

Creation of doubled haploid lines of barley (*Hordeum vulgare*) drought tolerant through anther culture.

Création de lignées haploïdes doublées d'orge (*Hordeum vulgare*) tolérantes à la sécheresse par culture d'anthères.



W. BRAHMI¹, A. SEHLI¹, A. LTIFI¹, I. NEFZI¹

¹ Laboratoire de biotechnologie appliquée à l'agriculture, Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT)

*Corresponding author: brahmiwejden90@outlook.fr

Abstract – In Tunisia, the climate is characterized by the irregularity of rainfall in time and space with a tendency towards more aridity, from which arises the constraint of drought. The latter is considered a limiting factor in the production of barley (*Hordeum vulgare* L.) which is becoming more and more unstable. An effective and sustainable means of combating this constraint would be the creation of cultivars with greater tolerance to drought.

The use of haploids is very beneficial in the creation of cereals. Thus, the technique for obtaining haploids by anther culture consists in orienting the gametophytic program of the microspores towards a sporophytic program. In this context, the objective of the study is to create drought tolerant, barley doubled haploid lines by anther culture. This work presents the androgenic response of ten barley varieties (*Hordeum vulgare* L.): Rihamne, Manel, Momtez, Faiz, Roho, Tej, Kunouz, Lamsi, Ardhaoui and Safra originating from Tunisia. Androgenic fitness was assessed in parents and their hybrids (F1). The stage of culture of the anthers was determined on the basis of cytological criteria. The results presented in this study show a variability in the response to *in vitro* androgenesis of parental genotypes and their hybrids. Genotypic variability was observed in embryo induction parameters and regeneration of green plants. A high albinism rate that may exceed 60% has been observed in parents and hybrids. This rate of albinism may be due to several environmental and genetic factors. The systematic control of the ploidy level in all chlorophyllous plants shows that the majority of regenerated plants are diploid. The weak anther responses to *in vitro* androgenesis observed in our study may be explained, in part, by the growing conditions of open-field mother plants where plants are exposed to unsuitable growing conditions. Admittedly, the plants have been exposed to stress that would have caused morphological, physiological and molecular changes in the anther that would have reduced their androgenic response *in vitro*.

Keywords: Barley, drought, anther culture, albinism, chlorophyll plants.

Résumé - En Tunisie, le climat est caractérisé par l'irrégularité de la pluviosité dans le temps et dans l'espace avec une tendance vers plus d'aridité, d'où se pose la contrainte de la sécheresse. Cette dernière est considérée comme un facteur limitant de la production de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) qui devient de plus en plus instable. Un moyen de lutte efficace et durable contre cette contrainte serait la création de cultivars offrant une plus grande tolérance à la sécheresse. L'utilisation des haploïdes intervient très avantageusement dans la création variétale des céréales. Ainsi, la technique d'obtention des haploïdes par culture d'anthère consiste à orienter le programme gamétophytique des microspores vers un programme sporophytique. Dans ce cadre, l'étude a pour objectif la création de lignées haploïdes doublées d'orge tolérantes à la sécheresse par culture d'anthères. Ce travail présente la réponse androgénique de dix variétés d'orge (*Hordeum vulgare* L.) : Rihamne, Manel, Momtez, Faiz, Roho, Tej, Kounouz, Lamsi, Ardhaoui et Safra originaires de la Tunisie. L'aptitude androgénique a été évaluée chez les parents et leurs hybrides (F1). Le stade de mise en culture des anthères a été déterminé sur la

