fig : III-11).

5-4-Effet du 2.4-D à 2 mg/l + 1 mg/l d'AgNO₃ sur la surface des cals :

5-4-1-Embryons matures:

La surface moyenne relevée après les 15 premiers jours de culture sur ce milieu est de l'ordre de 46.82 mm², elle paraît plus élevée par rapport à ce qui a été enregistré avec le 2.4-D à 2mg/l sans l'AgNO₃ (Fig : III-8)

On note avec ce milieu également que la surface moyenne des variétés de blé tendre est deux fois moins élevée (30.04mm²) que chez les variétés de blé dur (63.61 mm²).

La prolifération cellulaire se poursuit jusqu'à la fin de la phase d'induction, où la surface moyenne passe à 151.02 mm², et concerne tous les génotypes y compris la variété Aïn Abid qui a souvent présenté de faibles potentialités callogène. On enregistre

une surface moyenne de 181 mm² chez les génotypes de blé dur et de 121.11 mm² chez les génotypes de blé tendre (Fig : III-10).

5-4-2- Embryons immatures:

Après les deux premières semaines de culture, on note que la surface moyenne obtenue chez cette catégorie d'embryon est de l'ordre de 19.71 mm², elle paraît plus élevée que celle relevée sur le même type d'embryon cultivés sur le 2.4- D à 2 mg/l sans l'AgNO₃ (1mg/l), mais qui paraît en revanche moins élevée comparativement aux embryons matures cultivés sur le même milieu (2.4-D à 2 mg/l + 1 mg/l d'AgNO₃) (Fig : III-9).

Là aussi, les variétés de blé tendre détiennent la surface moyenne la moins élevée (13.77 mm²) par rapport à celle du blé dur (26.14 mm²).

De mêmes que les embryons matures ; on constate à la fin de cette phase callogène que la présence de l'AgNO₃ dans le milieu de culture favorise la prolifération cellulaire de tous les génotypes des embryons immatures, mais qui reste la plus élevée chez les variétés de blé dur (97.79 mm²) par rapport au génotypes de blé tendre (53.72 mm²) (Fig : III-11).

La séparation des groupes homogène au test de NEWMAN-KEULS au seuil de 5%, pour le facteur auxine, indique la présence de deux groupes distincts : le premier concerne les embryons matures et immatures cultivés sur le milieu MS additionné à 2mg/l de 2.4-D +1mg/l d'AgNO₃ et qui présentent une surface moyenne de 112.64 mm² et le second concerne les deux types d'embryons cultivés sur le milieu MS additionné à 2mg/l 2.4-D et dont la surface moyenne est de l'ordre de 92.82 mm².

On constate alors que la présence du 2.4-D à 2 mg/l paraît capital pour l'induction efficace de cals mais que l'adjonction de 1 mg/l d'AgNO₃ au 2.4-D à 2 mg/l favorise particulièrement la croissance des cals. De nombreuses observations viennent appuyer nos résultats concernant la présence de l'AgNO₃ dans le milieu de culture (Bered et *al.*, 1997 ; Inagaki and Tahir., 1990).

Bien que l'action callogène est prépondérante, elle s'accompagne dans la plupart des cas d'une action caulogène. En effet, sur certains cals, deux activités, callogenèse et caulogénèse, de l'auxine 2.4-D à 2 mg/l additionné ou non à l'AgNO₃ sont provoquées et se manifestent séparément. D'autres fois encore l'action auxinique est répartie de façon si étroite qu'une même concentration de 2.4-D (2mg/l) additionné ou non à l'AgNO₃ provoque les deux phénomènes à la fois pour un même génotype (Fig : III-7).



Figure : III-7 : Cals issus de la variété Djenah Khetifa présentant les deux phénomènes : caulogénèse et callogenèse.

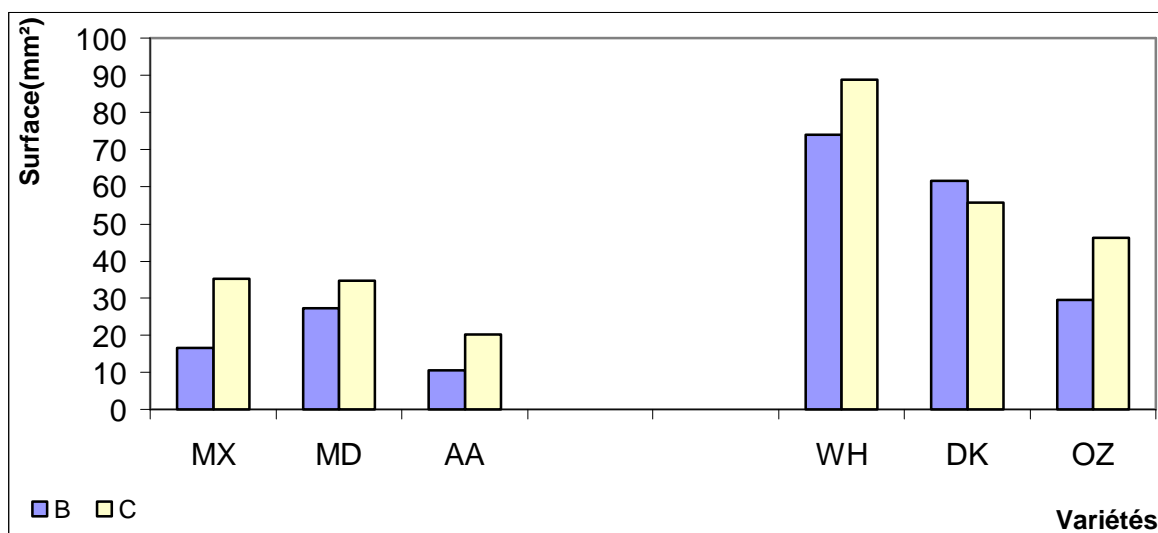


Figure : III-8 : Surfaces moyennes des cals issus d'embryons matures et cultivés sur le milieu : MS + 2 mg/l de 2.4-D et le milieu : MS+ 2 mg/l de 2.4-D+ 1 mg/l d'AgNO₃ après 15 jours de culture.

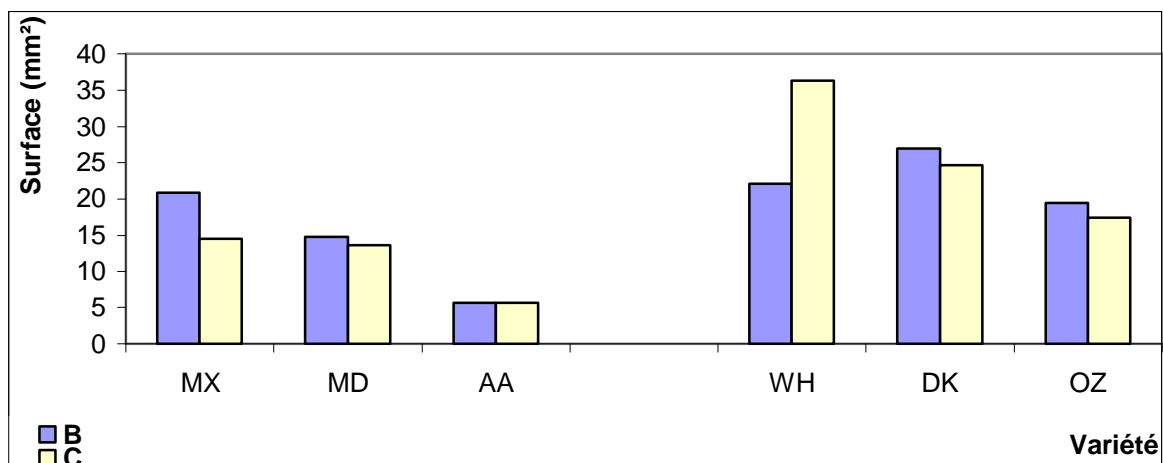


Figure : III-9 : Surfaces moyennes des cals issus d'embryons immatures et cultivés sur les milieu : MS + 2 mg/l de 2.4-D et le milieu : MS+ 2 mg/l de 2.4-D+ 1 mg/l d'AgNO₃ après 15 jours de culture.



Figure : III-10 : Surfaces moyenne des cals issus d'embryons matures et cultivés sur le milieu : MS + 2 mg/l de 2.4-D et le milieu : MS+ 2 mg/l de 2.4-D+ 1 mg/l d'AgNO₃ après 60 jours de culture.

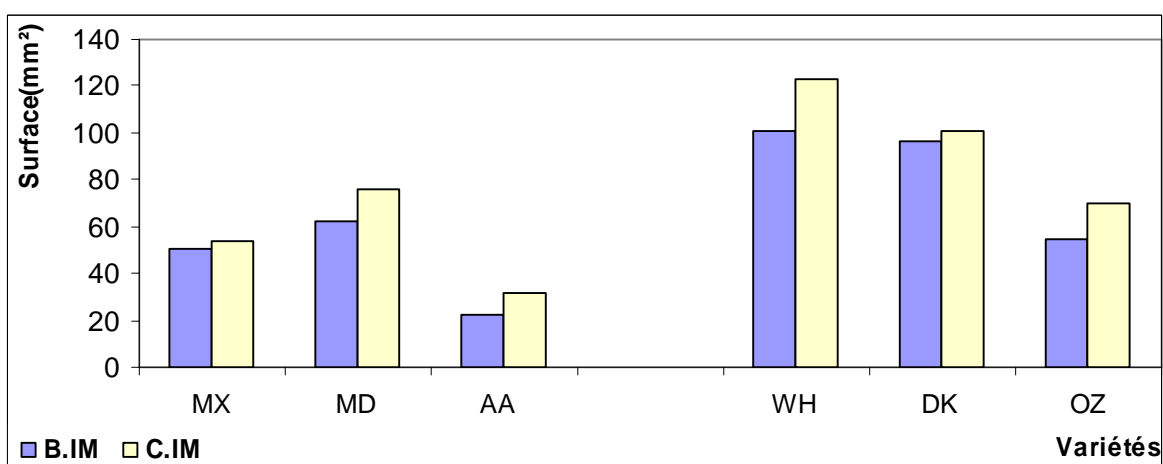


Figure : III-11 : Surface moyenne des cals issus d'embryons immatures et cultivés sur le milieu : MS + 2 mg/l de 2.4-D et le milieu : MS+ 2 mg/l de 2.4-D+ 1 mg/l d'AgNO₃ après 60 jours de culture.

6-Effet de l'âge de l'embryon sur la surface des cals :

L'analyse de variance pour ce paramètre indique un effet très hautement significatif depuis les mesures effectuées après les 15 premiers jours de culture (Annexe 8) jusqu'à la fin de la phase callogène (Annexe 9). L'âge de l'embryon influence sur la surface des cals.

La séparation des groupes homogènes au test de NEWMAN-KEULS au seuil de 5% indique la présence de deux groupes distincts : Le premier regroupe les embryons matures présentant une surface moyenne de 136.08mm² et le second concerne les embryons immatures et qui enregistrent une surface moyenne de 69.39 mm² (Fig : III-12).

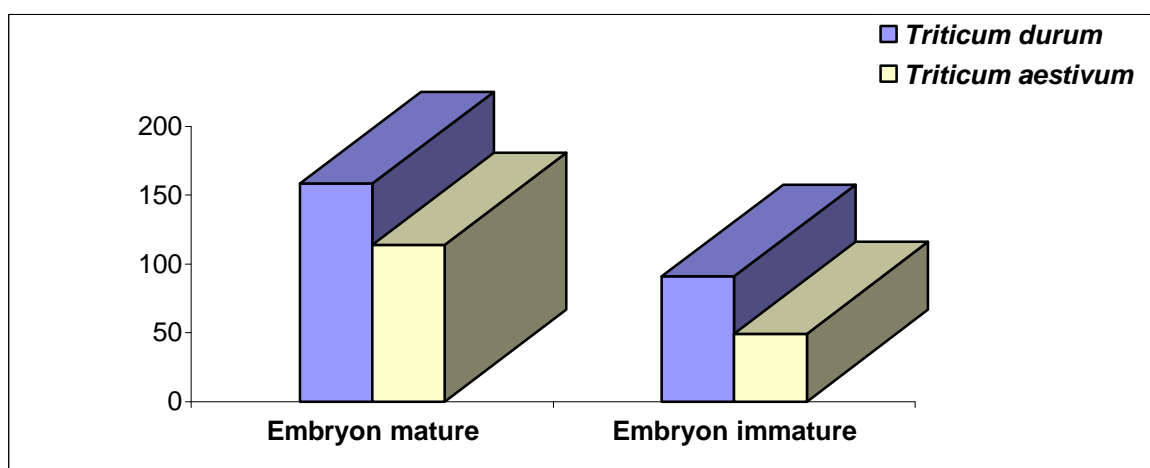


Figure : III-12 : Surface moyenne de la totalité des cals dérivés d'embryons matures et immatures.

7- Effet variétal sur la surface des cals :

L'analyse de la variance indique un effet très hautement significatif chez les embryons matures (Annexe 4 et 5) ainsi que chez les embryons immatures (Annexe 6 et 7).

La séparation des groupes homogènes au test de NEWMAN-KEULS au seuil de 5% nous permet de distinguer quatre groupes, démontrant l'importance fondamentale du génotype et l'implication du facteur génétique dans le contrôle de la callogenèse (Annexe 13):

- Le premier regroupe deux génotypes de blé dur : Waha et Djenah Khetifa
- Le second concerne une variété de blé tendre seulement : Mahon Demias
- Le troisième regroupe les variétés Oued Zenati et Mexipak.
- Un dernier groupe concerne la variété Aïn Abid produisant la surface moyenne la moins élevée.

8- Interactions entre les différents facteurs sur la surface des cals :

L'interaction auxine X variété, chez les embryons matures est hautement significative, ceci indique que les surfaces enregistrées sur les génotypes de blé diffèrent en fonction des concentrations du 2.4-D de manière importante (Annexe 4 et 5). Cependant, chez les embryons immatures, cette interaction n'est pas significative puisque l'étude des moyennes au test Fisher au seuil de 5% montre que les surfaces moyennes enregistrées chez les 6 variétés, cultivées sur les 2.4-D à 2 mg/l additionné ou non à l'AgNO₃, ne sont pas très éloignées (Annexe 6 et 7).

D'autre part, l'interaction age de l'embryon X variétés est hautement significative. Ce qui indique que les surfaces enregistrées pour les six génotypes étudiés varie en fonction de l'age de l'embryon. La séparation des groupes homogènes au test de NEWMAN-KEULS au seuil de 5%, révèle la présence de cinq groupes (Annexe 14):

-Le premier (A) : regroupe les variétés ayant les moyennes les plus élevées, il s'agit des embryons matures de blé dur Waha et Djenah Khetifa

-Le second (B) : intéresse deux génotypes de blé tendre : Mexipak, Mahon Demias et un génotype de blé dur Oued Zenati, tous issus d'embryons matures.

-Un groupe intermédiaire (C) concerne les variétés Waha et Djenah Khetifa issues des embryons immatures.

-Le quatrième (D) : regroupe les variétés Mahon Demias, Oued Zenati, Mexipak des embryons immatures et la variété Aïn Abid des embryons matures.

-Le dernier groupe (E) : concerne que la variété Aïn Abid, n'ayant produit que de petits ou menus calcs.

L'interaction age de l'embryon X auxines, après 15 jours de culture n'est pas significative, ce qui confirme que les surfaces enregistrées, sur le 2.4-D à 2mg/l additionné ou non à l'AgNO₃ ne sont pas très différentes, pour les deux types d'embryons. En revanche, à la fin de la phase callogène l'interaction est significative, ce qui signifie que la différence est importante. La séparation des groupes homogènes révèle la présence de quatre groupes distincts (Annexe 15).

Les limites supérieures et inférieures les plus élevées correspondent aux calcs présentant les meilleures surfaces moyennes obtenues sur les milieux additionnés à 2 mg/l de 2.4-D en présence de l'AgNO₃ à 1 mg/l, suivie du 2.4-D à 2 mg/l, puis du milieu additionné à 10mg/l de 2.4-D. Néanmoins, les plus gros calcs ne correspondent pas toujours à cet ordre. En effet, on note à la fin de la phase d'induction que les surfaces des calcs ne sont pas adjacentes (Tab : III-2 et III-3).

Chez les embryons matures ; la variété Mexipak cultivée sur le milieu MS +10 mg/l de 2.4-D fournit deux calcs présentant des surfaces relativement élevées par rapport à leur moyenne, les surfaces s'élèvent respectivement à 100.48 mm² et 114.87 mm² (Tab : III- 2).

Sur le milieu MS+ 2 mg/l de 2.4-D on enregistre également une prolifération intense pour trois autres calcs issus des embryons matures des variétés Oued Zenati et Waha et Aïn Abid cette dernière ne fournit généralement que de petits calcs en palmes, pour les embryons matures (Fig : III-19) et immatures (Fig : III-18), dont la surface moyenne est de 58.4 mm² (Tab : III-2).

On note également pour les variétés Oued Zenati et Mahon Demias cultivées sur le milieu MS + 2 mg/l de 2.4-D + 1mg/l d'AgNO₃ des valeurs relativement élevées (Tab : III- 2), la variété Mahon Demias détient la surface la plus élevée par rapport à tous les

génotypes dérivés des embryons matures et immatures et par rapport aussi aux deux autres milieux MS + 10 mg/l de 2.4-D et MS + 2 mg/l de 2.4-D + 1mg/l d'AgNO₃.

Des perturbations similaires ont été relevées également au niveau des embryons immatures, où on note que les génotypes Mexipak, Mahon Demias, Aïn Abid et Djenah Khetifa cultivés sur le milieu MS+2 mg/l de 2.4-D produisent des cals ayant des surfaces considérablement supérieures à leur moyenne, ces valeurs ne correspondent pas forcément aux génotypes présentant les moyennes les plus élevées (Tab : III-3).

