

REGENERATION D'EMBRYONS ISSUS DE CROISEMENT INTERSPECIFIQUE BLE DUR (*Triticum durum* Desf.) × *Aegilops geniculata* Roth.: EFFET DES REGULATEURS DE CROISSANCE

Reçu le 10-10-2006 – Accepté le 10-04-2007

Résumé

L'amélioration des plantes consiste à créer une variabilité génétique nouvelle, puis sélectionner et fixer, parmi cette diversité, les génotypes intéressants. Pour répondre à cet objectif, les formes sauvages constituent des ressources importantes de gènes utiles pour l'adaptation des plantes cultivées aux contraintes environnementales. Dans cette étude et dans le but de générer de nouvelles populations de blé dur dérivées d'hybridation interspécifique, deux variétés (*Triticum turgidum* L. var. *durum* Desf.), cultivées en Algérie mais d'origine différente, ont été pollinisées par l'espèce sauvage *Aegilops geniculata* Roth. Pour surmonter l'incompatibilité entre espèces et augmenter le taux d'embryons interspécifiques et la production de plante verte, quatre traitements ont été combinés entre l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et l'acide gibbérellique (GA₃). Les résultats obtenus montrent que les taux de nouaison et de fertilisation des embryons sont significativement différents pour les différents traitements. De même, la régénération des plantes hybrides paraît très variable. De plus, le croisement du blé dur semble assez favorable avec le géniteur sauvage *Ae. geniculata* et les meilleurs traitements utilisés sont de deux pulvérisations de GA₃ sur les épis du blé, 8 h après la pollinisation et 32 h plus tard, avec une seule application de 2,4-D, 24 h avant la pollinisation. Par ailleurs, les pertes à la germination observées sont dues essentiellement, aux embryons anormaux à tailles réduites, l'étude cytologique montre que les plantes hybrides (F1) ont 28 chromosomes (ABUM) et en fin l'analyse du polymorphisme des gluténines des graines produites par électrophorèse a permis de détecter l'existence de nouvelles bandes chez l'hybride H1 comparé aux parents et à l'hybride H2.

Mots clés: croisement, blé dur, *Aegilops geniculata*, traitements, régulateur, croissance, pré / post-pollinisation.

Abstract

The loss of diversity, in particular in the genetic pools of the crop plants is a real threat everywhere where agriculture evolves/moves quickly and where the man applies more and more the modern methods of selection. To answer this threat, the wild forms constitute significant gene resources useful for the adaptation of the crop plants for the environmental constraints. In this study and an aim of generating new durum wheat populations derived from interspecific hybridization, two varieties of durum wheat (*Triticum turgidum* L. Var. *durum* Desf.), cultivated in Algeria but of different origin, was pollinated by *Aegilops geniculata* Roth. To overcome the incompatibility between species and to increase the interspecific rate of embryos and the production of house plant, four types of treatments were combined between acid 2,4- dichlorophenoxyacetic (2,4-D) and of the acid gibberellic (GA₃). The results obtained show that the rate of nouaison and the rate of fertilization of the embryos are significantly different for the various treatments. In the same way the regeneration of the hybrid plants appears very variable. One constant in this study, that the crossing of durum wheat seems rather favorable with the wild parent *Ae. geniculata* and that the best treatments used are of two GA₃ pulverizations on ears of corn, 8 H after pollination and 32 H later, with only one application of 2,4-D, 24 H before pollination.

Keywords: crossing, wheat durum, *Aegilops geniculata*, treatments, regulator, growth, pre / post-pollination.

N. YKHLEF
K. KELLOU
A. DJEKOUN

Laboratoire de
Génétique,
Biochimie et
Biotechnologies
Végétales.
Département SNV
Faculté des
Sciences de la
nature. Université
Mentouri
Constantine
ALGERIE.