base de critères cytologiques. Les résultats présentés dans cette étude montrent une variabilité de la réponse à l'androgénèse *in vitro* des génotypes parentaux et leurs hybrides. La variabilité génotypique a été observée dans les paramètres d'induction des embryons et dans la régénération des plantes vertes. Un taux d'albinisme élevé qui peut dépasser 60% a été observé chez les parents et les hybrides. Ce taux d'albinisme peut être dû à plusieurs facteurs de nature environnementale et génétique. Le contrôle systématique du niveau de ploïdie chez toutes les plantes chlorophylliennes permet de constater que la majorité des plantes régénérées sont diploïdes. Les faibles réponses des anthères à l'androgénèse *in vitro* observées dans notre étude peuvent être expliquées, en partie, par les conditions de culture de plantes mères en plein champ où les plantes sont exposées à des conditions de culture qui ne sont pas optimales. Certes, les plantes ont été exposées à des stress qui auraient provoqué au niveau des anthères des changements morphologiques, physiologiques et moléculaires qui auraient réduit leur réponse androgénique *in vitro*.

Mots clés : Orge, sécheresse, culture d'anthères, albinisme, plantes chlorophylliennes.

1. Introduction

Les céréales constituent de loin la ressource alimentaire la plus importante au monde à la fois pour la consommation humaine et pour l'alimentation du bétail. L'importance de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) n'a cessé de croître au cours de la dernière décennie tant sur le plan national que sur le plan mondial il représente de nos jours la quatrième céréale produite au monde après le blé le riz et le maïs avec une production annuelle de 137MT (FAO,2007) . En Tunisie les superficies annuelles moyennes emblavées d'orge oscillent entre 400 000 et 600 000 ha (D.G.P.A, 2002-2008). La production en orge (*Hordeum vulgare* L.) occupe la 2ème place après le blé dur. Les rendements sont très variables et ils oscillent entre 2,3 et 15,6 qx/ha (D.G.P.A, 2002-2008). Toutefois, cette culture se heurte à un certain nombre de contraintes notamment l'instabilité de la production liée aux conditions climatiques engendrée par deux stress majeurs biotique et abiotique. Les stress abiotiques qui caractérisent les régions arides et semi arides sont présentés essentiellement par la sécheresse. Un moyen de lutte efficace et durable contre cette contrainte serait la création de nouveaux cultivars. La recherche de variétés tolérantes à la sécheresse, par des méthodes classiques, peut nécessiter plusieurs cycles de sélection, chacun débutant avec un croisement et se terminant avec la sélection des descendants les plus performants, c'est un processus long et onéreux (Baenziger *et al*, 2006). Partant de ce constat, on peut parler d'une méthode qui permet de réduire de deux à trois ans la durée d'un cycle de sélection et obtenir des lignées homozygotes c'est l'haplo diploïdisation, c'est une méthode utilisée pour fixer plus rapidement le matériel génétique en cours de sélection, elle repose sur l'obtention de plantes haploïdes à partir des organes mâles ou femelles puis sur le doublement du stock chromosomique. Il existe plusieurs techniques permettant de produire des haploïdes doublés chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.) (Pickering,1992). Dans notre étude nous avons utilisé la technique de culture d'anthères. D'après Collins (1977) les principaux paramètres susceptibles d'influer sur la production de plantes haploïdes en culture d'anthères sont les conditions de culture des plantes mères, le génotype, le stade cytologique des microspores, l'environnement de culture des anthères et la composition des milieux de culture (le PH, le rapport auxine/cytokinine, les éléments nutritifs).

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est représenté par dix génotypes d'orge (*Hordeum vulgare* L.) améliorés et locaux : Rihane, Manel, Momtez, Faiz, Roho, Tej, Kounouz, Lamsi, Ardhaoui et Safra, originaires de la Tunisie.

2.2. Dispositif expérimental

Les caryopses des différents cultivars parentaux et hybrides sont semés en plein champ à l'Institut National de Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT). Les hybrides F1 sont obtenus par un croisement entre les deux variétés Ardhaoui et Safra caractérisées par leur tolérance à la sécheresse avec les autres génotypes d'orge (*Hordeum vulgare* L.).

2.2.1. Prélèvement des épis

Le stade de mise en culture des anthères a été déterminé sur la base de critères cytologiques.