Les embryons immatures issus des variétés Aïn Abid et Oued Zenati et cultivés sur le milieu MS + 2 mg/l de 2.4-D+1mg/l d'AgNO₃, présentent des surfaces assez élevées en comparaison avec leurs surfaces moyennes (Tab : III- 3).

Depuis les résultats indiqués sur les tableaux : III-2 et III-3 on constate que les limites enregistrées au sein d'un même génotype sont très éloignées les unes des autres ; une même variété peut alors développer des cals minuscules et volumineux mais à des proportions variables. Le coefficient de variation élevé (Annexe 4 à 9) reflète l'hétérogénéité des résultats. Selon les travaux de Bouharmont (1991) effectués sur le riz ainsi que les travaux de Zheng et al (1989) selon lesquels la variation somaclonale se manifeste par des différences dans l'aspect et la croissance des cals issus d'un même type d'embryon.

Tableau III-2 : Etendues des cals issus d'embryons matures après 60 jours de culture.

Milieux	Variété	Limites inférieures (mm ²)	Limites Supérieures (mm ²)	Moyennes (mm ²)
10 mg/l de 2.4-D " A "	MX	25.12	114.87	49
	MD	39.25	56.52	54
	AA	23.55	31.4	28
	WH	76.93	76.93	73
	DK	47.1	76.93	73
	OZ	39.25	65.94	60
2 mg/l de 2.4-D " B "	MX	28.26	157	116.23
	MD	78.5	172.7	145.18
	AA	25.12	127.17	58.4
	WH	98.91	302.18	160.45
	DK	87.92	197.82	135.51
	OZ	62.8	207.24	110.91
2 mg/l de 2.4-D + 1 mg/l d'AgNO ₃ " C "	MX	47.1	172.7	136.22
	MD	86.35	471	163
	AA	31.4	87.92	64.1
	WH	100.48	282.6	204
	DK	84.78	266.9	197
	OZ	65.52	211.95	142

Tableau III-3: Etendues des cals issus d'embryons immatures après 60 jours de culture.

	Variétés	Limites Inférieures (mm ²)	Limites supérieures (mm ²)	Moyennes (mm ²)
2 mg/l de 2.4-D "B"	MX	25.12	207.24	50.24
	MD	47.1	145.50	62.42
	AA	3.14	100.48	22.45
	WH	62.8	141.34	100.48
	DK	62.8	211.95	96.72
	OZ	39.25	76.93	54.71
2 mg/l de 2.4-D + 1 mg/l d'AgNO ₃ "C"	MX	43.96	56.52	53.54
	MD	65.52	100.48	76.22
	AA	9.42	109.9	31.4
	WH	75.36	172.6	122.87
	DK	76.93	113.04	100.32
	OZ	54.52	207.24	70.17

9-Etude des corrélations :

L'étude des corrélations indique qu'après 60 jours de culture les trois milieux : MS + 10 mg/l de 2.4-D, MS + 2 mg/l de 2.4-D, MS + 2 mg/l de 2.4-D+1mg/l d'AgNO₃, sont hautement corrélés avec la surface des cals, tandis qu'en début de culture ils sont faiblement corrélé (Annexe : 10). Il en est de même chez les embryons immatures (Annexe : 11)

D'autre part, l'étude des corrélations indique que les variétés étudiés (Annexe : 10, 11) ainsi que l'âge de l'embryon (Annexe : 12) sont corrélés aux surfaces des cals enregistrées.

10- Taux de contamination :

La durée des cultures est longue (30 jours au maximum) et les milieux sont relativement riches et très favorables au développement des bactéries et des champignons dont la croissance bien plus rapide que celle du tissu végétal, abouti à l'envahissement de la culture, on a rencontré au cours de notre expérimentation deux types d'infections : accidentel et systématique cette dernière résulte de la présence de germes dans les tissus embryonnaires, phénomène régulièrement observé chez la variété Aïn Abid des embryons matures, présentant une forte proportion d'infection qui a nuit au début de la croissance.

Les infections sont soit bactériennes soit fongiques mais ces derniers prédominent surtout au début des cultures.

Au début de l'expérimentation, nous avons enregistré un taux moyen de 7.22% pour les embryons matures. Le plus souvent l'infection se traduit par un enduit blanc ou crémeux, recouvrant le milieu de culture ou le tour du cal.

Les microspores se développent parfois au sein du milieu nutritif lui-même, qui présente alors des voiles d'aspects laiteux, ce type d'infection été fréquent chez la variété Oued Zenati des embryons matures.

10-1- Après découpage des cals :

Les cals découpés et cultivés sur le milieu sélectif sont normalement stériles, mais en pratique, les parties internes des explants peuvent renfermer quelques microorganismes qui n'ayant pas atteint le milieu nutritif n'ont pu se multiplier.

Ainsi le découpage des cals a permis de libérer ces germes et par conséquent le taux de contamination a augmenté de 4.44% pour les embryons matures (Fig : III-13) et de 0.83 % pour les embryons immatures (Fig : III-14).

10-2-Après transfert en tube :

Pour les six transferts restant et à partir de cette étape, le pourcentage de contamination a considérablement baissé, il est en moyenne de 0.55% pour les embryons matures et de 0% pour les embryons immatures.

Cette diminution peut être attribuée en premier lieu au changement du récipient car il permet un contact plus directe avec le bec benzène lors des transferts contrairement au boites de Pétri.

La suppression de l'AIB peut être relié à cette diminution importante du taux de contamination ; substance fréquemment ajouté après l'autoclavage.

Le suivi de ces infections montre que les embryons matures enregistrent le plus de contamination (19.43%) en comparaison avec les embryons immatures (4.2%). Toutefois après trois mois de culture ce taux est pratiquement voir nul chez l'ensemble des géotypes.

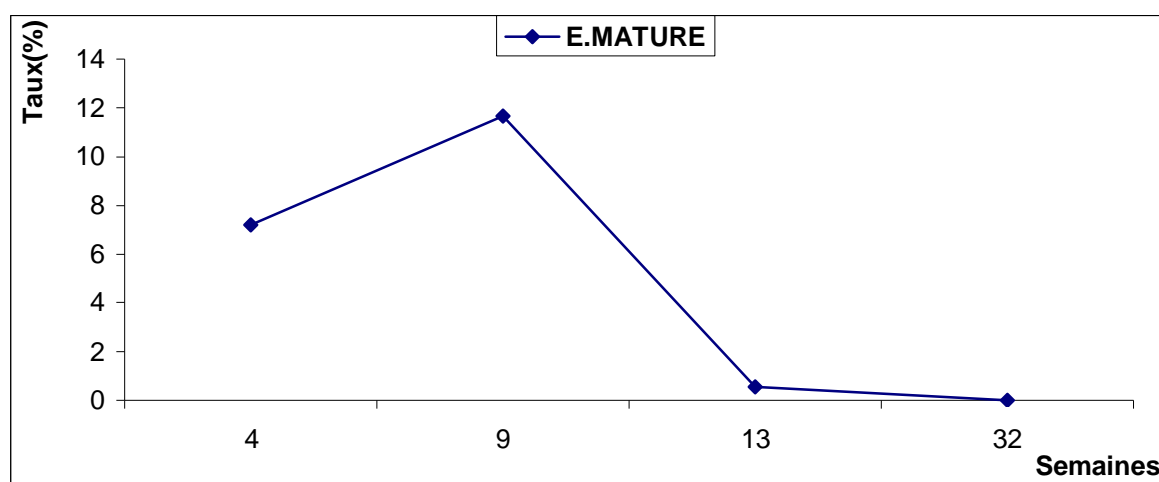


Figure : III-13 : Taux de contamination enregistré chez les 6 variétés de blé des embryons matures.

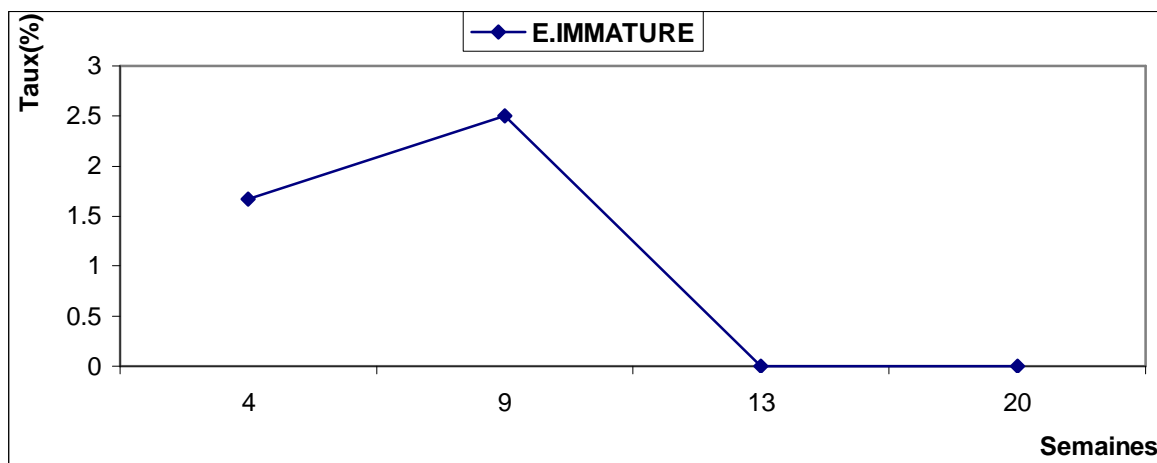


Figure : III-14 : Taux de contamination enregistré chez les 6 variétés de blé des embryons immatures.

11- Aspects morphologiques des cals :

La qualité des cals est estimée à partir de l'aspect extérieur du cal, la couleur et la texture. Toutes les observations ont été relevées sur le milieu MS sans hormones. De ce fait, quatre types de cals ont été distingués :

11-1- Cals cubique :

Pour ce type de cal on constate que le fragment s'est accru d'une manière uniforme pour donner une colonie plus ou moins cubique (Fig : III-17), on a souvent aperçus ces cals chez pratiquement toutes les variétés des embryons matures spécialement les génotypes Waha et Mexipak, mais en moindre quantité chez les mêmes génotypes des embryons immatures (Fig : III-16). Rencontré aussi chez très peu de cals de la variété Aïn Abid des embryons matures seulement (Fig : III-15). Le découpage de ces cals provoque parfois des brunissements superficiels cependant cette réaction n'est pas inquiétante, car elle ne gêne en rien la reprise des cultures, puisque on a constaté par la suite que n'importe quelle région du cal est capable de proliférer.

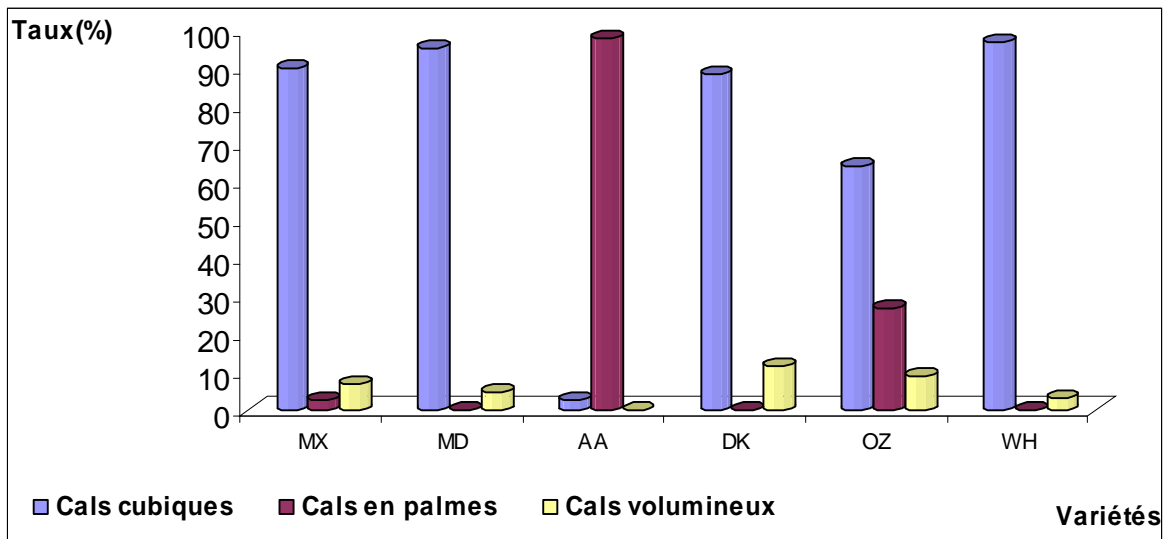


Figure : III-15 : Aspects morphologiques des cals dérivés d'embryons matures.

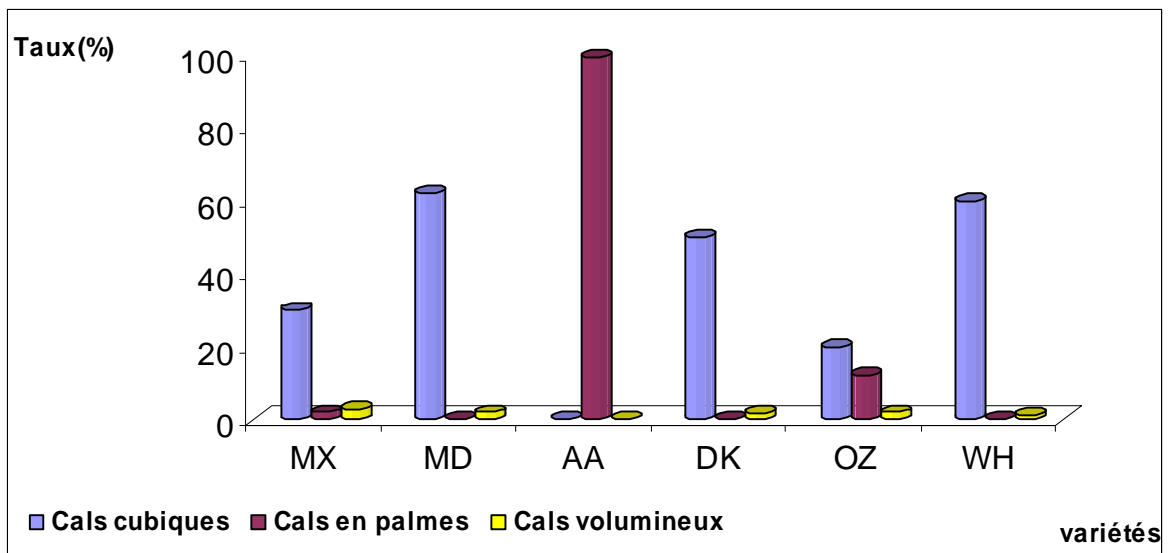


Figure : III-16 : Aspects morphologiques des cals dérivés d'embryons immatures.

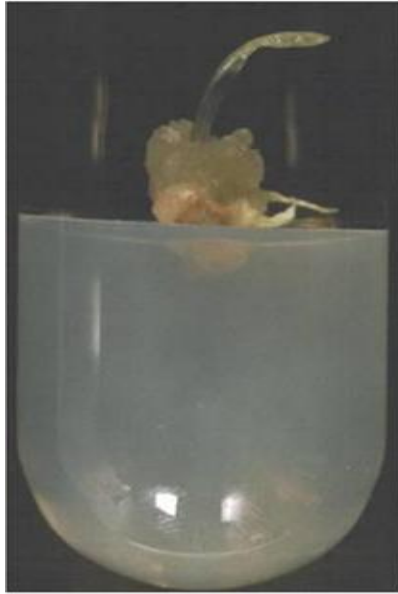


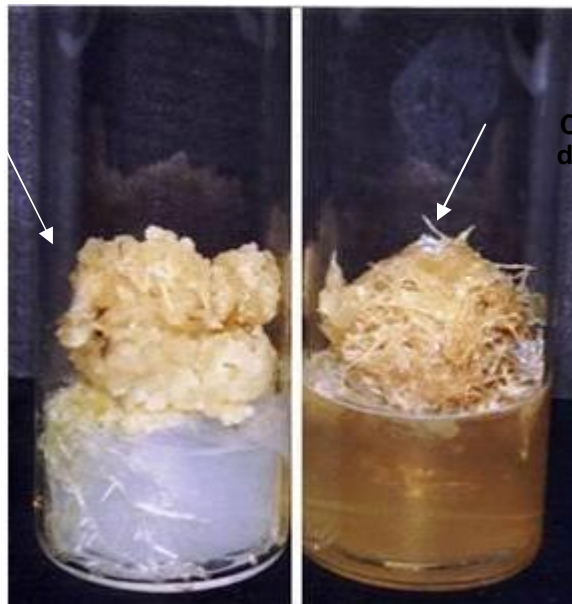
Figure : III-17 : Cal cubique issu d'embryon mature de la variété Waha.

11-2-Cals volumineux :

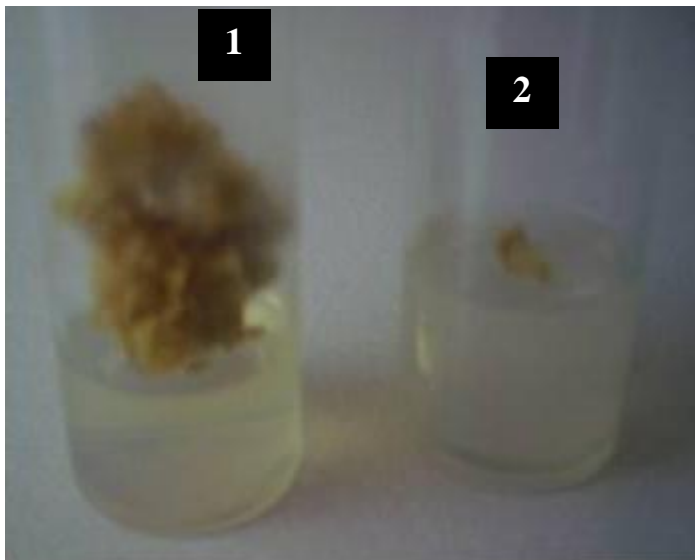
Ce type de cal produit une volumineuse protubérance parenchymateuse, ils ont une surface qui varie entre 200 et 471 mm², observée en plus grand nombre chez les embryons matures et sur pratiquement toutes les variétés des deux types d'embryons. Il occupe généralement les deux extrémités de l'embryon, mais l'un des deux est toujours plus volumineux que le second (Planche : III-1).