ملخص

يهدف تحسين النبات إلى خلق تنوعية وراثية جديدة ثم إنتخاب و تثبيت الأفراد المهمة ضمن هذا التنوع بغية تحقيق هذا الهدف. تمثل الأشكال البرية موارد هامة للمورثات الخاصة لتأقلم النباتات المزروعة مع الظروف المحيطة غير الملائمة. من خلال هذه الدراسة و بغرض إكثار عشائر جديدة من نبات القمح الصلب المنحدرة من عمليات تهجين *Triticum turgidum* L. var *durum* Desf المزروعة بالجزائر و المختلفة الأصول بواسطة النوع البري الوالد *Aegilops geniculata* Roth. و للتغلب على تعارض التطابق بين الأنواع و رفع نسبة الأجنة النين-نوعية و إنتاج نباتات خضراء طبقت أربع معاملات متداخلة بين حامض 2,4- dichlorophénoxyacétique (2,4-D) و حامض الجبريليك (G3). و تبين النتائج أن نسبة انتقاخ الميايض و نسبة إخصاب الأجنة تختلف معنويًا تحت المعاملات المختلفة كما يبدو تجديد النباتات الهجينة جد مختلف. و يبدي القمح استعدادًا جيدًا للتصالب مع الوالد البري و أن أحسن المعاملات المطبقة هي : رش السنابل بـ G3 مرتين متتاليتين بعد 8 و 32 ساعة من الإخصاب مع استعمال (2,4-D) مرة واحدة قبل الإخصاب. يعود الفقد المسجل عند الإنبات بالضرورة إلى الأجنة غير العادية ذات الحجم الصغير. إضافة إلى هذه النتائج، توضح الدراسة الخلوية للجبل الأول (F1) أنها تحتوي على 28 صبغية (ABUM) كما يكشف تحليل تعدد الأشكال للمخزون البروتيني للبدور المنتجة بواسطة الفصل الكهربي عن تواجد منطقة جديدة عند الهجين H1 مقارنة بالأباء و الهجين H2. **الكلمات المفتاحية:** تصالب، قمح صلب، *Aegilops geniculata*، معاملات، منضم، نمو، قبل/بعد التلقيح

Le blé dur (*Triticum turgidum* L. var. *durum*, Desf.), représente environ 8% des superficies de blé. Il est cultivé approximativement sur 17 millions d'hectares dans le monde (Bohorova *et al.*, 2001). De cette surface 70 % est localisée dans la région du bassin méditerranéen (Nachit *et al.*, 1998). Dans cette région la sécheresse est le facteur, le plus important qui limite la productivité des plantes et l'amélioration pour la tolérance au manque d'eau est considérée, ces dernières années, comme l'un des premiers objectifs des programmes de sélection agronomique (Damania, 1991).

Souvent, l'amélioration génétique d'une espèce, telle que le blé dur, repose en grande partie sur l'apport continu, la gestion et l'exploitation de la variabilité qu'elle présente, mais cette variabilité peut être restreinte, voire absente pour certains caractères (Almouslem & Amleh, 1999).

En effet, l'abandon progressif de la culture de certaines espèces primitives et la disparition de nombreuses populations locales à l'intérieur des espèces *Triticum durum* a conduit à une perte considérable de la diversité génétique (Plucknett *et al.*, 1990, Al Hakimi & Monneveux, 1993; Bouharmont, 1994 ; Doussinault, *et al.*, 2001).

Cependant, cette variabilité peut être recherchée chez les espèces sauvages apparentées aux blés cultivés tel que les *Aegilops* et les *Agropyrons*. De ce fait, la recherche de variabilité génétique pour l'adaptation aux contraintes environnementales (résistances aux maladies, la tolérance au froid, à la salinité, à la sécheresse et la qualité des protéines de réserve) a conduit de nombreux travaux à s'intéresser à l'utilisation des espèces sauvages qui possèdent des traits de résistances très intéressants et constituent un réservoir de gène important, si on prend en compte l'adaptation de ces espèces à des environnements très différents (Wang, 1989 ; Chen *et al.*, 1992 ; Doussinault *et al.*, 2001 ; Ekmekci & Terzioglu 2005 ; Yunchao *et al.*, 2006 et Farooq & Azam 2006). Ainsi, parmi les diverses méthodes développer pour le transférant de gènes souhaitables, l'hybridation interspécifique et intergénérique entre le blé et des Triticées présente un outil important pour l'enrichissement génétique du blé (Chen, *et al.*, 1992 ; Collin, *et al.*, 1994 ; Jauhar & Joppa, 1996).

Les hybrides interspécifiques sont en générale stériles. Le processus d'hybridation se heurte à de nombreux obstacles (Cauderon 1981). Divers artifices sont appliqués pour surmonter ces difficultés (Collin, *et al.*, 1994), la culture *in vitro* d'embryons immatures (Bohorova *et al.*, 2001), le traitement à la colchicine pour le doublement chromosomique (Doussinault *et al.*, 2001) et le traitement des plantes par les régulateurs de croissance pré- ou post-pollinisation, pour augmenter le taux d'embryons interspécifiques et surmonter l'incompatibilité entre les espèces lorsque les parents sont distants (Riera-Lizarazu *et al.*, 1992 ; Jauhar, 2003).