2.2.2. Critères cytologiques

La réponse des anthères à l'induction d'embryons et à la régénération de plantes est fortement liée au choix des microspores au stade uni nucléé médian. L'identification de ce stade se fait par l'observation microscopique des anthères prélevées sur des fleurs situées au centre de chaque épi et posés entre lame et lamelle avec quelques gouttes de carmin acétique 0,5%.

Seuls les épis qui renfermaient des microspores au stade uninuclée median (Figure 1) ont été retenus pour la mise en incubation de leurs anthères.

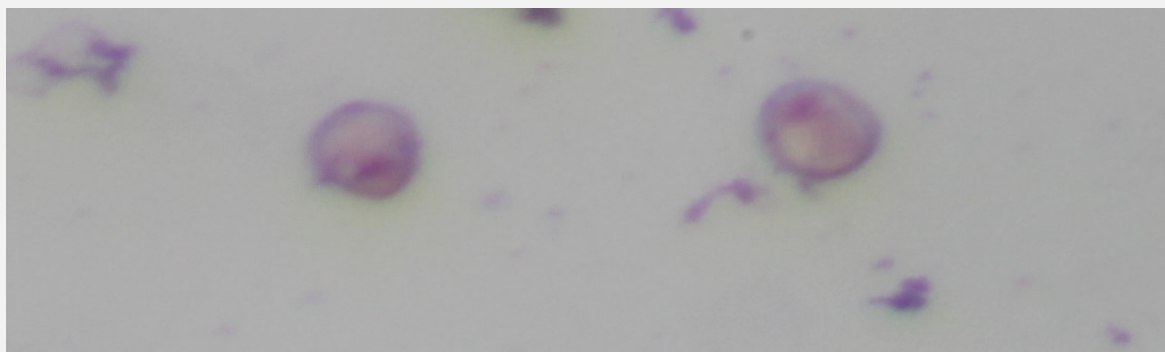


Figure 1. Microspores au stade uninucléé median

2.2.3. Prétraitement des épis au froid

Les épis sont mis dans des boîtes en verre de 15cm de diamètre avec une petite boîte contenant de l'eau afin de garder une certaine humidité, les boîtes sont fermées avec de para-film et maintenues dans un réfrigérateur à 4°C pendant deux semaines.

2.2.4. Mise en culture d'anthères *in vitro*

Les épis ont été d'abord désinfectés par l'hypochlorite de sodium pendant une période de 15 à 20 minutes, puis rincés 3 fois à l'eau distillé stérile. Après l'enlèvement des glumes et glumelles, les anthères de chaque épi sont déposées dans des boîtes de pétri à raison d'un épi par boîte, à la surface du milieu d'induction. Ce milieu permet l'induction des divisions des microspores aboutissant ainsi à la formation des embryons. Ce processus se déroule sous hotte à flux laminaire pour conserver les conditions aseptiques. Les boîtes sont mises pendant quatre semaines à l'obscurité dans un incubateur jusqu'à l'apparition de structures embryogènes (Figure 2). la composition du milieu d'induction est donnée dans le tableau 1. Après une trentaine de jours d'incubation les embryons formés sont repiqués sur un milieu de régénération puis mises en incubation en chambre de culture à 25°C (Figure 2). La composition du milieu de régénération est donnée dans le tableau 1.