Les cals volumineux découpés en plusieurs petits fragments, résistent mal aux blessures. Il serait peut-être préférable d'opérer avec ménagement et se contenter de partager les gros cals (ayant une surface supérieure ou égale à 150 mm²) en deux fragments seulement ou de les repiquer en entier.

Cal volumineux issu d'embryon mature de la variété WH, après 2 mois de culture sur MS+2 mg/l de 2.4-D.



Cal volumineux issu d'embryon immature de la variété WH, après 2 mois de culture sur MS+2 mg/l de 2.4-D + AgNO₃



Comparaison entre un cal volumineux (1) et un cal minuscule (2)

Planche III-1: Cals volumineux dérivés d'embryons matures et immatures et présentant une extrémité plus volumineuse (représentée par les flèches) que l'autre.

11-3- Cal en palmes :

Ce type de cal est spécifique à la variété Aïn Abid des embryons immatures (99.5%) et matures (97.5%). Toutefois, on retrouve ces cals chez d'autres génotypes aussi dont : Oued Zenati et Mexipak des deux types d'embryons (Fig : III-15 et III-16). Les tissus situés contre le milieu s'accroissent moins que ceux de la région opposé pour que le cal s'incurve et donne une sorte de cloche dont la cavité est orienté vers le milieu de culture ou vers l'intérieur (Fig : III-18 et 19). Ce type de développement a été observé par Morel (1950).

Morphologiquement, la plupart des cals semblent être constitué par une mince couche de tissus, leur développement est relativement lent en comparaison avec les autres cals. Généralement, ces cals se multiplient lentement, mais il arrive qu'on relève des surfaces élevées (Tab : III-2) par rapport à la surface moyenne (62.23 mm² chez les embryons matures et 16.72 mm² chez les embryons immatures).

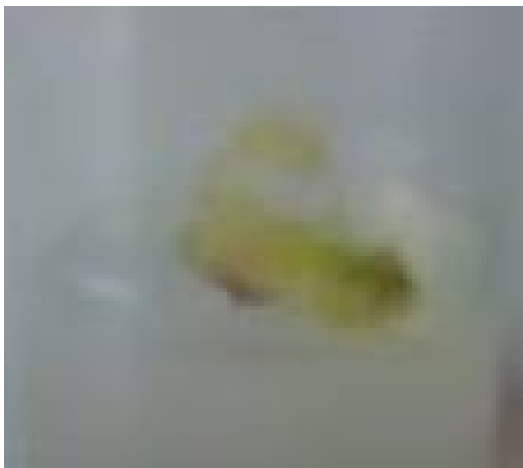


Figure : III-18 : Cal en palme issu d'embryon immature de la variété Aïn Abid.

Figure : III-19 : Cal en palme issu d'embryon mature de la variété Aïn Abid.



11-4- Cals embryogènes :

Nous avons observés ce type de développement sur le milieu MS témoin sans hormones et chez pratiquement toutes les variétés parvenues d'embryons matures (34.29%) et immatures (75%) des six variétés.

Lors des repiquages, on a noté que les colonies tissulaires sont dépourvues de cohésions, ils paraissent même être constituées par un agrégat de nodules à peu près sphériques de dimension irrégulière, ils sont fragiles et s'émiettent au moindre contact (Fig : III-20).

Chez les embryons immatures, les variétés Mexipak et Mahon Demias, fournissent le plus de cals embryogènes contrairement aux génotypes de blé dur (Fig : III-21). Les mêmes observations ont été relevées pour les embryons matures (Fig : III-22) où les génotypes de blé tendre produisent le plus de cals embryogènes à la différence du nombre de cals embryogènes qui est plus élevé pour les embryons immatures. Les cals provenant d'embryons immatures pourraient constituer le matériel privilégié pour l'établissement de suspension cellulaire embryogène.

Ces cals renferment des embryons somatiques. En effet, l'embryon peut se former au sein d'une masse qui peut être assimilée à un cal. Cependant, sur le plan histologique cette masse est formée presque entièrement de proembryons. Ce cas est considéré comme faisant partie de l'embryogenèse directe (Sharp et *al.*, 1980).

L'apparition de ces embryons somatiques n'est pas imprévisible car généralement leur développement début lorsque les cals sont transférés dans des milieux dépourvus d'hormones (Hanower J et Hanower P., 1984). Théoriquement ils peuvent être obtenus de toutes cellules végétatives et suivent les mêmes stades de développement (Chapitre I) que les embryons zygotiques comme cela a été illustré par Halperin (1966).



Figure : III-20 : Cals embryogène issu d'embryons matures de la variété Oued Zenati.

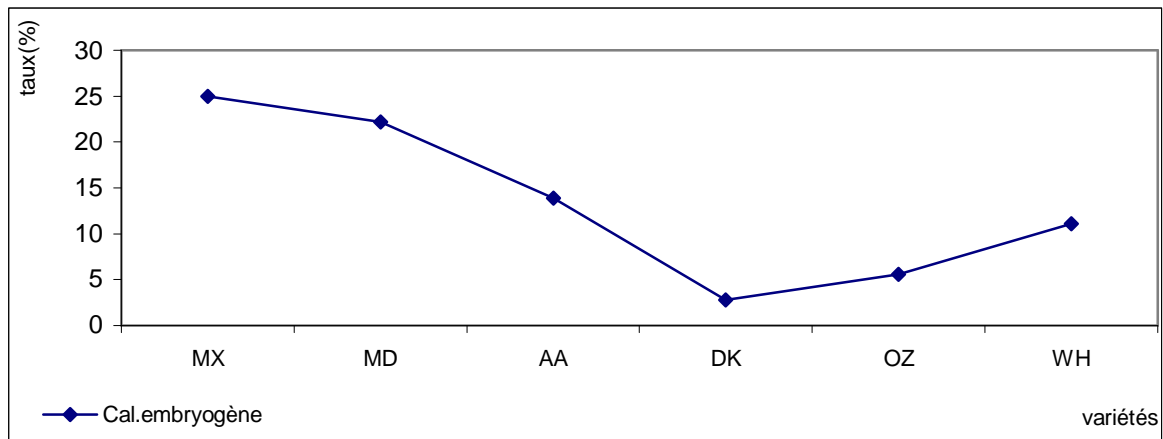


Figure : III-21 : Taux de cals embryogène enregistrés chez les embryons immatures après trois mois de culture.

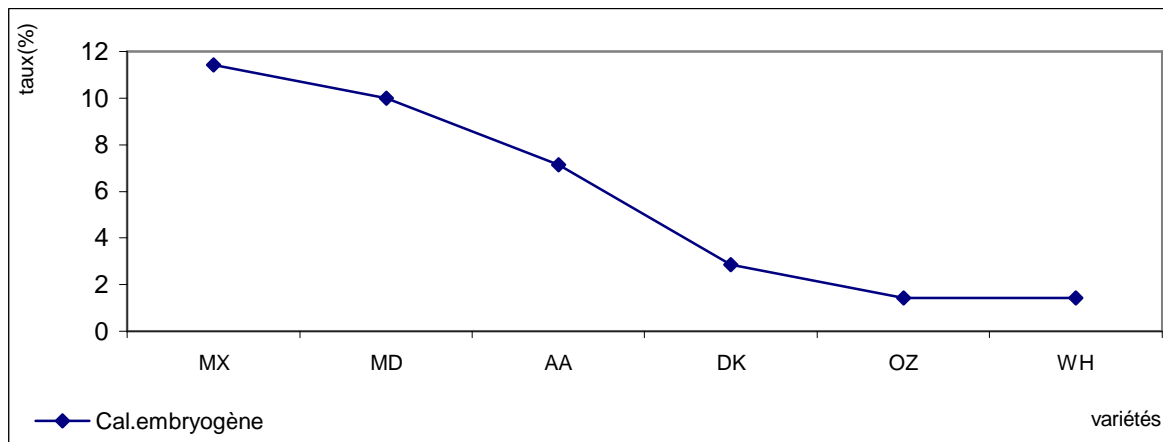


Figure : III-22 : Taux de cals embryogène enregistrés chez les embryons matures après trois mois de culture.

Tableau:III-4 : Aspect superficiel des cals issus d'embryons matures et immatures.

Embryon	Couleur	Texture
Matures	-Brune/Jaune (observé sur le milieu A) -Brune /Jaune -Blanche -Beige	-Dure, rigide -Très molle -Fragile -Fragile / Pâteuse
Immatures	-Beige transparent -Blanche.	-Translucide vitrifié -Friable / Fragile

Nous avons noté que les cals fragiles croissent plus hâtivement que les cals durs. En effet, de nombreux auteurs en l'occurrence Ducreux et Rossignol, (1986) estiment qu'un cal friable a une croissance rapide comparativement aux cals durs dont la croissance est plus lente. Les cals jaunâtres et bruns ainsi que les cals pâteux ou très durs ne deviennent jamais embryogènes, seule les cals fragiles et de couleurs blanchâtre ou beige le deviennent.

On note ainsi, que les cals issus d'un même génotype et d'un même type d'embryon, diffèrent en plus de leurs morphologies et leur croissance, par leur coloration et leur texture.

12- Effet du poly éthylène glycol sur la croissance des cals:

Dans notre travail la sélection *in vitro* pour la tolérance au stress hydrique est basée sur l'étude de la réactivité *in vitro* au poly éthylène glycol sur le milieu de culture. La figure : III-23 illustre clairement le taux de perte suite à l'addition de 10mg/l de PEG dans le milieu de culture.

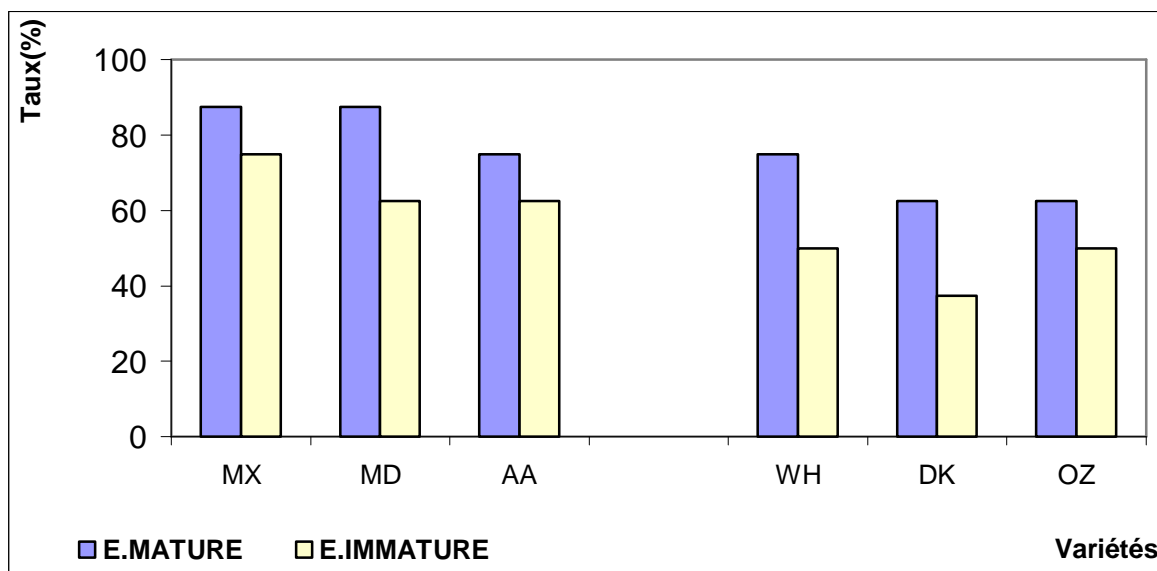


Figure : III-23 : Effet du PEG sur les cals issus des embryons matures et immatures après 30 jours de culture.

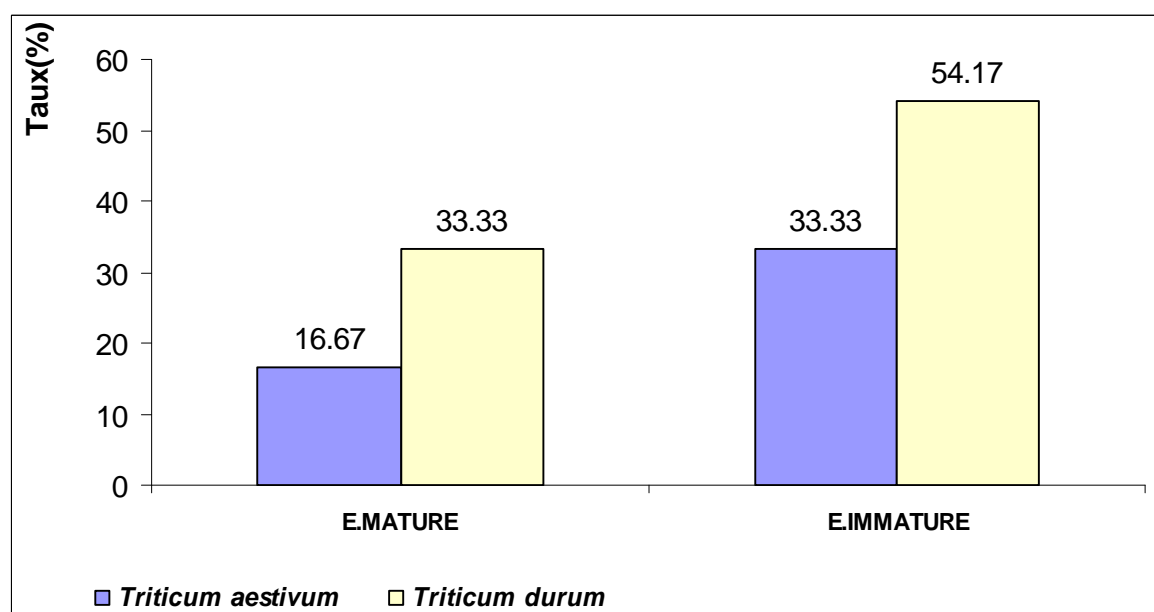


Figure : III-24 : Taux de cals indemnes issus des embryons matures et immatures après 30 jours de stress.

Le PEG induit au niveau des cals des réactions particulièrement marquées se traduisant par des jaunissements et des brunissements (Fig : III-25) fréquemment par des nécroses (Fig : III-28) on assiste généralement à des dégénérescences qui

débutent dans des régions bien localisées puis s'étendent lentement en atteignant la totalité du cal, la récupération chez ce type de cal reste souvent incomplète.

Ces transformations sont visibles dès la première semaine, mais au bout de la quatrième semaine il envahissent leurs surfaces présentant un taux moyen de 75% chez les embryons matures et de 56.25% chez les embryons immatures. Ces cals sont considérés comme sensibles, vu que leur croissance est fortement déprimée par la présence du PEG dans le milieu de culture.

Par ailleurs, les réactions des cals sont variables au sein d'une même variété issue d'un même type d'embryons, certains se distinguent par un niveau de tolérance plus important que d'autres.

Les embryons matures de blé tendre détiennent les taux les plus élevés de nécroses s'évaluant à 83.33% dont les variétés Mexipak et Mahon Demias qui paraissent les plus affectées par rapport à la variété Aïn Abid. En revanche, l'effet du PEG sur les génotypes de blé dur du même types d'embryon est moins important que ce qui a été relevé pour les génotypes de blé tendre, s'évaluant à un taux moyen de 66.66%. Les variétés Djenah Khetifa et Oued Zenati enregistrent le taux le moins élevé de nécroses, suivi de la variété Waha (Fig : III-23).

Les mêmes perturbations ont été relevées pour les embryons immatures, au niveau des six génotypes et où les génotypes de blé tendre détiennent les taux les plus élevés de nécroses (66.66%) par rapport aux génotypes de blé dur (45.83%). Toutefois, le taux de nécrose est moins accentué pour cette catégorie, on note un taux d'abaissement de l'ordre de 18.75%.

Ainsi, les variétés de blé dur issues d'embryons matures et immatures paraissent plus tolérantes au PEG que les variétés de blé tendre issues des deux types d'embryons (Fig : III-24).

Si l'on classe les différentes moyennes de cals indemnes enregistrées, on retrouvera trois groupes distincts:

- Le premier regroupe les embryons immatures de blé dur, et qui enregistre un taux moyen de l'ordre de 54.17%.
- Le second regroupe les embryons matures de blé dur et les embryons immatures de blé tendre enregistrant un taux moyen de l'ordre de 33.33%.
- Le dernier regroupe concerne les embryons matures de blé tendre et qui enregistre un taux moyen de l'ordre de 16.66%.

Les cals indemnes ont conservés leurs couleurs et textures initiales, certains d'entre eux ont légèrement jaunis mais ce jaunissement ne paraît avoir aucune influence sur leurs évolutions, ceci s'est confirmé par la suite sur le milieu de régénération. Les cals sélectionnés sont considérés comme tolérants au PEG et présentent les meilleures performances qui conduiraient à la formation de lignées cellulaires tolérantes au stress hydrique.

Le comportement des cals témoins (cultivés sur le milieu dépourvu de PEG) issus d'un même génotype est variable. En effet, certains manifestent un problème de brunissement, d'autres de jaunissement et ceci malgré le respect de la fréquence des repiquages sur le milieu frais, cependant, on n'a pas été confronté aux problèmes de nécroses des cals (problème majeur en culture *in vitro*, que Reynolds et Murashig (1979) atténuaient en utilisant du charbon active) mais ce brunissement a entraîné par la suite l'inhibition de la croissance de 5% des cals finissant par un dépérissement.