En effet, le traitement des épis d'orge et du blé pollinisés par *H. bulbosum*, avec la gibbérelline (GA₃) et le l'acide 2,4- dichlorophénoxyacétique (2,4-D), augmente le taux de nouaison, l'état de différenciation des embryons, le taux de développement des embryons et le taux d'embryons haploïdes. Ainsi, Inagaki, 1986, a constaté que le 2,4- D peut remplacer le GA₃, lors du croisement blé × *H. bulbosum*. Alors que, Riera-Lizarazu *et al.*, 1992, ont conclu que le traitement des épis de blé pollinisés par *H. bulbosum* avec le 2,4 -D avant la pollinisation et par le GA₃ après pollinisation augmente le taux d'embryons interspécifiques, par rapport à ceux traités par le GA₃ seulement. De même Collin *et al.*, 1994, rapportent qu'il est possible d'utiliser certaines combinaisons hormonales entre l'acide gibbérellique et d'autres hormones de croissance telles que: la cytokinine, le BAP (6-benzylaminopurine), ANA (acide naphthalène acétique), AIA (acide indol-3- acétique),...etc, ou même AgNO₃ (nitrate d'argent) qui sont aussi recommander pour surmonter les barrières d'incompatibilité interspécifique.

Le but de ce travail est de générer de nouvelles populations dérivées d'hybridation interspécifique et de

l'incorporation des traits souhaitables des génomes étrangers d'*Aegilops geniculata*, pour l'amélioration génétique de la tolérance au stress hydrique des blés durs cultivés en Algérie. L'incorporation réussite de ces traits dans le blé nécessite l'utilisation des régulateurs de croissance afin de rétablir les embryons. Dans notre cas, nous nous sommes intéressés à l'effet des traitements hormonaux par le 2,4-D et le GA₃ sur le rétablissement des embryons issus de ce croisement intergénérique blé dur × *Aegilops geniculata*.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal : Deux variétés de blé dur (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) d'origine différente sont utilisées pour la réalisation de cet essai. Une locale, la variété Oued Zenati 368 et l'autre introduite, la variété vitron (Hoggar) d'origine espagnole. Les deux variétés sont prises comme parents femelles. Le parent mâle est l'espèce sauvage, *Aegilops geniculata* elle est obtenue d'une population naturelle d'origine locale (la région de Constantine).

Conduite de l'essai et traitements : Les graines de blé dur et celles d'*Aegilops* ont été pré-germées en boîtes de Pétri à température ambiante (environ 25°C). Dans cette étude l'essai est réalisé sous serre. Après germination, le semis est effectué dans des pots sur un support de terre et sable (2/3 :1/3, v/v), à raison de 4 pots par variété et 3 plantules par pot. Pour la synchronisation des dates de floraison des deux parents, le semis est réparti sur quatre dates successives. Avant l'anthèse de 1 à 4 jours, les épis des deux variétés de blé sont émasculés et chaque épi est enveloppé seul dans un sachet en papier pour maintenir le maximum d'humidité de l'épi et éviter la pollinisation accidentelle.

Pollinisation et traitements des épis : Lorsque les stigmates sont réceptifs (deux jour après la castration), les épis sont pollinisés par *Aegilops geniculata*. La pollinisation est faite manuellement par l'apport au contact des inflorescences mâles avec les fleurs du blé dur (parents femelles). Une solution de 0.3 à 0.5 ml de 2,4-D (acide 2,4 dichlorophénoxyacétique) à 100 ppm est injectée dans la cavité du dernier entre-nœud, ensuite, l'acide gibbérellique (GA₃) à 75 ppm est pulvérisé directement sur les fleurs pollinisées à raison d'une goutte dans chaque fleur. Afin d'étudier l'efficacité des traitements hormonaux sur le nombre de nouaisons, le pourcentage de régénération des embryons et leur croissance, quatre types de traitements hormonaux sont mis en place selon différentes références (Tableau 1).