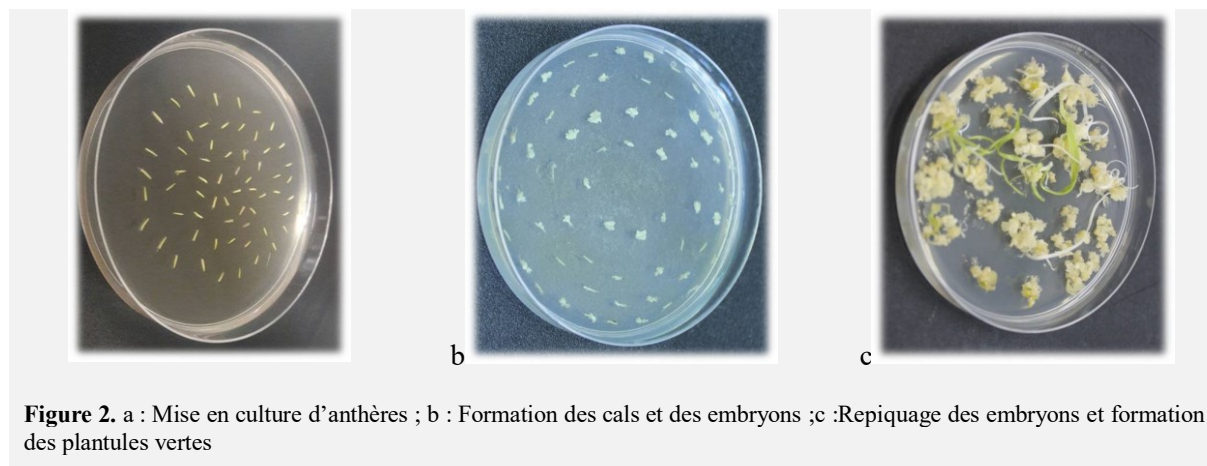


Figure 2. a : Mise en culture d'anthères ; b : Formation des cals et des embryons ; c : Repiquage des embryons et formation des plantules vertes

Tableau 1. Composition du milieu d'induction (BAC3) et de régénération

Composition	Milieu de régénération	Milieu d'induction
Macroéléments	KNO ₃ (2600 mg/l) NH ₄ NO ₃ (200 mg/l) NH ₄ SO ₄ (400 mg/l) KH ₂ PO ₄ (170 mg/l) NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (150 mg/l) CaCL ₂ 2H ₂ O (600 mg/l) MgSO ₄ 7H ₂ O (300 mg/l)	
Microéléments	HBO ₃ (5 mg/l) MnSO ₄ H ₂ O (5 mg/l) ZnSO ₄ 7H ₂ O (2 mg/l) KI (0,8 mg/l) Na ₂ MOO ₄ 2H ₂ O (0,25 mg/l) CuSO ₄ 5H ₂ O (0,025 mg/l) CoCL ₂ 6H ₂ O (0,025 mg/l) KHCO ₃ (50mg/l) AgNO ₃ (10mg/l)	
Vitamines	Myo-inositol (2000 mg/l) Pyridoxine HCL(0,5 mg/l) Thiamine HCL (1 mg/l) Acide nocotinique (0,5 mg/l) Acide axorbique (1 mg/l) Hydrolysate de caséine (300mg/l)	
Acide aminés	NAA (2mg/l) BAP (1mg/l)	
Régulateurs de croissance	Acide critique (10mg/l) Acide pyruvique (10mg/l)	
Acides organique	Maltose (60000 mg/l)	Saccharose (30000 mg/l)
Sucres	Fer (40mg/l) Agar (8000mg/l)	
Agent gélifiant	PH (6,2)	

2.2.5. Acclimatation

Les plantules chlorophylliennes enracinées, présentant des tiges de 3 à 5 cm et un enracinement, ont été transférées dans des petits pots et placées dans un incubateur à la lumière et à 25°C.

3. Résultats

3.1. Capacité d'induction d'embryoïdes androgéniques

Environ 1000 anthères par génotype d'orge correspondant à 11110 anthères au total ont été mises en culture sur un milieu d'induction BAC3. L'observation de quelques anthères prélevées de chaque épi a montré que la majorité des microspores était au stade uninucléé median. Les premières divisions cellulaires ont été observées au microscope après 5 à 7 jours de la mise en culture des anthères sous forme de cellules en divisions ou un amas de cellules regroupées qui vont se multiplier jusqu'à la formation des structures embryonnaires. A la fin de l'induction on obtient deux types de structures : des embryoïdes et des callosités.