Figure : III-25 : Cals jaunâtre et brun cultivés sur le milieu MS additionné à 10mg/l de PEG.

13-Effet du milieu MS sans hormones sur la régénération :

La totalité des cals est transférée sur un milieu de base MS dépourvu de PEG et d'hormones pour la régénération (Bregitzer, 1992 ;Daaloul et *al.*, 1992) à la suite d'un séjour d'un mois sur le milieu stressé.

On assiste à une dégénérescence de l'ordre de 65.62% des cals issus d'embryons matures et immatures, leur dépérissement s'est confirmé après 19 jours environ de culture où on note la présence d'une couche transparente et gélatineuse entourant la surface des cals atteints.

L'utilisation du milieu MS sans hormones n'entraîne aucune formation racinaire, car les cals dérivés des deux types d'embryons ne se différencient pas ou faiblement sur ce milieu malgré la composition complexe du milieu de base MS en sels minéraux, ceci pourrait être attribuer à l'absence du rapports auxine / cytokinine dans le milieu de culture.

En revanche, le milieu MS sans hormones a permis la formation de cals embryogènes chez 34.29% des embryons matures et 75% chez les embryons immatures (Voir : Aspect morphologique des cals).

14- Effet de l'AIB et la KIN sur la régénération :

Après 28 jours en moyenne de culture on constate que l'utilisation de l'AIB à 1mg/l avec la KIN à 0.25 mg/l produit au niveau des cals issus d'embryons matures et immatures la formation de très fines racines mais sans pour autant favoriser leurs développements. Toutefois, cette association a permis le développement foliaires sur 62.13 % des cals cultivés (Tab : III-5). Les tiges sont très enroulées (Fig : III-26) et très fragiles, ce qui ne nous a pas permis pas de mesurer leur longueur (Après transplantation).

Tableau : III-5 : Taux de caulogénèse enregistré sur la totalité des cals.

Source des cals	Développement foliaire (%)	Nombre de cals
E.M sans PEG	26	12
E.IM sans PEG	58.13	25
E.M + PEG	75	9
E.IM + PEG	85.71	18

Aucun parallélisme n'a été distingué entre le développement de la partie aérienne et de la partie racinaire (Fig : III-26, 29) ; étape qui nous a paru comme un processus complexe, par rapport au développement foliaire, où les faibles potentialités rhizogène sont identiques chez l'ensemble des génotypes.

On a souvent noté la présence de zones méristématiques verdâtre sur certaines parties des cals embryogènes (Fig:III-28), celles-ci correspondent à la présence de structures embryonnaires (Bencheikh., 1992). Ces zones méristématiques sont

susceptibles d'évoluer par la suite en une plante entière. Généralement les cals produisant ces protubérances sont soit des cals cubique, ou volumineux mais friable, comme le démontre la figure : III-28 : même si le cal présente un aspect volumineux, si il est pâteux il ne peut être embryogène.

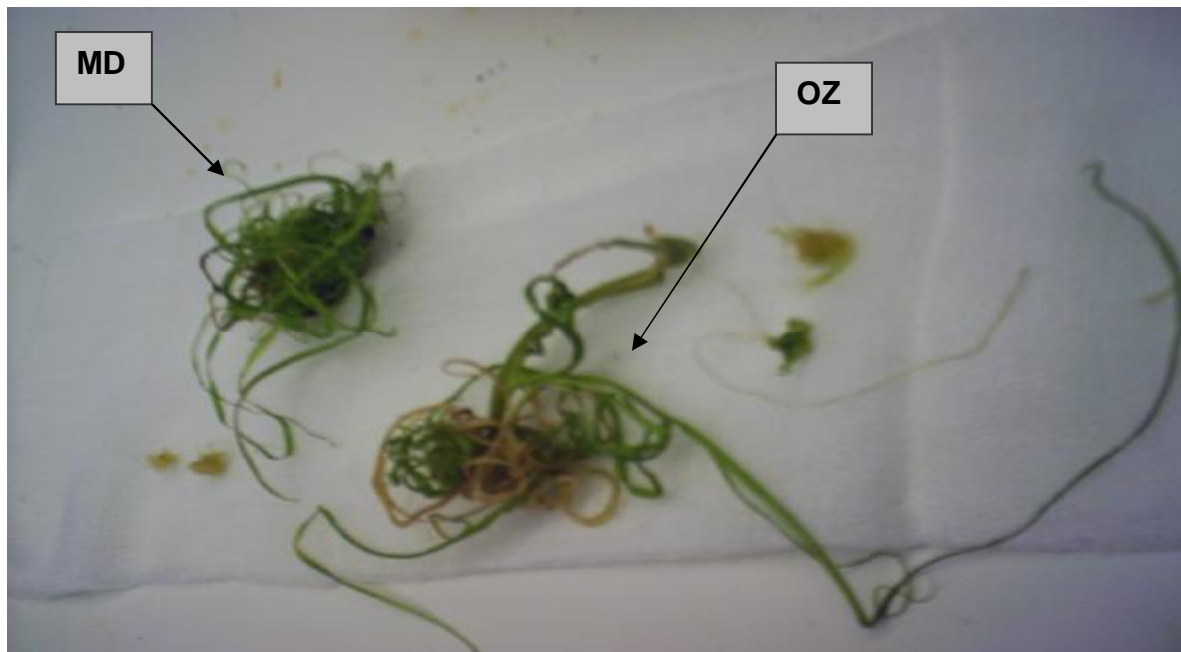


Figure : III-26 : Aspect morphologique des tiges des variétés Oued Zenati et Mahon Demias issus d'embryons immatures.



Figure : III-27: Développement de la partie aérienne sans la partie racinaire.

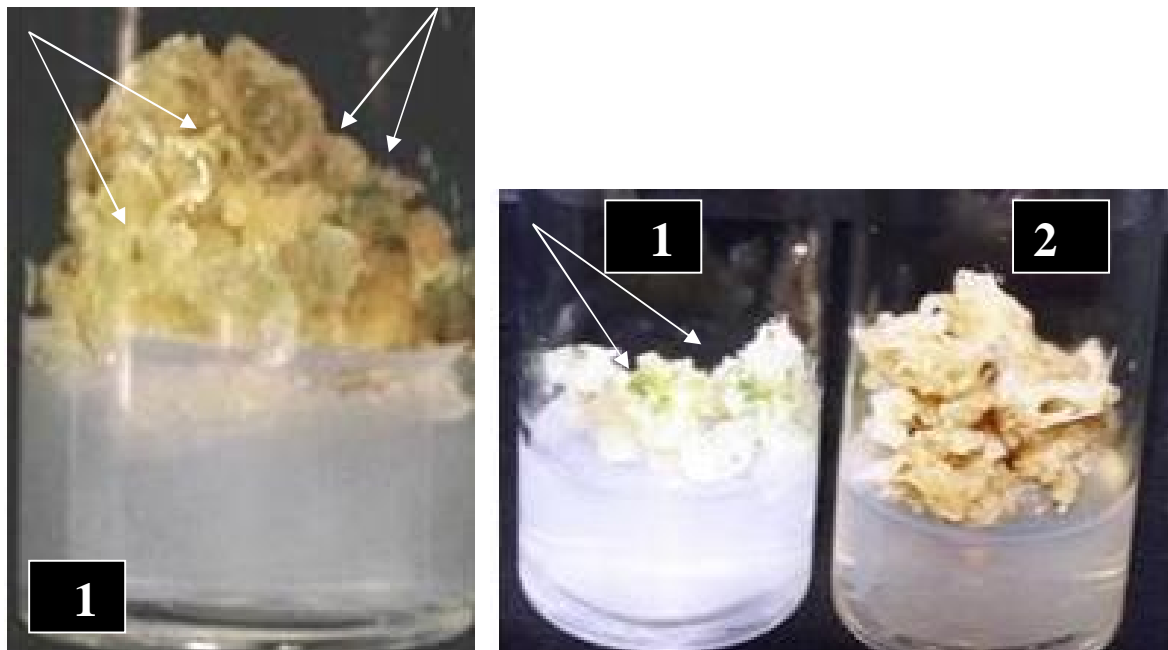


Figure : III- 28 : Cal volumineux embryogène présentant des zones méristématiques représentées par les flèches (1) et cal volumineux pâteux non embryogène (2).

15-Effet de l'AIA et du BAP sur la régénération:

Les travaux de Skoog et al (1966) ont prouvé que l'association de l'AIA et la KIN provoque le blocage des propriétés rhizogène, c'est la raison pour laquelle on a préféré remplacer la KIN par le BAP à 0.25 mg/l.

Le milieu de base MS dilué de moitié en concentration des macroéléments additionné à cette combinaison hormonale, présente une action favorable se traduisant par le développement d'un bon système racinaire.

En effet, après 10 jours de culture, les premières racines commencent à apparaître, leur formation passe par trois étapes essentielles qui sont : l'induction, l'initiation et l'élongation racinaire (Fig : III-29), ils mesurent entre 120 mm et 230 mm (Tab : III-6). On note que les racines de blé dur sont plus longues que celle du blé tendre.

Parmi les 34.38 % (dont 21 cals sont issus d'embryons immatures et 12 cals sont issus d'embryons matures) des cals survivants, quatre plantules entières se sont formées. La régénération de ces plantules depuis le milieu sélectif, suggère que ces cellules mettent en place une stratégie de tolérance au stress liée à des propriétés cellulaires suite à la présence d'agent sélectif dans le milieu (Adkins et *al.*, 1995).

Tableau : III-6 : Longueurs des racines des plantules régénérées.

Variétés	Types d'embryons	Milieus inductifs	Longueur des racines (mm).
MD	Immature	- PEG	170
MD	Immature	+ PEG	150
DK	Immature	+ PEG	200
DK	Immature	- PEG	200
OZ	Immature	+ PEG	230
AA	Mature	+ PEG	120

Cependant, les cals cultivés sur le milieu dénué de PEG n'ont régénérées que deux plantules. Parmi les six plantules régénérées, cinq sont issues d'embryons immatures et où les variétés Mahon Demias et Djenah Khetifa régénèrent le nombre le plus élevé (4). Tandis que les embryons matures n'ont permis la régénération que d'une seule plantule dérivée de la variété Aïn Abid (Tab : III-6). On constate alors que les cals issus d'un même type d'embryon possèdent des aptitudes organogènes assez différentes, l'impact du génotype a été mis en évidence par des analyses quantitatives chez diverses espèces notamment chez le blé (Keyes, Collins., Taylor., 1980 ; Ahloowalia, 1982 ; Sears and Deckard, 1982 ; Milach et *al.*, 1991). Nos résultats concernant la régénération des plantules à partir d'embryons immatures rejoignent ceux obtenus par Zhang and Seilleur (1987).

Par ailleurs, la survie et la différenciation des cals sur ce milieu (AIA+BAP) après les conditions de stress dans lesquels ils se trouvaient indiquent une certaine tolérance à cet agent sélectif. Ce fait suggère qu'un mécanisme de résistance opérant au niveau

cellulaire, pourrait être impliqué, du moins en partie dans la résistance au stress hydrique chez ces géotypes, les plantules régénérées depuis le milieu stressé, sont par conséquent considérées comme tolérantes au stress hydrique, puisque la résistance d'une plante au stress hydrique s'exprime par sa capacité à survivre et à produire dans des conditions de stress (Monneveux., 1991).

Divers auteurs estiment que dans la mesure où l'on constate la présence de cellules possédant les capacités de résistance souhaitées, il faut recourir à la sélection (Korradimova., 1990 ; Zid et Grignon., 1991), mais dans notre travail on a préféré transférer tous les cals y compris ceux présentant des nécroses. En effet, le transfert et le suivi de ces cals dégénérés et considérés comme morts était révélateur, car on a assisté après six semaines de culture depuis le milieu additionné au PEG, à l'apparition soudaine d'une prolifération cellulaire sur un cal complètement nécrosé dérivé de la variété Oued Zenati des embryons matures et sur lequel on voit apparaître des boutons verts correspondant à la présence de zones méristématiques (Bencheikh., 1992) (Fig : III-30).

Un autre cas encore très important à signaler était observé après cinq semaines de culture, sur un cal issu de la variété Aïn Abid des embryons immatures, variété présentant de faibles potentialités callogènes, qui consiste en l'apparition de minuscules racines sur l'extrémité du cal et qui s'allonge lentement (Fig : III-31).

Un autre cas concerne la variété Waha issu d'embryon immature et cultivée avec deux autres cals du même géotype et du même type d'embryon et où les deux phénomènes : callogenèse (Fig : III-32(1)) et initiation racinaire (Fig : III-32 (2)) sont apparus sur un même cal.



Figure : III-29 : Formation de racines sur un cal stressé issu de la variété Djenah Khetifa d'embryon immature (la flèche démontre l'enroulement foliaire).



Figure : III-30 : Cal nécrosé issu de la variété Oued Zenati issu d'un embryon mature développant un cal embryogène.



Figure:III-31 : Développement de 2 minuscules racines (représentées par les flèches) sur un cal issu de la variété Aïn Abid d'un embryon immature.

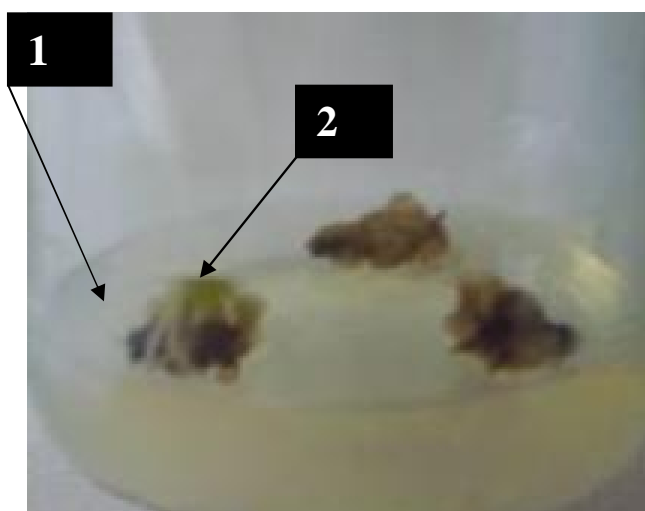


Figure : III-32 : Prolifération cellulaire et développement racinaire sur cal nécrosé de la variété Waha des embryons immatures (1 : Initiation racinaire, 2 : Callogenèse).

Parmi les cals cultivés *in vitro* sur ce milieu, certains arrêtent leurs croissance d'autres n'émettent pas de racines seule les six plantules complètement formées ont été repiquées. Leur reprise a été difficile puisque les racines sont très fines et longues et très attachées aux milieux de culture.

Après une longue phase de culture *in vitro*, les plantules repiquées dans le dessiccateur montrent, aux cours des premières 48 heures très peu de vigueur ceci est principalement dû au choc du changement d'environnement, puisque à partir du septième jour les plantules reprennent très bien, et semblent bien adaptées au nouvel environnement.

16- Caractères morphologiques :

La comparaison établie entre les plantules cultivées *in vitro* et celles cultivées *in vivo*, fait apparaître des différences chez les cals ayant développés des parties aériennes, ces différences sont relative à la taille des plantules où l'on note une certaine diminution. Le raccourcissement du chaume est un phénomène observé par Fukui (1983) selon lequel il serait dû à une mutation monofactorielle. Observée également par Sun et al (1983) sur des variétés de riz, et qui ont démontré que ce caractère est contrôlé par un gène mutant (isolé en seconde génération).

D'autres différences relevées, relative à l'orientation et la forme des feuilles, ces dernières présentent une forme spiralée et enroulée sur elles-mêmes (Fig : III-26). L'enroulement foliaire observé chez certaines variétés de blé résistantes consiste en un mécanisme d'économie en eau (Clarke., 1986). Des modifications de l'expression de ce genre ont été mises en évidence chez plusieurs espèces notamment chez le blé (Larkin., 1987).

On a également noté un raccourcissement du cycle végétatif sur les variétés Oued Zenati, Waha issues d'embryons matures et dérivées de cal témoin, ainsi que sur la variété Mahon Demias issue d'embryon immature et dérivée de cal stressé. En effet, l'apparition du stade tallage, bien que les feuilles soient très difficiles à distinguer, ce fait en un temps relativement court correspondant à huit semaines en générale depuis la mise en culture. La réduction de la phase végétative et la résistance aux stress hydriques représentent deux objectifs potentiels, il s'agit souvent de caractères monogéniques apparaissant par mutation (Fukui, 1983 ; Bajji., Lutts et *al.*, 1999).

Les variations morphologiques observées chez les plantes régénérées ainsi que sur les cals ayant développés une partie aérienne, peuvent être liées à une perte ou un gain de chromosome entier ou à un changement structural des chromosomes (Ahloowalia., 1976 ; D'amato et *al.*, 1980). Divers auteurs rapportent notamment que les plantes manifestant des variations morphologiques de ce genre présentent un nombre anormal de chromosomes (Green et Philips., 1975 ; Ahloowalia., 1982).

L'origine de ces variations, y compris les variations observées dans la croissance et l'aspect morphologique des cals ainsi que lors des différentes réponses des cals issus d'un même lot face aux PEG, restent multiples, il peut être lié à la régénération sur cal, qui engendre obligatoirement des perturbations dans le développement. En effet, le développement d'une plante entière à partir de méristème amène rarement à des variations alors que la régénération d'explants à partir de cals semble être une source commune de variations somaclonale (Clare et Collin., 1974).

D'autre part, l'âge de l'explant est considéré aussi comme une variable critique pour la variation somaclonale (De Jong et Custers., 1986 ; Evans et Sharp, 1988 ; Rao et *al.*, 1992 ; Kaeppler et *al.*, 2000).