4711 anthères appartenant aux cultivars parentaux ont été mises en culture sur le milieu d'induction BAC3, parmi les dix cultivars utilisés, quatre ont donné des structures embryogènes qui sont : Manel, Montez, Faiz et Lamsi (Figure 3).

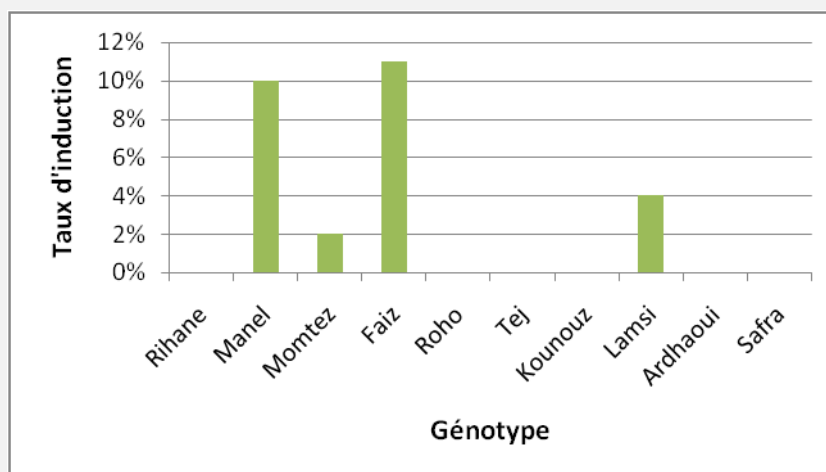


Figure 3. Taux d'induction d'embryoides androgéniques

Pour les hybrides 6399 anthères ont été mises en culture, tous les croisements ont présenté des structures embryogéniques. L'hybride le plus performant est Roho*Safra avec 26%.

3.2. Capacité de régénération des embryons

485 embryons formés sur le milieu d'induction ont été transférés sur le milieu de régénération à raison de 10 structures par boîte, où ils poursuivent leur développement.

A la fin de la régénération nous avons obtenu 140 plantules, il est important de signaler que le taux d'albinisme observé est remarquable, il est de l'ordre de 70,93%.

L'albinisme peut être le résultat de la combinaison de plusieurs facteurs tels que l'effet du génotype et les conditions de culture des plantes et d'incubation.

La régénération de plantules est observée chez les cultivars parentaux : Manel, Lamsi et Faiz. Manel est le cultivar qui a pu donner le meilleur taux de régénération.

Les plantes chlorophylliennes sont observées chez les cultivars parentaux Faiz et Lamsi avec un taux respectif de 10% et 6.55%(Figure 4).