Notons aussi que la présence d'agent sélectif dans le milieu peut augmenter la probabilité d'obtention de plantes tolérantes (Nabors et *al.*, 1980) puisque dans cette voie des plantes tolérantes ont été obtenus après sélection *in vitro* par le PEG chez le blé dur (Bouharmont., 1991 ; Hsissou et Bouharmont., 1994) le riz (kavi Rishor and Reddy., 1985, Adkins et *al.*, 1995) et le *Sorghum* (Smith et *al.*, 1985) et amenant à des dérives génétiques (Janes., 1966 ; Milache., 1970)

D'autre part, l'addition des régulateurs de croissance au milieu de culture est connue pour avoir de l'influence sur la fréquence des changements de caryotype des cultures. Fréquemment l'auxine 2.4-D, et parfois à des concentrations élevées (Kaepler et *al.*, 2000) est considérée comme responsable des variations chromosomiques (Singh et *al.*, 1975).

Les cals issus d'embryons matures et immatures ont été cultivés respectivement pendant 8 et 5 mois *in vitro*, et repiqués chaque fin du mois sur milieu frais ; la durée de cette phase était apparue depuis longtemps comme facteur de variation génétique (Demarly., 1974 ; Sibi., 1976).

Les cals issus d'embryons matures et immatures ont été repiqués respectivement 9 et 6 fois ; la fréquence des mutations est également liée au nombre de transferts *in vitro* (Deshayes., 1976 ; Skirvin et Janick., 1976 ; McCoy et Philips., 1982 ; Mikoko-Nsika., 1982 ; Lee., 1984) comme si cette phase avait un effet mutagène sur les cellules cultivées, ou si la régulation des systèmes de réparation de l'ADN était perturbée (Sibi., 1981). Les tissus longuement cultivés, peuvent changer de comportement ou de caractéristiques de manière irréversible. Ainsi plus la phase callogène est longue plus la fréquence des variations est importante (Karp & Bright, 1985).

17-Paramètre physiologiques :

L'analyse de la TRE, permet de décrire d'une manière globale le statut hydrique en réponse au stress hydrique subi, ainsi que de donner le niveau de turgescence à l'échelle cellulaire (El jaafari., 2000).

Dans notre cas, l'effet du PEG a induit une baisse substantielle des relations hydriques (TRE) (Larabi et al., 2000). En effet, l'abaissement de la TRE pour la variété Mahon Demias est de l'ordre de 22.64%. Cependant, la TRE de la variété Djenah Khetifa est plus élevée que celle du témoin (19.95%) et où on enregistre une TRE de 66.67% chez la plantule dérivée de cal témoin et de 89.31 % chez la plantule dérivée de cal stressé. Il se pourrait alors que la variété Djenah Khetifa issue de cal stressé a développée ou dispose d'un mécanisme de tolérance lié au stress hydrique.

Les travaux de Martin et al (1989) et Diaz-perez et al (1995) suggèrent que les génotypes qui arrivent à maintenir une TRE élevée malgré le stress sont des génotypes tolérants et qui dans notre travail sont les génotypes Oued Zenati et Djenah Khetifa. De même, des travaux réalisés sur le blé dur ont pu mettre en évidence que les plantes qui manifestent des valeurs de TRE élevées étaient les plus tolérantes car elles maintiennent des valeurs de Pn élevées malgré la contrainte hydrique résultats confirmés par les travaux de Djekoune et Ykhlef (2000).

Le génotype Djenah Khetifa présente une TRE de 76.48% pour une Pn élevée ($3.59 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) contrairement à la variété Mahon Demias qui enregistre une valeur moins élevée s'évaluant à 66.67% pour des Pn moins élevées.

La présence du PEG dans le milieu a également engendré des réductions importantes de l'activité photosynthétique. En effet, le taux d'abaissement chez la variété Djenah Khetifa est de l'ordre de 43.76% par rapport à son témoin, les mêmes variations sont relevées sur la variété Mahon Demias de blé tendre (54%), nos résultats sont confortés par d'autres travaux réalisés sur des variétés de blé tendres et durs et pour lesquels les auteurs ont relevés un abaissement de la Pn sous contrainte hydrique (Hopkins., 1999). Cette baisse de l'activité photosynthétique est généralement attribuée pour une large part à la fermeture des stomates et donc à une augmentation des résistances à la diffusion du CO_2 à travers la feuille jusqu'au site de fixation (Djekoune et Ykhlef., 2000a). Les différents auteurs ont révélés un parallélisme entre l'augmentation de la résistance foliaire et la chute de la Pn. Les résultats sont consolidés par des pourcentages d'augmentation de la résistance stomatique s'évaluant à 1.04% pour la variété Djenah Khetifa et de 35.98% de la variété Mahon Demias.

Sachant que ces variations étant directement liées aux variations enregistrées sur la R_s . Ceci rejoint les travaux réalisés par Djekoune et Ykhlef (2000) où il a été noté que les génotypes dits tolérants ont pu assurer une bonne ouverture stomatique avec maintien des taux de P_n plus ou moins élevés tel que la variété Djenah Khetifa contrairement aux variétés sensibles dont la fermeture stomatique intense conduit à la baisse de la P_n , phénomène observé chez la variété Mahon Demias.

L'étude physiologique nous permet donc de déduire que les génotypes de blé dur spécialement Djenah Khetifa manifestent une tolérance vis-à-vis du stress hydrique plus importante que celle relevée chez les variétés de blé tendre (Mahon Demias). Nos résultats concernant la tolérance du blé dur par rapport au blé tendre sont confrontés par les travaux de Cauderon (1978).

Conclusion générale et discussion

Le travail que nous avons entrepris comprend plusieurs niveaux, en définissant pour chacun d'eux un objectif spécifique :

Les résultats obtenus pour la phase callogène indiquent que les embryons matures issus de génotypes de blé dur, ont des réactions plus précoces que les plus jeunes, tant pour le gonflement du scutellum que pour l'induction de cals. Par ailleurs, l'acquisition de la compétence à la callogenèse est dépendante de trois facteurs essentiels :

- L'âge de l'embryon : les embryons matures se prêtent le mieux à la callogenèse, ainsi la surface du cal augmente avec l'accroissement de la surface de l'embryon (Jensen., 1976 ; Dale et Deambrogio., 1979).
- L'association constituée de 1mg/l d'AgNO₃ et de 2mg/l de 2.4-D, semble être la plus favorable pour l'accroissement et la prolifération cellulaire. Cependant l'utilisation de l'auxine 2.4-D à forte concentration a un effet Feed-back sur la croissance des cals et qui finissent par un dépérissement.
- L'espèce de blé: en moyenne, les variétés de blé dur favorisent mieux la prolifération cellulaire. Cependant, les plus gros cals ne correspondent pas tous forcément aux cals présentant les meilleures surfaces moyennes ; la croissance des cals est très hétérogène. L'aptitude à la callogenèse est aussi liée à l'espèce à l'intérieur de laquelle cette réponse peut encore varier suivant le génotype (Zryd., 1988).

A ce stade de culture, la variation somaclonale se manifeste au sein d'un même génotype dérivé d'un même embryon et cultivé sous les mêmes conditions, du point de vue : croissance, couleur, texture et aspect superficiel des cals. 4 types de cals ont été obtenus chez les deux types d'embryons : des cals cubique volumineux, en palme, et embryogène, on y retrouve pratiquement toutes les variétés mais à des proportions variables.

Afin de favoriser la production des embryons somatiques, il serait préférable de cultiver le cal en entier sur le milieu MS dénué d'hormones, puisque leur apparition s'est effectués sur le milieu MS sans hormones. L'embryogenèse somatique à laquelle on a été confronté fait partie de l'embryogenèse directe. La masse résulte de la multiplication des cellules PEDC et donc de leur clonage (PEDC cloning) (Sharp et *al.*, 1980).

Les régulateurs de croissance paraissent nécessaires pour le développement aérien (AIB et KIN) ainsi que pour le développement racinaire qui se trouve être à la concentration associant l'AIA et le BAP, sur le milieu de base MS dilué de moitié en concentration des macroéléments. Ce phénomène de régénération rend compte de la capacité que possèdent les cellules à restructurer une plante entière en conditions normales et en conditions de stress hydrique.

La réaction des cals face au stress varie simultanément au sein d'un même génotype; 34.38 % des cals cultivés ont été sélectionnés *in vitro* pour leur tolérance aux PEG, parmi lesquels les embryons immatures de blé dur en sont les moins atteints il est donc possible de sélectionner *in vitro* pour la résistance au stress hydrique chez le blé dur et tendre.

La présence du PEG dans le milieu n'a pas réduit la fréquence de régénération pour les embryons immatures, puisque 4 plantules se sont différenciées après un séjour de 30 jours sur le milieu sélectif, contrairement aux cals témoins qui n'ont permis la régénération que de deux plantules. Les variétés régénérées sur cals stressées sont normalement tolérantes au stress hydrique. On peut penser que le choc provoqué par la transplantation de l'embryon dans un milieu synthétique perturbe le développement normal (Monnier., 1980). En effet, le caractère sélectionné peut être relié à des modifications des propriétés des cellules membranaires (Martin et *al.*, 1987 ; Vasquez-tello et *al.*, 1990). D'autre part, ce phénomène de résistance pourrait être également expliqué par le fait que les plantules régénérées ne présentent pas forcément des modifications intracellulaires mais que ceci est peut être dû à la persistance de quelques cellules non mutées dans le cal sélectionné (Demarly., 1986). D'autre part le passage par cal favorise l'expression des gènes non exprimés classiquement chez le parent (Chevreau, 1991, 1996, 1997, Chevreau et *al.*, 1999).

L'âge de l'embryon influence sur les aptitudes de tolérances au PEG ainsi que sur la régénération, puisque cinq plantules entières se sont formées à partir d'embryons immatures et parmi lesquelles trois sont issues de milieu stressé. Cependant, le caractère de tolérance apparent chez le blé dur ne paraît pas lié aux capacités de régénération puisque le nombre de plantules régénérées à partir de blé tendre et de blé dur est équivalent.

Les modifications morphologiques relatives à l'aspect, la croissance des cals et la réaction des lignées cellulaires face au PEG ainsi qu'au niveau des plantules régénérées relatives à la disposition du feuillage, la taille du chaume et la durée du cycle végétatif (chez quelques variétés) et l'enroulement foliaire ; se traduisent par des modifications des propriétés cellulaires (Alhoowalia., 1982 ; Fukui., 1983 ; Martin *et al.*, 1987 ; Vasquez-Tello *et al.*, 1990). Toutes ces perturbations sont à l'origine de divers facteurs dont le passage par cal (Clare et Collin., 1974), la durée de cultures *in vitro* (Bayliss., 1980 ; Karp & Bright, 1985 ; Larkin., 1987), la présence de l'agent sélectif (PEG) (Clare et Collin., 1974) et du 2.4-D (Kaepler *et al.*, 2000) dans le milieu ainsi qu'à l'âge de l'embryon (Zhang., 1988).

Les phénomènes observés de callogenèse et rhizogenèse sur les cals complètement nécrosés n'excluent pas l'hypothèse que des variations pourraient se produire à leurs niveaux (Handa., 1983).

La technique de culture d'embryons immatures, pourrait constituer le matériel privilégié pour la régénération de plantes tolérantes, en un temps relativement court, ainsi que de sélectionner des plantules directement tolérantes aux stress hydrique. Ce qui avantagera cette technique pour un gain de temps au lieu d'attendre la maturation des graines. Cependant, la détermination de la nature génétique des variations observées reste difficile (Maraschin *et al.*, 2002) il serait alors intéressant et utile:

- § D'accroître le nombre d'embryons cultivés de départ afin de régénérer un taux élevé de plantules sur lesquelles il serait possible d'effectuer des études plus approfondies.

- § De vérifier la stabilité des nouveaux caractères retenus sur les descendants.
- § Cultiver les embryons immatures récoltés à différents âges et évaluer leurs aptitudes à la callogenèse ainsi qu'à la fréquence de la variation somaclonale.
- § Produire massivement les embryons somatiques, cela constituerait une cible intéressante pour la transformation génétique et une méthode de choix pour une multiplication massive en bioréacteurs et traitement en semences artificielles.

Références bibliographiques

- **ADKINS S.A., KUNANUVATCHAIDACH R.K., GODWIN I.D., 1995.** Somaclonal variation in rice drought tolerance and other agronomic characters. Austral. J. Bot. 43:201-209.
- **AGUAVALC M., NOIROT M., VERDEIL J.L., MOREL J et GROSDÉMANGE F., 1997.** Specific nutritional requirements of coconut callus during somatic embryogenesis induction. Journal plant physiology: 150- 227.
- **AHLOOWALIA B.S., 1976.** Chromosomal changes in parasexually produced ryegrass. In: **JONES K and BRANDHAM** (Eds.).Current chromosome research. Elsevier / North-Holland Press. Amsterdam: 115-122.
- **AHLOOWALIA B.S., 1982.** Plant regeneration from callus culture in wheat. Crop Sci. 22:405-410.
- **AHUJA P.S., PENTAL D & COCKING E.C., 1982.** Plant regeneration from leaf base callus and cell suspensions of *Triticum aestivum*. Z. Pflanzenzüchtg. 81:139-144.
- **ANONYME., 2003.** Consommation le blé transgénique. Buletin Inf'ogm Spécial Afrique N°3.Consomation & Legislation. <http://wwwf.infogm.org>
- **ANONYME a., 2003.** L'Algérie a importé plus d'un milliard de dollars de céréales en 2003. <http://gredaal.ifrance.com>
- **ANONYME.** Les principales variétés de céréales cultivées en Algérie. ITGC.
- **ANONYME., 1999.** Micropropagation pour l'entreprise sericole-Cahier de références techniques. **CIDES** (Centre d'Information et de Développement Expérimental en Sericulture).
- **ANONYME., 2001.** **Information sur des aliments nouveaux biotechnologie alimentaire blé tolérant l'imidazolinone.** <http://www.hc-gc.ca>

- **ANONYME., 2004.** Cahier centenaire de l'Algérie XII. www.aj.graciacfree.fr.
- **BAJJI M., LUTTS S., KINET J.M., 1999.** La résistance au stress hydrique chez le blé dur : comparaison des comportements au niveau cellulaire et au niveau de la plante entière. Ciheam. option mediterranneennes. 227-231.
- **BALL E., 1953.** Hydrolysis of sucrose by autoclaving media, a neglected aspect in the technique of culture of plant tissues. Bull. Torrey. Bot. Club. 80:409-411.
- **BAOCHUN L.I., CASWELL K., LEUNG N., CHIBBAR R.N., 2003.** Wheat (*Triticum aestivum* L.) somatic embryogenesis from isolated scutellum: days post anthesis, days of spike storage, and sucrose concentration affect efficiency. Proquest. 39(1):4-20.
- **BAYLISS., M.W., 1980.,** Chromosomal variation in plant tissue culture. International Review of Cytology. (11):113-143.
- **BENCHEIKH M., 1992.** contribution à l'étude des bases génétiques de l'aptitude à l'embryogenèse somatique chez le pois (*Pisum sativum* L. et *Pisum arvense* L.). docteur de l'institut national agronomique. p34.
- **BERED F., CUNHA DORNELLES A.L., FELIX DE CARVALHO F.I., FEDERIZZI L.C., LANGE C.E., HANDEL C.L., 1997.** Genetics of regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant. Braz J. Genetics, 20(2):293-297.
- **BOCCON-GIBOD J., 1980.** Régénération du Crosne du Japon (*Stachys sieboldii* Miq.) par culture de méristème : multiplication et conservation *in vitro* des clones. In : Congrès sur l'application de la culture *in vitro* à l'amélioration des plantes potagères EUCARPIA section légumes, Versaikkés. 31-41.
- **BOMMINENI V.R., JAUHAR P.P., 1996.** Regeneration of plantlets through isolated scutellum culture of durum wheat. Plant Sci. 116:197-203.

- **BORST P., GREAVES D.R., 1987.** Programmed gene rearrangements altering gene expression. *Science*. 235 :658-667.

- **BOUHARMONT J., 1991.** Utilisation de la variation somaclonale et de la sélection *in vitro* à l'amélioration du riz. Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris.1-8.

- **BOUKERNOUS B., 1982.** Quelques aspects de l'utilisation de l'haploïdie en vue de l'amélioration de l'orge *Hordum vulgare L.* : production d'haploïdes via *Hordum bulbosum L.* et mise au point des techniques de culture *in vitro* (sur embryons diploïdes d'*H. vulgare L.*).Rapport de stage en vue de l'obtention du D.E.A d'amélioration des plantes.

- **BOULAY J., 1993.** La culture *in vitro* et ses applications à des plantes carnivores. Club Drosera de Metz. Univ. Nancy 1.

- **BREGITZER P., 1992.** Plant regeneration and callus type in barley: Effects of genotype and culture medium. *Crop Scienc*, 32: 1108-1112.

- **BRIGGS W. B., 1964.** Phototropism in higher plants. In *Photophysiology*. Academic Press. 1: 223-271.

- **BROWN C.D.W., 1988.** Germplasm of *in vitro* somatic embryogenesis in alfalfa. *Hortscience*. 23(3):526-531.

- **BUSTAMANTE R., 1999.** Somatic Embryogenesis in *Hordrum vulgare* (Barley) and *Triticum aestivum* (wheat). *Biologie* 3410.

- **CARLSON P.S., 1975.** Methionine-sulfoximine resistant mutants of tobacco. *Science*. 180: 1366-1368.

- **CAUDERON Y., 1978.** Hybridation interspécifique et amélioration du blé (Eds) : Institut agronomique. 3(2):15-35.