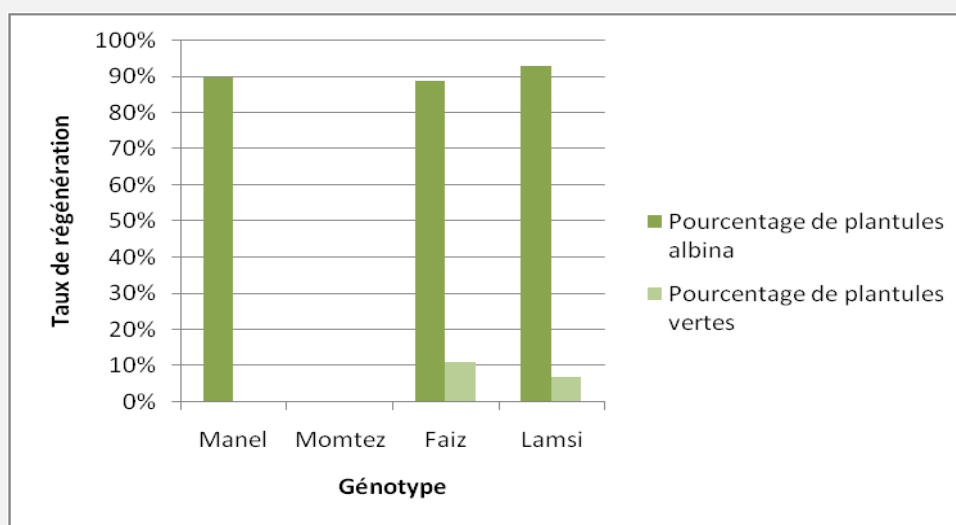


Figure 4. Taux de régénération de plantes à partir des variétés parentales

La régénération de plantules a été observée chez tous les cultivars hybrides qui ont donné des structures embryonnaires.

Comme l'illustre la figure 5 les hybrides Roho*Ardhaoui, Momtez*Safra, Kounouz*Safra, Kounouz*Ardhaoui et Roho*Safra possèdent un taux de régénération de plantules vertes qui varie respectivement entre 50%,33%,29%,25% et 9%.

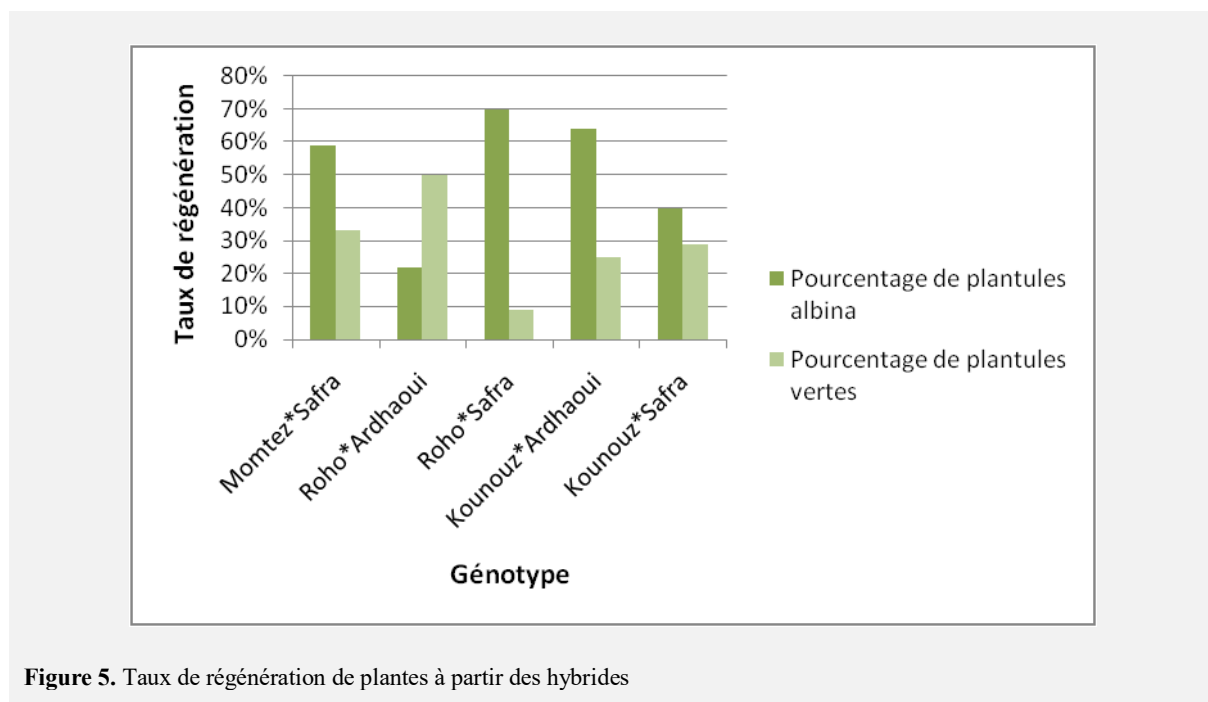


Figure 5. Taux de régénération de plantes à partir des hybrides

4. Conclusion

Les résultats présentés dans cette étude montrent que la réponse des génotypes parentaux et hybrides à l'ensemble des paramètres androgéniques est variable pour la production des embryons et la production de plantes vertes.