- **CHALEFF P.S., 1986.** Isolation and characterisation of mutant cell lines and plant: herbicides –resistant mutants. In: Vasil I.K, (Eds) Cell culture and somatic cell genetics of plants. Plant regeneration and genetic variability Academic Press, London. 3: 527-547.
- **CHAUGARDIEFF P., 1985.** L'utilisation de la variabilité exprimée spontanément en culture, en vu de l'amélioration des plantes. Bull. Soc. Fr., 132, Actual. Bot. 314 : 79-94.
- **CHAUTUVERDI H.C et MITRA G.C., 1975.** A shift in morphogenetic pattern in Citrus callus tissue during prolonged culture. Ann. Bot., 39: 683-687.
- **CHEN T.H et GUSTA L., 1986.** Isolation and characterisation of mutant cell lines and plant: herbicides –resistant mutants. In: **Vasil I.K,** (Eds) Cell culture and somatic cell genetics of plants. Plant regeneration and genetic variability Academic Press, London. 3: 527-547.
- **CHEVREAU E., 1991.** Revue du Palais de la Découverte (FRA). 20 (192) :13-20.
- **CHEVREAU E., 1996.** Fruit tree diseases and varietal resistance. Colloque sur les recherches fruitières; Angers (FRA) ; 1994/03/15-16, CTIFL; Paris (FRA). 10 : 69-75.
- **CHEVREAU, E., 1997.** Arboriculture Fruitière (FRA). 501 : 43-47.
- **CHEVREAU, E., MOURGUES, F., REYNOIRD, J.P., BRISSET, M.N., 1999.** Acta Horticulturae (NLD), International workshop on fire blight;Kusadasi (TUR);1998/10/12-15 . 489 : 297-300.
- **CHU J.C & WANG Y.W & SANG J.L., 1987.** Long term plant regeneration from callus cultures of haploid wheat. Plant cell tissue organ cult. 11: 221-226.
- **CLARKE J.M., 1986.** Effect of leaf rolling in leaf water loss in *Triticum* spp. Cari J Plant Sci: 66: 885-891

- **CLARE M.V., COLLIN H.A., 1974.** Meristem culture of Brussels sprouts. *Hort Res.*, 13(2/3):111-118.
- **COLLINS G.B., VIAN W.E., PHILLIPS G.C., 1978.** Use of 4-amino-3-5.6-trichlorophenoxyacetic acid as an auxin source in plant tissue cultures, *Crop. Sci.* 18:286-288.
- **CROCOMO O.J, OCHOA-ALEJO N., 1983.** Herbicide tolerance in regenerated plants. In: **EVANS DA, SHARP WR, AMMIRATO PV, YAMADA Y,** (Eds). *Handbook of plant cell culture. Technique for propagation and breeding.* Macmillan, New York. 1: 770-781.
- **CURE W.W et MOTT R.L, 1978.** A comparative anatomical study of organogenesis in cultured tissues of maize, wheat and oats, *Physiol. Plant.* 42: 91-96.
- **D'AMATO F, BENNICI A, CIONINI P.G, BARONCELLI S, AND LUPI M.S., 1980.** Nuclear fragmentation followed by mitosis as mechanism for wide chromosomes number variation in tissue cultures: its implication for plant regeneration: In: **SALA F et al. (Eds)** *Plant cell cultures: results and perspectives.* Elsevier/North-Holland Press. Amsterdam.67-72.
- **DAALOUL A, SLIM-AMARA H and TRIFA Y., 1992.** Androgenèse et culture *in vitro* chez quelques génotypes tunisiens de blé : 351-373. In: *Tolérance à la Sécheresse des Céréales en Zones Méditerranéenne. Diversité Génétique et Amélioration Variétale. Les colloques de l'INRA.* 64 :15-17.
- **DALE P.J & DEAMBROGIO E., 1979** A comparisons of callus induction and plant regeneration from different explants of *Hordum vulgare*. *Z. Pflanzenzuecht.* 94: 65-77.
- **DE JONG J., CUSTERS J.B., 1986.** Induced changes and flowering of chrysanthemum after irradiation and *in vitro* culture of pedicels and petals epidermis. *Euphytica.*35:137-148.

- **DEBERGH P., 1983.** Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant.* 59:270-276.

- **DEMARLY Y., 1974.** Les effets cytoplasmiques et amélioration des plantes. *Le Sélectionneur Fr.* 19:61-88.

- **DEMARLY Y., 1986.** Experimental and theoretical approach of *in vitro* variations. In: **SEMAL J,** (Eds). CEC symposium somaclonal variation and crop improvement. 1985, Gembloux, Belgique. 84-99.

- **DESHAYES A., 1976.** Effets de cycles successifs de néoformation de bourgeons *in vitro* sur l'aptitude à la variation somatique chez un mutant chlorophyllien de *Nicotiana tabacum var Samsun*. *Mutation Res.* 35 : 331-246.

- **DIAZ-PEREZ J.C., SHEKEL K.A and SUTTER E.G., 1995.** Relative water content and water potential of tissues cultured apple shoots under water deficit. Published in journal of Experimental Botany. 46(282):111-118.

- **DJEKOUNE A et IKHLEF N., 2000.** Adaptation photosynthétique et résistance à la sécheresse chez le blé dur (*Triticum turgidum* L.var. durum.) : Analyse de la variabilité génotypique. *Option méditerranéenne.* 40:327-330.

- **DJEKOUNE A et IKHLEF N., 2000a.** comportement hydrique, activité photosynthétique et résistance à la sécheresse chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.). *Symposium blé 2000.* 155-159.

- **DUCREUX G., ROSSIGNOL M., 1986.** La pomme de terre. *La recherche.* 174:193-203.

- **DUNWELL J.W., 1985.** Anther an ovary culture. In: Jones MGJ, (Eds). *Advance in agricultural biotechnology: cereal tissue and cell. Culture.* Marthinus nijhoff dordrecht: The Netherlands. 1-44.

- **DUNWELL J.W., 1986.** Pollen, ovule and embryo culture as tools in plant breeding In: Withers LA, Alderson P.G, eds. Plants Tissue Culture and its agricultural application. Butter-Worths London: 375-404.

- **EL JAAFARI S., 2000.** Durum wheat breeding for abiotic stresses resistance: Defining physiological traits and criteria. Option méditerranéenne. 40:251-256.

- **EVANS D.A SHARP W.P., MEDINA-FILHO H.P., 1984.** Somaclonal and gametoclonal variation. Amer J Bot. 71:759-774.

- **EVANS D.A., 1989.** Somaclonal variation-genetic basis and breeding applications. Trends in Genetics. 5 :46-50.

- **EVANS, D.A.; SHARP, W.R., 1988.** Somaclonal and Gametoclonal Variation. In: **EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P., V.** (Eds.) Handbook of Plant Cell Culture. New York: Macmillan Publishing Company. 4: 97- 132.

- **FERNANDEZ S., MICHAUX N., FIRRIERE and COUMANS M., 1999.** The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum Desf.*): histology and improvement by AgNO₃.plant growth regulation. 28:147-155.

- **FOROUGHI-WEHR B & FRIEDT W., 1984.** Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant *Hordeum vulgare* lines by anther culture. Theor Appl Genet 67:377-382.

- **FUKUI K., 1983.** Sequential occurrence of mutations in a growing rice callus .Theor Appl Genet. 65:225-30.

- **GAFF D.F et OKONG'O-OGOLA O., 1971.** The use of non permeating pigments for testing the survival of cells, J. Exp. Bot. 22:756-758.

- **GAMBORG O.L., MILLER R.A., OJIMA K., 1968.** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res 50:151-158.

- **GAUTHERET R.J., 1985.** La culture des tissus végétaux.85-95, 213-242.
- **GAUTHERET R.J., 1938.** Sur le repiquage des cultures de tissu cambial de *Salix caprea*. C. R. Ac. Sc. 206:125-127.
- **GAUTHERET R.J., 1955.** The nutrition of plant tissue culture. Ann .Rev. Plant. Physiol. 6:433-484.
- **GOSCH-WACKERLE G., AVIVI L & GALUNS E., 1979.** Induction, culture and differentiation of callus from immature rachises, seeds and embryos of *Triticum*. Z. Pflanzenphysiol. 91:267-278.
- **GREEN C.E., & PHILLIPS R.L & KLEESE R.A., 1974.** Tissues culture of maïs (*Zea mays* L) Initiation, maintenance, and organic growth factors Crop Sci, 14:54-58.
- **GREEN C.E., 1982.** Somatic embryogenesis and plant regeneration from friable callus of *Zea mays*. Abstr. 5t Intern. Congr. Plant Tissue and Cell Culture, Tokyo.
- **GUHA S et MAHESHWARI S.C., 1964.** *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature.204:497-498.
- **GUPTA P.K., VARSHNEY R.K., SHARMA P.C., RAMESH B., 1999.** Molecular markers and their applications in wheat breeding. Plant Breed. 118: 369–390.
- **HADWIGER M.A., HEBERLE-BORS E., 1986.** Pollen plant production in *Triticum turgidum*. In: Genetic manipulation in plant breeding. Proc Int Symp Organized by EUCARPIA. Berlin. Germany: 303-305.
- **HADWIGER M.A., SARRAFI A., ALIBERT G., 1993.** Influence of genotype and culture conditions on the production of embryos from anthers of tetraploid wheat (*Triticum turgidum*). Euphytica 65:81-85.
- **HALPERIN W., 1967.** Population density effects in embryogenesis in carrot cell cultures. Exp. Cell Res. 48:170-173.

- **HALPERIN W., 1966.** Alternative morphogenetic events in cell suspension. Am. J. Bot. 23:996-1007.

- **HANDA A.K., 1983.** Clonal variation for tolerance to poly ethylene glycol water stressing cultured tomato cells. Plant Physiol. 69:514-521.

- **HANNING E., 1904.** Zur Physiologie pflanzlicher. Über die Kultur von Cruciferen. Embryonen ausserhalb des embryosaks, Bot. Zeit. 62:45-80.

- **HANOWER J., HANOWER P., 1984.** Inhibition et stimulation, en culture in vitro, de l'embryogenèse des souches issues d'explants foliaires de palmier à huile, C.R. Acad.Sc. Paris 298 :45-48.

- **HASSAWI D, QI J. LIANG C.H., 1990.** Effects of growth regulators and genotype on production of wheat and triticales polyhaploids from anther culture. Plant Breeding 104 : 40-45.

- **HELLER R., 1953.** Physiologie végétale. Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. 14:1-223.

- **HOCHER V., VERDEIL J.L., GROSDÉMANGE F., HUET C., BOURDEIX R., N'CHO Y., SANGARE A., HORNING R., JACOBSEN H.J., RILLO E., OROPEZA C., HAMON S., 1998.** Réseaux transnationaux d'amélioration des plantes utilisant les biotechnologies. 7(6):499-505.

- **HOPKINS W.G., 1999.** Introduction to plant physiology. Second edition. The University of Western Ontario. Edit. John Wilay and sons. Inc. 512p.

- **HSISSOU D & BOUHARMONT J., 1994.** *In vitro* selection and characterization of drought tolerant plants of durum wheat (*Triticum durum* Desf.). Agronomie. 2:65-70.

- **HUGES KW ., 1983.** Selection for herbicide resistance. In: **EVANS D.A, SHARP W.R, AMMIRATO P.V, YAMADA Y.** (Eds). Handbook of plant cell culture. Technique for propagation and breeding. Macmillan, New york. (1): 442-460.

- **INAGAKI M.N and TAHIR M., 1990.** Effect of silver nitrate on callus induction and plant regeneration in wheat. Rachi. p 19.

- **JÄHNE A et LÖRZ H., 1995.** Cereal microspore culture. Review article. Plant Sci. 109 : 1-12.

- **JANES B.E., 1966.** Adjustment mechanism of plants subjected to various osmotic pressures of nutrient solutions. Soil Sci. 101:180-188.

- **JENSEN C.J., 1976.** Barley monoploids and doubled monoploids: techniques and experience. In: Barley Genetics III. Proc. 3rd Int. Barley Genetics Symp.1975. 316-345.

- **JENSEN C.J., 1977.** Monoploïdes production by chromosome elimination. In : **REINERT J.& BAJAJ Y.P.S.** (Eds), applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer, Berlin Heidelberg New York. 299-331.

- **KAEPLER S.M., KAEPLER H.F., RHEE Y., 2000.** Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Molecular Biology. 43:179-188.

- **KAMMOUN N et DAALOUL A., 1990.** Culture *in vitro* des embryons immatures d'orge (*Hordum vulgare* L.) : Effet des caractéristiques de l'embryon sur la formation des cals. 7(1): 330-8065.

- **KARP A et BRIGHT S.W.J., 1985.** On the causes and origins of somaclonal variation. Oxford Survey of Plant Molecular and Cell Biology.2:199-234.
- **KAUFMANN M.R & ECKARD A.N., 1971.** Evaluation of water stress control with polyethylene glycol by analysis of guttation. Plant Physiol. 47: 453-458.

- **KAVI RISHOR P.B.K and REDDY M.G., 1985.** Resistance of rice callus tissues to sodium chloride and poly ethylene glycol. Curr. Sci., 54:1129-1131.

- **KAZUHIO S et NAKAJIMA K., 1989.** Efficient production of haploid wheat (*Triticum aestivum*) through crosses between Japanese wheat and maize (*Zea mays*). Plant Cell Report. 8: 263-266.

- **KELLOU K., 2003.** Sauvetage d'embryons issus des croisements *Triticum durum* Desf. x *Aegilops geniculata* Roth. et *T. durum* Desf. x *Agropyron repens* (L.) Pal. Beauv. Thèse de magistère : Biotechnologie végétale.

- **KEYES G.J, COLLINS G.B., TAYLOR N.L., 1980.** Genetic variation in tissues of red clover. Theor Appl Genet.. 58:265-271.

- **KIRKBY J.M et MENGEL K.E., 1979.** Plant nutrition. Eds. McMillian. XY-London-530p.

- **KITTO S.L., JANICK J., 1985.** Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot, J.Amer. Sco. Hort. Sci. 110: 277-282.

- **KORRADIMOVA M.V., 1990.** Selection for NaCl tolerance in callus of wheat (*T. aestivum* L. and *T.durum* Desf.). In: **NIJKAMPA H, VINDERPIAS L., ARTRIJK I.** (Eds). Progress in plant cellular and molecular biology.Plant Tissue and Cell Culture. Klower Academic Publishers, Amsterdam. 157.

- **KOTT., 1985.** Factors affecting callus formation from embryos of barley (*Hordum vulgare*).Plant Sci.Lett.14: 311-316.

- **KUMAR A., 1994.** Somaclonal variation. Edit. By **BRADSHAW. J.E., MACAY G.R.** (Eds.) GAB International. 197-208.

- **LA RUE., 1938.** Longevity of plant cells in tissue cultures. Science. 87-240.

- **LANGRIDGE P., LAGUDAH E.S., HOLTON TA., APPELS R . ,SHARP P.J., CHALMERS K.J., 2001.** Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. Aust. J. Agric. Res. 52:1043–1077.

- **LARABI A., MELKICHE A., ABED R et BADIS M., 2000.** Effet du déficit hydrique sur la production de deux variétés de blé dur (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) en région semi-aride. Option méditerranéenne. 40:295-297.

- **LARKIN P.J et SCOWCROFT W.R., 1981.**Somaclonal variation. Nouvel source of variability from all cultures for plant improvement. Theo. Appl. Genetic. 60: 197-214.

- **LARKIN P.J., 1987.** Somaclonal variation: history, method and meaning. Iowa State Journal of Research.61:393-434.

- **LAURIE., D.A et BENNETT M.D., 1986.**Wheat and maize (*Zea mays*) hybridation. Can J. Genet Cytol., 28:313-316.

- **LAWLER D.W., 1970.** Absorption of polyethylene glycols by plants and their effects on plant growth. New phytol. 69:501-513.

- **LEE., WETZSTEIN., SOMMER., 1985.** Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar straciflua* L. Towards improved acclimatization and field survival. Plant Physiol. 78:637-641.

- **LEFORT-BUSON M., HEBERT Y., DAMAERVAL M.P., 1988.** Les outils d'évaluation de la diversité génétiques. Agronomie. 8(3): 173-178.

- **LI T.T., 1934.** The development of the embryo of *Ginkgo biloba*. Sci . Rept. Nat . Tsing. Hua .Univ B2. 29-35.

- **LINASSET P & CORNUET P., 1949.** Recherche du Virus de la mosaïque du tabac dans les méristèmes de plantes infectées. C.R.Ac. Sci. Paris. 228:1971-1972.

- **LINSMAIER E.M et SKOOG F., 1965.** Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18:100-127.

- **LUTTS S., VAN SINT JAN V., COSTA DE MACEDO C., KINET J.M., 1999.** Variation somaclonale et sélection *in vitro* pour l'amélioration de la tolérance aux stress abiotiques chez le riz (*Oryza sativa* L.). (Eds) l'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides. Paris. AUPELF-UREF/Jonh Libbey Euritext: 11-18.

- **MACHII H., MIZONO H., HIRABAYASHI T., LI H., HAGIO T., 1998.** Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 53:67-74.

- **MADDOCK S.E., LANCASTER V.A., RISIOTT R. et FAKLIN J., 1983.** Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). *J. Exp. Bot.* 34: 915 - 926.

- **MARASCHIN M., SUGUI J.A., WOOD K.V., BONHAM, C., BUCHI D.F., CANTAO M.P., CAROBREZ S.G., ARAUJO P.S., PEIXOTO M.L., VERPOORTE R., FONTANA J.D., 2002.** Somaclonal variation: a morphogenetic and biochemical analysis of *Mandevilla velutina* cultured cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto.* 35: 633-643.

- **MARGARA J., 1989.** Bases de la multiplication végétative, les méristèmes et l'organogenèse. (Eds). INRA. Paris, 230p.

- **MARTIN U., PALLARDRY S.G., BAHARI Z.A., 1987.** Dehydration tolerance of leaf tissues of six Woody angiosperm species. *Physiol Plant.* 69 : 182-186.

- **MATIN M.A., JARVIS H.B and HAYDEN F., 1989.** Leaf water potential, relative water content, and diffusive resistance in Barley. Published in *Agron. J.*, 81 : 100-105.

- **McCLENDON J.H & BLINKS L.R., 1952.** The use of high molecular weight solutes in the study of isolated intracellular structures. *Nature* 170: 577-578.

- **McCOY T.J., PHILIPS R.L., 1982.** Chromosome stability in maize (*Zea mais* L) tissues culture and sectoring in some regenerated plants. *Can J GenetCytol*; 24:559-565.

- **MENDOZA M.G et KAEPLER H.F., 2002.** Auxin and sugar effects on callus in action and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat.38:1-39.

- **MEULMANS M., 1984.** Extension de la variabilité chez les plantes cultivées par exploitation de la variabilité somaclonale. *Bull. Rech. Agron. Gembloux* 19(1/2): 61-80.

- **MICHEL B.E., 1970.** Carbowax- 6000 compared with mannitol suppressant of cucumber hypocotyl elongation. *Plant physiol.* 45: 507-509.

- **MIKOKO-NSIKA E., 1982.** Analyse de la variabilité dans la descendance des plantes obtenues par culture in vitro de tissues somatique de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tthèse Spéc Amélior ;Univ Paris-Sud, Orsay, 18p.

- **MILACHE B.E., 1970.** Carbowax-6000 compared with mannitol suppressant of cucumber hypocotyl elongation. *Plant Physiol.* 45:507-509.

- **MILACHE S.C.K., FREDERIZZI L.C., CARVALHO F.I.F., DORNELLES A.L.C and LANGE C., 1991.** Regeneração de plantas no cultivo de calos de genótipos brasileiros de trigo. *Pesq. Agropec. Bras.* 26 :1947-1956.

- **MOHAMAND A.S & NABORS M.W., 1991.** Comparison of two methods for callus culture and plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 26: 185-187.

- **MONNEVEUX P., 1991.** Quelles stratégies pour l'amélioration génétique de la tolérance au déficit hydrique des céréales d'hiver In : **CHALBI N, DEMARLY Y,**

(Eds). L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides Paris, Aupelf-Uref/John Libbey Eurotext : 165-186.

- **MONNIER M., 1971.** Action des conditions de stérilisation sur la valeur nutritive des milieux utilisés pour la culture des embryons isolés de *Capsella bursa-pastoris*, Rev. Gén. Bot. 78 : 57-60.
- **MONNIER M., 1984.** Survival of young immature *Capsella bursa-pastoris*. Moenc. Revue Cytol. Biol. Vég. 39:1-120. (These).
- **MONNIER M., 1995.** Culture of zygotic embryos. In: **THORP T.A. (Eds)**, *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer academic publishers, Dordrecht. Netherlands. 117-153.
- **MOREL G.M., 1956.** Nouvelles méthodes permettant de réaliser des cultures de tissus végétaux. Rev. Gén. Bot., 63:314-325.
- **MOREL G.M., 1950.** Sur la culture des tissus de deux Monocotylédones. C. R. Ac. Sc., 230 :1099-1101.
- **MURASHIGE T., SKOOG F. A., 1962.** Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum.15 (3):473-97.
- **NABORS M.W., 1983.** Increasing the salt and drought tolerance of crop plants. Plant Biochemistry and physiology. 2:165 - 184.
- **NABORS M.W., GIBBS S. E., BERNSTEIN C. S. et MEIS M.E., 1980.** NaCl - tolerant tobacco plants from cultured cells. Z. Pflanzenphysiol. 97: 13 - 17.
- **NITSH J.P., 1969.** Experimental androgenesis in Nicotiana. Phytomorphology. 19:389-404.

- **NORSTOG K.J., 1961.** The growth and differentiation of cultured barley embryos. *Amer. J. Bot.* 48:876-884.
- **NOVAK F.J., DOLEZELOVA., NESTICKY M., PIOVARCI A., 1983.** Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zea mays* L. *Maydica* XXVIII: 381-390.
- **NOZERAN R et BANCILHON L., 1972.** Les cultures *in vitro* en tant que technique pour l'approche de problèmes posés par l'amélioration des plantes. *Ann. Amélior. Plantes.* 22(2):167-185.
- **O'DONOUGHUE L.S et BENNET M.D., 1994.** Durum wheat production using wide-crossing. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 559-566.
- **OZIAS-AKINS, P et VASIL I.K., 1982.** Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescence of *Triticum aestivum* L. (wheat): evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma* 110:95 – 105.
- **PARIS D., RIETSEMA J., SATINA S et BLAKESLEE A.F., 1953.** Effect of amino acids, especially aspartic and glutamic acids and their amides on the growth of *Datura stramonium* embryo *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 39: 1205-1212.
- **PICARD E., 1984.** Contribution à l'étude de l'hérédité et de l'utilisation en sélection de l'haploïdisation par androgenèse *in vitro* chez une céréale autogame: *Triticum aestivum* L. Thèse Doc Sci : Univ Paris-Sud Orsay 292p.
- **PICARD, E., TOURAINE, P., AMBROISE, A. et DE BUYSER, J., 1998.** Chlorophyllian, anthocyanic and albinos *Triticum durum* plants derived from isolated microspore culture. Dans : *Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium*, Vol. 3, Slinkard, A.E. (ed.), Saskatoon, 2-7 août, : 44-46.
- **PIRI K., ANCEAU C., EL JAAFARI S., LEPOIVRE P., SEMAL J., 1994.** Sélection *in vitro* de plantes androgénétiques de blé tendre résistantes à la salinité. Ed. AUPELF- UREF. John Libbey. Paris.311-320.

- **RAGHAVAN V et TORREY J.G., 1963.** Growth and morphogenesis of globular and older embryos of *Capsella* in culture, *Amer.J.Bot.*50:540-551.
- **RAGHAVANT V et TORREY J.G., 1964.** Effects of certain substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of *Capsella* in culture, *Plant Physiol.* 39:691-699.
- **RAO I.M., ROCA W.M., AYARZA M.A., TABARES E., GARCIA R., 1992.** Somaclonal variation in plant adaptation to acid soil in the tropical forage legume *Stylosanthes guianensis*. *Plant and Soil.*146: 21-30.
- **REINERT J et BAJAJ Y., 1977.** Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, New York. 803p.
- **REINERT J., 1958.** Morphogenesis und ihre kontrolle an gewebeulturen aus caritten. *Naturwiss.*45:344-345.
- **REYNOLDS J et MURASHIGE T., 1979.** Asexual embryogenesis in callus cultures of date palms *in vitro* 15(5):385-387.
- **RIETSEMA J., SATINA S et BLAKELEE A.F., 1953.** The effect of sucrose on the growth of of *Datura stamonium* embryon *in vitro*. *Amer. J .Bot.* 40: 538-545.
- **RIJIVEN A.H.G.C., 1952.** *In vitro* studies on the embryo of *Capsella bursa-pastoris*. *Acta Bot.Neerl. L:* 157-200.
- **RUEB S., LENEMAN M., SCHILPEROORT R.A., HENSGENS L.A.M., 1993.** Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza satria* L.). *Plant cell tissue and organ culture.* 36: 259-264.

- **RUF R.H., ECKARD R.E & GIFFORD R.O., 1967.** Compounds of osmotic adjustment of plants to rapid changes in root medium osmotic pressure. Soil Sci. 104:159-162.
- **SAN NAEUM L.H., 1976.** Haploïdes d'*Hordum vulgare* L. par culture in vitro d'ovaires non fécondés. Ann. Amélior. Plantes. 26:751-754.
- **SCHAEFFER G.W., BAENZIGER P.S and WORLEY., 1979.** Haploid plant developpement from anthers and *in vitro* embryo culture of wheat. Crop Sci. 19 : 697-702.
- **SEARS R.D & DECKARD E.L., 1982.** Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. Crop Sci. 22:546-550.
- **SHAMA H.C., 1999.** Embryo rescue following with crosses. In: **HALL, R.D** (Eds), Methods in molecular biology: Plant cell culture protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 111: 239-307.
- **SHARP, W.R., SONDAHL, M., CALDAS, L.S., MARAFFA, S.B., 1980.** The physiology on *in vitro* assexual embryogenesis. Hortic., 2:268-310.
- **SHIMADA T., 1978.** Plant regeneration from the callus induced from wheat embryo. Jap. J. genet. 53:371-374.
- **SIBI M., 1974.** Création de variabilité par culture de tissus *in vitro* sur *Lactuca sativa* L. Thèse de spécialité. Univ Paris –Sud., 128p.
- **SIBI M., 1976.** Création de variabilité par culture de tissus *in vitro* chez *Lactuca sativa*. Thèse spèc Amélior PI :Univ Paris-Sud, Orsay, 142p.
- **SIBI M., 1981.** Hérité de variants épigéniques obtenus par culture des tissus in vitro chez les végétaux supérieurs. Thèse Doct ès Sci ; Univ Paris-Sud, Orsay, 280p.

- **SIHACHAKR D., CAVALCANTE-ALVES J.M., TIZROUTINE' S., ALLOT M MUSSIO I., SERVAIES A., NZOGNÉ D., DUCREUX G., 1994.** Embryogenèse somatique chez la patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) : Caractérisation et régénération des plantes. Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. 251-261.
- **SINGH B.D., KAO, K.N., MILLER R.A., 1975.** Karyotypic changes and selection pressure in *Haplopappus gracilis* suspension cultures. Canadian Journal of Genetics and Cytology.17:109-116.
- **SKIRVIN R.M., Mc PHEETERS K.D., NORTON M., 1994.** Sources and frequency of somaclonal variation. HortSci. 29 :1231-1237.
- **SKIRVIN R.M., JANICK J., 1976.** Tissus culture-induced variation in scented *Pelargonium* spp. J Amer Soc Hortic Sci; 101:281-290.
- **SKOOG F et MILLIER S., 1957.** La balance hormonale. Sympo. Sco. Exp. 9:118-131.
- **SKOOG F., ARMASTRONG D.J., CHERAYIL J.D., HAMPEL A.E., BOCK R.M., 1966.** Cytokinin activity: localization in transfer RNA preparations. Science. 154.
- **SMITH R.H., BHASKARAN S., MILLER F.R., 1985.** Screening for drought tolerance in *Sorghum* using cell culture. In Vitro Cell. Dev. Biol. 21:541-545.
- **STEWART F.E., 1958.** Growth and organized development of cultured cells, Amer. J. Bot. 45:709-713.
- **STREET H.E., 1977.** Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific Publications. 2ème édition.
- **SUN Z.X., ZHAO C.Z, ZHENG K.L, QI X.F, FU Y.P., 1983.** Somaclonal genetics of rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet : 67 : 67-73.

- **TAL M., 1983.** Selection for stress tolerance. In: **EVANS D.A., SHARP W.R., AMMIRATO P.V., YAMADA Y.,** (Eds). Handbook of plant cell culture. Technique for propagation and breeding. Macmillan, New York. 1: 461-488.

- **THOMAS M.J., MONNIER M., 1976.** Etude de l'évolution de l'ultrastructure des embryons immatures de *Capsella bursa-pastoris* Moench cultivés *in vitro*, C.R. Acad. Sc. Paris 283.

- **THORPE T.A., 1988.** *In vitro* somatic embryogenesis. Animal and plants sciences. In: Atlas of science.81-88.

- **TORRES K.C., 1989.** Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. (Eds), **CHAPMAN & HALL**, New York, USA. Pp 286.

- **TOURAEV, A., VICENTE, O. et HEBERLE-BORS E., 1997.** Induction of microspore embryogenesis by stress. Trend in Plant Sci., 2: 297-302.

- **UDVARDY J., SIVOK B., NEMET G., 1976.** Effect of naphtylacetic acid, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and 3,6-dichloro-o-anisic acid on nucleolytic enzymes in callus cultures from wheat root, Z. Pflanzenphysiol. 78:33-40.

- **VAN OVERBEEK J., CONKLIN M.E., BLAKESLEE A.B., 1941.** Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos, Science (USA). 94: 350-351.

- **VASIL V., LU C.Y., VASIL I.K., 1985.** Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.), Protoplasma.127: 1-8.
- **VASIL V; VASIL I.K., 1981.** Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum*, and *P. americanum* hybrid. Amer. J. Bot.68(6): 864-872.

- **VASQUEZ-TELLO A., ZUILY-FODIL Y., PHAM THI A.T., VIEIRA D.A SILVA J.B., 1990.** Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as

physiological tests for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. J Exp Bot 228: 827-832.

- **VEEN H., 1963.** The effects of various growth-regulators on embryo fact or necessary for the culture *in vitro*, Acta Bot. Neerl. 12:129-171.
- **VOLCANI Z., RIKER A.J ET HILDEBRANDT A.C., 1953.** Destruction of various tissues in culture by certain bacteria. Phytopatol., 43:92-94.
- **WANG, B.S.P; CHAREST, P.J ET DOWWNIE, B., 1994.** Conservation *ex situ* de pollen et de graines et culture *in vitro* de plantes ligneuses pérennes. FAO.Rom.75p.
- **WERNICKE W, BRETTELL R., 1980.** Somatic embryogenesis from *Sorghum bicolor* leaves, Nature 287:138-139.
- **WERNICKE., POTRYKUS., THOMAS., 1982.** Morphogenesis from cultured leaf tissue of *Sorghum bicolor*. The morphogenetic pathways, Protoplasma 111:53-62.
- **WETHERELL D.F et HALPERIN W., 1963.** Embryo derived from callus tissue cultures of the wild carrot, Nature 200:1336-1337.
- **YANG Y.M., HE D.D., SCOTT K.J., 1993.** Plant regenerating from protoplasts of durum wheat. Plant Cell. 12: 320-323.
- **YANIV Z & WERKER E., 1983.** Absorption and secretion of polyethylene glycol by Solanaceous plants. Journal of Experimental Botany, 34:1577-1584.
- **YENCHO G.C., COHEN M.B., BRYNE P.F., 2000.** Applications of tagging and mapping insect resistance loci in plants. Annu. Rev. Entomol. 45 : 393–422.
- **YURKOVA G.N., LEVENKO B.A & NOVOZHILOV O.V., 1981.** Induction of plant regeneration in wheat tissue culture. Biochem. Phisiol. Pft. 176:236-243.

- **YURKOVA G.N., LEVENKO B.A & NOVOZHILOV O.V., 1982.** Plant regeneration in wheat tissue culture. *Biochem. Physiol. Pfl.* 177:337-344.

- **ZDENKO REGEL., 1987.** Embryogenic callus induction and plant regeneration from cultured *Hordeum vulgare* mature embryos. 25(1):43-48.

- **ZHANG L.J & SEILLEUR P., 1987.** A simple and fast method to a stain high frequency of plant regeneration from mature and immature wheat embryos, 187-197.

- **ZHENG K.L, ZHOU Z.M, WANG G.L, LUO Y.K, XIONG Z.M., 1989.** Somatic cell culture of rice cultivars with different grain types: somaclonal variation in some grain and quality characters. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 18 : 8-201.

- **ZHU Z.Q., WANG J.J and SUN J.S., 1979.** The introduction of the albinos pollen plants and preliminary observation of their ploidy in *Triticum durum*. *Acta Bot Sin* 21:817-821.

- **ZID E., GRIGNON C., 1991.** Les tests de sélection précoce pour la résistance des plantes aux stress. Cas des stress salin et hydrique. In : **CHALBI N., DEMARLY Y.** (Eds) *l'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides.* Paris. AUPELF-UREF/Jonh Libbey Euritext: 91-108.

- **ZRYD J.P., 1988.** Culture de cellules, tissues et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques.120-134.