La formation de structures embryogènes, et le potentiel de régénération dans la culture d'anthers sont contrôlés génétiquement (Jacquard et al ,2006). En effet plusieurs travaux sur la régénération des haploïdes présentent une variabilité génétique de la réponse à l'androgénèse, telle que les travaux de Forough-Wehr et Friedt sur soixante hybrides d'orge. Le génotype reste un facteur capital pour l'induction des embryons et la régénération de plantes chlorophylliennes (Chlyah et al ,2001).

Des génotypes restent récalcitrants à l'androgénèse et ne présentent aucun signe d'évolution des microspores, d'où la réponse à l'androgénèse pour l'orge est connue pour être fortement dépendante du génotype et influencer par l'enjeu de nombreux facteurs environnementaux (Ferrie et al, 2000).

Il est important de signaler que le taux d'albinisme observé est remarquable tant chez les parents que chez les hybrides, ce taux d'albinisme peut être dû à plusieurs facteurs de nature environnementaux tels que la durée de séjours au froid des épis. Les facteurs génétiques jouent aussi leur rôle pour induire l'albinisme puisque les cellules des plantes albina contiennent des plastes auxquels il manque certaines des séquences de leur génome (Ellis et Day,1986).

Il est clair que l'aptitude à l'androgénèse chez l'orge est sous la dépendance de plusieurs facteurs environnementaux allant des conditions de culture des plantes mères aux conditions de mises en incubation des anthers jusqu'à la production de plantules vertes.

Les faibles réponses des anthers observées dans notre étude peuvent être expliquées par les conditions de culture de plantes mères en plein champ et donc sous des conditions climatiques naturelles et en absence de fertilisants et pesticides. Certes, les stress peuvent se traduire par des changements morphologiques, physiologiques et moléculaires qui baissent leur réponse en culture in vitro.

5. Références

- Baenziger, P.S,W.K,Rusell,G.L and B.T** (2006) Improving lives, 50 years of crop breeding,genetics and cytology, 46, PP.2230-2244.
- Collins G. B** (1977) Production and utilization of anther-derived haploids in crop science, 17,583-586.
- Chlyah H, Cherkaoui S, Saidi N, Lamsaouri O, Mdarhi-Alaoui M, Chlyah O, Benkirane H, Amail O, Chlyah A.B** (2001) Production d'haploïdes chez le blé dur et sélection en milieu salin.
- Ellis, T.H.N et Day A** (1986) A hair pin plastid genome in barley. European Molecular Biology Organization Journal, 5,PP.2769-2774.
- FAO** (2007) Cereal breeding takes a walk on the wild side. Trends in Genetics vol.24,n°1.
- Ferrie, A.M.R, Palmer C.E et Keller W.A** (1995) Haploid embryogenesis. In Thrope. T.A,*In vitro* Embryogenesis in plants,PP.309-344.
- Foroughi-Wehr B & W. Friedt** (1984) Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant *Hordeum vulgare* lines by anther culture. Theor. Appl.Gen., 67, 377-382.
- Jacquard C, R Asakaviciute, A.M Hamalian, R.S Sangwan, P Devaux & C Clement** (2006) Barley anther culture: effects of annual cycle and spike positionon microspore embryogenesis and albinism. PlantCell Rep., 25, 375-381.
- Ministère de l'Agriculture, DGPA** (2002-2008) Récolte céréalière d'après l'enquête par mesure objective.
- Pickering, R.A** (1992) Haploid production, approaches and use in plant breeding. Shwery, A.R,Barley, Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology ,P.R. International,Walling ford, U.K,PP.519-547.