Liste des tableaux

Tableau : I-1: Evolution morphologique d'un embryon (Rijiven., 1952 ; Ragavan ; Torrey., 1963) -----	14
Tableau : I- 2: Les grandes étapes historiques de la culture d'embryons (Monnier., 1995) -	16
Tableau : I-2 : Niveaux relatifs généralement acceptés de variations somaclone dans la culture <i>in vitro</i> de matériel végétale (Wang et <i>al.</i> , 1994)- -----	26
Tableau : II-1 : Caractéristiques principales des variétés de blé tendre-----	28
Tableau : II-2 : Caractéristiques principales des variétés dur-----	29
Tableau : II-3 : Les différents types d'hormones de croissance et leurs solvants-----	32
Tableau:II-4 : Les différentes combinaisons hormonales additionnées pour l'induction de la callogenèse-----	34
Tableau : II-5 : Différentes hormones utilisées pour la régénération-----	42
Tableau : III-1: Les différentes tailles des embryons matures et immatures-----	45
Tableau III-2: Etendues des cals issus d'embryons matures après 60 jours de culture-----	64
Tableau III-3 : Etendues des cals issus d'embryons immatures après 60 jours de culture-----	65
Tableau: III-4 : Aspect superficiel des cals issus d'embryons matures et immatures-----	75
Tableau : III-5 : Taux de caulogenèse enregistré sur la totalité des cals-----	80
Tableau : III-6 : Longueurs des racines des plantules régénérées-----	83

LISTE DES FIGURES

Figure : I-1 : Evolution morphologique d'un embryon de capselle Ragavan et Torrey (1963) -----	12
Figure : I-2 : Embryons schématisés après 6, 8 et 16 heures de culture Monnier (1984) -----	19
Figure : III-1 : Durée moyenne entre l'inoculation et le gonflement du scutellum issus des embryons matures et immatures-----	47
Figure : III-2 : Durée moyenne entre l'inoculation et l'induction de cal issus des embryons matures et immatures-----	48
Figure : III-3 : Pourcentage d'induction de cals des 6 variétés de blé dérivés d'embryons matures----	50
Figure : III-4 : Pourcentage d'induction de cals des 6 variétés de blé dérivés d'embryons immatures-----	50
Figure : III-5 : Nombre d'embryons n'ayant pas induit de cals chez les embryons matures et immatures-----	51
Figure : III-6 : Surfaces moyennes des cals issus d'embryons matures et cultivés sur le milieu MS+10mg/l de 2.4-D après 15 et 60 jours de culture-----	54
Figure : III-7 : Cals issus de la variété Djenah Khetifa présentant les deux phénomènes : caulogénèse et callogénèse-----	58
Figure : III-8 : Surfaces moyennes des cals issus d'embryons matures et cultivés sur le milieu : MS + 2 mg/l de 2.4-D et le milieu : MS+ 2 mg/l de 2.4-D+ 1 mg/l d'AgNO ₃ après 15 jours de culture-----	58
Figure : III-9 : Surfaces moyennes des cals issus d'embryons immatures et cultivés sur les milieu MS + 2 mg/l de 2.4-D et le milieu MS+ 2 mg/l de 2.4-D+ 1 mg/l d'AgNO ₃ après 15 jours de culture---	59
Figure : III-10 : Surfaces moyenne des cals issus d'embryons matures et cultivés sur le milieu MS + 2 mg/l de 2.4-D et le milieu MS+ 2 mg/l de 2.4-D+ 1 mg/l d'AgNO ₃ après 60 jours de culture-----	59
Figure : III-11 : Surface moyenne des cals issus d'embryons immatures et cultivés sur le milieu MS + 2 mg/l de 2.4-D et le milieu MS+ 2 mg/l de 2.4-D+ 1 mg/l d'AgNO ₃ après 60 jours de culture -----	59
Figure : III-12 : Surface moyenne de la totalité des cals dérivés d'embryons matures et immatures--	60
Figure : III-13 : Taux de contamination enregistré chez les 6 variétés de blé des embryons matures-----	67

Figure : III-14 : Taux de contamination enregistré chez les 6 variétés de blé des embryons immatures-----	68
Figure : III-15 : Aspects morphologiques des cals dérivés d'embryons matures-----	69
Figure : III-16 : Aspects morphologiques des cals dérivés d'embryons immatures-----	69
Figure : III-17 : Cal cubique issu d'embryon mature de la variété Waha-----	70
Planche III-1 : Cals volumineux dérivés d'embryons matures et immatures et présentant une extrémité plus volumineuse que l'autre -----	71
Figure : III-18 : Cal en palme issu d'embryon immature de la variété Aïn Abid-----	72
Figure : III-19 : Cal en palme issu d'embryons matures de la variété Aïn Abid-----	72
Figure : III-20 : Cals embryogènes issus d'embryons matures de la variété Oued Zenati-----	74
Figure : III-21 : Taux de cals embryogènes enregistrés chez les embryons immatures après 3 mois de culture-----	74
Figure : III-22 : Taux de cals embryogènes chez les embryons matures après 3 mois de culture-----	74
Figure : III-23 : Effet du PEG sur les cals issus des embryons matures et immatures après 30 jours de culture-----	76
Figure : III-24 : Taux de cals indemnes issus des embryons matures et immatures après 30 jours de stress-----	76
Figure : III-25 : Cals jaunâtre et brun cultivés sur le milieu MS additionné à 10 mg/l de PEG-----	79
Figure : III-26 : Aspect morphologique des tiges des variétés Oued Zenati et Mahon Demias issus d'embryons immatures-----	81
Figure : III-27 : Développement de la partie aérienne sans la partie racinaire-----	81
Figure : III-28 : Cal volumineux embryogène présentant des zones méristématiques représentées par les flèches (1) et cals volumineux pâteux non embryogène (2)-----	82
Figure : III-29 : Formation de racines sur un cal stressé issu de la variété Djenah Khetifa d'embryon immature (la flèche démontre l'enroulement foliaire)-----	85
Figure : III-30 : Cal nécrosé issu de la variété Oued Zenati issu d'un embryon mature développant un cal embryogène-----	86
Figure:III-31 : Développement de 2 minuscules racines (représentées par les flèches) sur un cal issu de la variété Aïn Abid d'un embryon immature-----	86
Figure : III-32 : Prolifération cellulaire et développement racinaire sur cal nécrosé de la variété Waha des embryons immatures (1: Initiation racinaire, 2 : Callogenèse)-----	87

Annexes

Annexe 1 : Composition chimique du milieu de culture MS (Murashige et Skoog., 1962)

Constituants	Concentration des solutions mères	
Macroéléments	Mg/l	MI/l
NH ₄ NO ₃ KNO ₃ CaCL ₂ -2H ₂ O MgSO ₄ -7H ₂ O KH ₂ PO ₄	33000 38000 8800 7400 34000	100 ml de la solution mère des macro-éléments pour préparer 1 l de milieu de culture.
Microéléments	Mg/l	MI/l
MnSO ₄ -H ₂ O ZnSO ₄ -7H ₂ O H ₃ BO ₃ KI Na ₂ MOO ₄ -2H ₂ O CuSO ₄ -5H ₂ O COCL ₂ -6H ₂ O	2230 860 620 83 25 25 25	100 ml de la solution mère des micro-éléments pour préparer 1 l de milieu de culture.
Fer	Mg/l	MI/l
Na ₂ EDTA FeSO ₄ -7H ₂ O	3730 2780	100 ml de la solution mère de Fe-EDTA pour préparer 1l de milieu de
Acides aminés et vitamines	Mg/l	100 ml de la solution mère de Fe-EDTA pour préparer 1l de milieu de
Acides aminés et vitamines	Mg/l	10 ml de la solution mère des vitamines pour préparer 1l de milieu de culture.
Glycines Acide nicotinique Pyridoxine-HCL Thiamine-HCL		10 ml de la solution mère des acides aminés pour préparer 1l de milieu de culture.
Saccharose myoinositele Agar	30000 100 7000	

Annexe 2

1- Pourcentage d'induction des cals (%IC) défini comme suit :

$$\text{IC \%} = \frac{\text{Nombre d'embryons ayant formés des cals}}{\text{Nombre d'embryons inoculés}}$$

2- La surface des cals. Dale et Deambrogio., 1979 : deux diamètres sont mesurés pour chaque cals : le plus large (D1) et celui perpendiculaire (D2). La surface est déterminée comme suit :

$$\text{Surface de la cal en mm}^2 = \frac{D1 \times D2}{2} \times 3.14$$

Annexe 3

Temps minimal de stérilisation du milieu de culture Torres., 1989 et Anonyme., 1999.

Volume du milieu (ml)	Temps minimal de stérilisation (min)
20-50	15
75	20
250-500	25
1000	30
1500	35
2000	40

Annexe 4 :

Analyse de variance de la taille des cals issus d'embryons matures et cultivés sur 10 mg/l de 2.4-D, 2 mg/l de 2.4-D, 2 mg/l de 2.4-D + 1mg/l d'AgNO₃, après 15 jours de culture.

Variance	DDL	Test F
Var.Facteur 1 (Auxine)	2	32.31 ^{***}
Var.Facteur 2 (Variétés)	5	33.17 ^{***}
Var Inter F1-F2	10	5.44 ^{**}
Var. Résiduelle	162	
Var. Totale	179	
CV : 57.5%		

*** : Très hautement significatif

** : Hautement significatif

Annexe 5 :

Analyse de variance de la taille des cals issus d'embryons matures et cultivés sur 10 mg/l de 2.4-D, 2 mg/l de 2.4-D, 2 mg/l de 2.4-D + 1mg/l d'AgNO₃, après 60 jours de culture.

Variance	DDL	Test F
Var.Facteur 1(Auxine)	2	133.59 ^{***}
Var.Facteur 2(Variétés)	5	37.34 ^{***}
Var Inter F1-F2	10	9.13 ^{**}
Var. Résiduelle	162	
Var. Totale	197	
CV : 46%		

*** : Très hautement significatif

** : Hautement significatif

Annexe 6 :

Analyse de variance de la taille des cals issus d'embryons immatures et cultivés sur 2 mg/l de 2.4-D + 1mg/l d'AgNO₃, 2 mg/l de 2.4-D après 15 jours de culture.

Variance	DDL	Test F
Var.Facteur 1(Auxine)	1	4.57**
Var.Facteur 2(Variétés)	5	22.11***
Var Inter F1-F2	5	1.22
Var. Résiduelle	108	
Var. Totale	119	
CV : 54.6%		

*** : Très hautement significatif

** : Hautement significatif

Annexe 7 :

Analyse de variance de la taille des cals issus d'embryons immatures et cultivés sur 2 mg/l de 2.4-D + 1mg/l d'AgNO₃, 2 mg/l de 2.4-D après 60 jours de culture.

Variance	DDL	Test F
Var.Facteur 1(Auxine)	1	28.89***
Var.Facteur 2(Variétés)	5	47.69***
Var Inter F1-F2	5	1.65
Var. Résiduelle	108	
Var.Totale	119	
CV : 42.8%		

*** : Très hautement significatif

Annexe 8 :

Analyse de variance de la taille des cals issus d'embryons matures et immatures et cultivés sur le milieu MS additionné à 2mg/l de 2.4-D +1mg/l d'AgNO₃ , 2mg/l de 2.4-D après 15 jours de culture.

Variance	DDL	Test F
Var.Facteur 1 (Embryon)	1	88.59 ^{***}
Var.Facteur 2 (Variétés)	5	24.72 ^{***}
Var.Facteur 3 (Auxine)	1	4.64 ^{**}
Var.Inter F1-F2	5	6.42 ^{**}
Var Inter F1-F3	1	1.95
Var Inter F2-F3	5	1.17
Var Inter F1-F2-F3	5	0.61
Var. Résiduelle	216	
Var. Totale	239	
CV : 67.2%		

*** : Très hautement significatif

** : Hautement significatif

Annexe 9 :

Analyse de variance de la taille des cals issus embryons matures et immatures cultivés sur le milieu MS additionné à 2mg/l de 2.4-D +1mg/l d'AgNO₃ , 2mg/l de 2.4-D après 60 jours de culture.

Variance	DDL	Test F
Var.Facteur 1 (Embryon)	1	287.10 ^{***}
Var.Facteur 2 (Variétés)	5	56.43 ^{***}
Var.Facteur 3 (Auxine)	1	31.86 ^{***}
Var.Inter F1-F2	5	3.25 ^{**}
Var Inter F1-F3	1	7.02 ^{**}
Var Inter F2-F3	5	1.73
Var Inter F1-F2-F3	5	0.74
Var. Résiduelle	216	
Var. Totale	239	
CV : 41.1%		

*** : Très hautement significatif

** : Hautement significatif

* : Significative.

Annexe : 10 : Matrice des corrélations des embryons mature :

	Auxines	Variétés	Taille 15 jours	Taille 60 jours
Hormone	1			
Variété	0.155	1		
Taille 15 jours	0.104	0.419	1	
Taille 60 jours	0.724	0.253	0.637	1

Annexe : 11 : Matrice des corrélations des embryons immature :

	Auxines	Variétés	Taille 15 jours	Taille 60 jours
Hormone	1			
Variété	0.149	1		
Taille 15 jours	0.030	0.311	1	
Taille 60 jours	0.511	0.201	0.600	1

Annexe : 12 : Matrice des corrélations des embryons matures et immatures:

	embryon	variété	hormone	taille 15 jours	taille 60 jours
embryon	1.000				
variété	0.000	1.000			
hormone	0.000	0.000	1.000		
Taille 15 jours	0.431	0.210	0.099	1.000	
Taille 60 jours	0.580	0.158	0.193	0.572	1.000

Annexe : 13 : Effet variétal sur la surface des cals :

Variétés	Moyennes	Groupes homogènes
WH	140.48	A
DK	139.25	
MD	116.86	B
OZ	94.47	C
MX	89.06	
AA	38.98	D

Annexe : 14 : Interaction : Age de l'embryons X Variétés

Type d'embryon	Variétés	Moyennes (mm ²)	Groupes homogènes
Mature	WH	182.23	A
Mature	DK	166.25	
Mature	MD	154.09	B
Mature	OZ	126.45	
Mature	MX	126.23	
Immature	WH	111.67	C
Immature	DK	98.52	
Immature	MD	69.32	D
Immature	OZ	62.44	
Mature	AA	61.25	
Immature	MX	51.89	
Immature	AA	26.93	
			E

Annexe : 15 : Interaction Age de l'embryons X Auxines

Type d'embryon	Moyennes (mm ²)	2.4-D ± AgNO ₃	Groupes homogènes
Mature	151.02	2.4-D + AgNO ₃	A
Mature	121.12	2.4-D - AgNO ₃	B
Immature	74.26	2.4-D + AgNO ₃	C
Immature	64.51	2.4-D - AgNO ₃	D

Résumés

الملخص

سنة أنواع من القمح سليلية من أجنة بالغة قد زرعت على الوسط MS مدعم بتركيزين من الـ 2.4-D لغرض إحداث الكنب. أفضل النتائج المستخلقة تستعمل لزراعة الأجنة الغير الناضجة. اخدت مقاييس مختلفة بعين الاعتبار: رد فعل الجنين، مدة تحريض الكنب، مساحة الكنب، نسبة الكنب الحاملة للأجنة و نسبة التكنب، طبق تأثير انتقائي عن طريق الـ PEG على هذه الكنب مدة 30 يوم، بعدها تنقل كل الكنب على وسط التجديد. تحصلنا على أربعة أنواع من الكنب. الهرمونات ضرورية للتشكل الجذري (BAP+AIA) وكذا لتشكيل الأوراق ولكن مكبتة لنمو الكنب الحاملة للأجنة. الأجنة الغير البالغة تجدد اكر عدد من الشتلات على عكس الأجنة البالغة المنحدرة من القمح الصلب و المزروعة على الوسط المدعم بالـ $2.4-D \pm AgNO_3$ و التي استجابت بصفة جيدة للتكنب. الـ AIB+ KIN ساهم في استطالة الأوراق فقط. الشتلات الناشئة تدل على وجود تباين تشكيلي من حيث: الطول، اتجاه الأوراق، هذا التباين الوراثي قد تبين عند طور الكنب من خلال نمو الكنب، المظهر المر فولوجي، و كذا من خلال رد فعل الكنب تحت تأثير الـ PEG. نجد هذه الاختلافات عند النوع الواحد من القمح و السليل من نفس نوع الجنين. اظهر القمح الصلب اكبر تحمل مقارنة مع القمح اللين، أما بالنسبة للتجديد فقد تظهر الأجنة الغير البالغة كجهاز مناسب للتجديد وكذا للحصول على نباتات مطيقة للعجز المائي.

الكلمات المفتاحية: زرع الأجنة البالغة و الغير بالغة، *Triticum durum* ، *Triticum aestivum* ، هرمونات النمو، التكنب، PEG ، التجديد، التباين الوراثي.

Abstract

Six varieties of wheat resulting from mature embryos were cultivated on MS medium added at 2 different concentrations of 2.4-D in order to induce the callogenesis. The best results are retained for the culture of immature embryos. Differing parameters were considered: reaction of the scutellum, time of callus induction, area of calli, rate of callogenesis. A selective pressure (PEG) was applied to these calli during 30 days. All calli were transferred on to regenerated medium. 4 types of calli were obtained from mature and immature embryos. The growth regulators are necessary for the development of roots (AIA+BAP) but inhibiting for the embryogenic calli. The immature embryos regenerate the most plants, however the mature embryos cultivated on the 2.4-D+AgNO₃ have the best performances of callogenesis. The regenerated seedlings present morphological variations relating to the size and the orientation of the foliage, and the vegetative cycle. These morphological variations appear since the stage callus through diversity of the growth of the calli, the morphological appearance, as well as the various answers of the cellular lines subjected to the PEG. We find these variations in the same genotype resulting from the same type of embryo. The durum wheat was shown more tolerant than the bread wheat. As for regeneration, the immature embryos seem made up the ideal explants for regeneration like for obtaining tolerant plants.

Key words: Mature and immature embryo culture, *Triticum durum*, *Triticum aestivum*, Growth regulators, Callogenesis, PEG, Regeneration, Somaclonal variation.

Nom : KACEM.	Date de soutenance :
Prénom : Nadia Sandra.	
TITRE : Embryogenèse somatique et variation somaclonale chez le blé dur et tendre (culture d'embryons matures et immatures).	
NATURE DU DIPLOME : Magistère en biotechnologies végétales.	
Résumé :	
<p>Six variétés de blé issues d'embryons matures ont été cultivées sur le milieu MS additionnés à deux différentes concentrations de 2.4-D afin d'induire la callogenèse. Les meilleurs résultats sont retenus pour la culture d'embryons immatures. Différents paramètres sont pris en considération : réaction du scutellum, temps d'induction de cals, nombres de cals embryogènes, surface des cals et taux de callogenèse. Une pression sélective a été appliquée sur ces cals au PEG pendant 30 jours. La totalité des cals est transférée par la suite sur le milieu de régénération. Pour la phase callogène 4 types de cals sont obtenus chez les embryons matures et immatures. Les régulateurs de croissance sont nécessaires pour le développement racinaire (AIA et BAP) ainsi que pour le développement foliaire (AIB+KIN) mais inhibiteur pour la formation de cal embryogène. Les embryons immatures régénèrent le plus de plantes, cependant les embryons matures de blé dur cultivés sur le 2.4D+l'AgNO₃ présentent les meilleures performances callogènes. Les plantules régénérées présentent des variations morphologiques relatives à la taille et à l'orientation du feuillage, ainsi qu'au cycle végétatif. La variation somaclonale se manifeste dès le stade cal à travers la croissance hétérogène des cals, l'aspect morphologique et les différentes réponses des lignées cellulaires soumises au PEG. On retrouve ces variations chez un même génotype dérivé d'un même type d'embryon. Le blé dur s'est montré plus tolérant que le blé tendre. Quant à la régénération, les embryons immatures semblent constitués les explants idéaux pour la régénération ainsi que pour l'obtention de plantes tolérantes.</p>	
Mots clés : Culture d'embryon mature et immature, <i>Triticum durum</i>, <i>Triticum aestivum</i>, Hormones de croissances, Callogenèse, PEG, Régénération, Variation somaclonale.	
Laboratoire de recherche : Biotechnologie végétale, Biochimie Génétique. CONSTANTINE	
Rapporteur :	M. DJEKOUN. A
Président du jury:	Mlle. YKHLEF. N
Examineur :	M.BENBELKACEM.A
Examineur:	M.KARA. Y