Sauvetage des embryons et développement des plantules (vitro-plant) : Le prélèvement des caryopses dans cet essai est effectué entre le 14^{ème} et 16^{ème} jours après pollinisation. Les épis pollinisés sont coupés et ramenés à la chambre de transfert sous une hotte à flux laminaire pour prélever les grains. Ces dernières sont placées dans des boîtes de Pétri et désinfectés par une

solution de 25% d'eau de Javel commercial (3% d'hypochlorite de sodium) pendant 10 minutes suivies de trois rinçages consécutifs à l'eau distillée stérile. Après dissection des caryopses sous une loupe binoculaire, les embryons développés sont recueillis et déposés sur leur face ventrale dans des boîtes de Pétri stériles contenant le milieu B₅ gélosé (Gamborg, *et al.*, 1968) additionné de quelques acides aminés, de 1 mg/l d'AIB (acide indole butyrique), et de 0.25 mg/l de kinétine. Les embryons ainsi préparés, sont placés dans une chambre de culture à l'obscurité et à une température de 25 ± 2°C. Après germination des embryons et en fonction de leur vitesse de développement, les plantules formées, sont repiquées, après une à quatre semaine dans des tubes contenant le même milieu de culture et sont placées sous lumière avec une photopériode de 16 heures par jours.

Acclimation et transfert des micro-plantules en sol : Les plantes vertes atteignant un développement suffisant, stade deuxième feuille avec un bon enracinement, sont transférées dans des petits pots remplis d'un mélange stérile de terre, terreau et sable et sont arrosées par une solution nutritive stérile (Touraine & Meimoun, 1985). Ces pots sont maintenus toujours, dans la chambre de culture à la même température (25 ± 2°C) et en condition saturante en humidité relative jusqu'à l'apparition de nouvelles feuilles fonctionnelles (3^{ème} feuille verte et plus).

Examens cytogénétique et biochimique de la structure des hybrides: La structure hybride des jeunes plantes est vérifiée par dénombrement chromosomique. Il se fait à partir de l'observation des chromosomes dans des cellules en division des méristèmes racinaires. Ce travail consiste à déterminer le nombre et la morphologie des chromosomes à la mitose (Cauderon et Gay, 1984). De même, la qualité du pollen mûr est vérifiée au microscope photonique par des colorations différentielles au carmin acétique et à la solution d'Alexander (Alexander, 1969). Dans le but de comparer les hybrides F₁ avec ses parents, une caractérisation électrophorétique des gluténines des graines produites a été effectuée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Leur extraction a été effectuée selon la méthode de Singh *et al.*, 1991.

Testes statistiques : La signification statistique des résultats obtenus au cours de l'expérimentation a été appréciée par le test χ^2 d'indépendance qui a permis de déterminer l'existence ou non de liaisons entre les différents paramètres. Les moyennes des résultats obtenues sur le nombre d'épis pollinisés NEP, le nombre total des fleurs pollinisées NFP, le nombre de nouaison NN, le taux d'embryons formés NE et le nombre de plantes régénérées NPV ont été comparés grâce au test de Newman-Keuls. Une analyse de variance a été réalisée sur ces paramètres transformés en arcsin \sqrt{x} , afin de normaliser la fréquence de distribution, pour déterminer l'effet des différents traitements sur la régénération des embryons.

RESULTATS

Taux d'embryons formés : A partir de 96 plantes de blé dur (*Triticum durum*. Desf), 90 épis ont été pollinisés par *Aegilops geniculata* dont 46 pour Vitron et 44 pour Oued Zenati 368, et sur un nombre de 1982 fleurs fécondées seulement 23 plantes vertes ont été obtenues à partir de 51 embryons récupérés (Tableau 2).

Influence de l'application de 2,4-D et de GA₃ sur les paramètres étudiés : L'influence du génotype du blé dur sur le pourcentage de nouaison est statistiquement significative. Le test de Newman-Keuls sur l'arcsin de \sqrt{x} des valeurs moyennes obtenues pour chacun des types de traitement, (au risque $\alpha = 0.05$) met en évidence un effet croisement significatif, où les deux croisements sont différents. Ainsi que l'effet du traitement sur le taux de nouaison, où 3 groupes homogènes sont apparus. Par contre, pour les autres caractères étudiés, l'effet du traitement n'est pas significatif (Tableaux 3 et 4).

Le taux de nouaison le plus élevé a été observé chez l'hybride Vitron/ *Aegilops geniculata* (50 %) lors de l'application du traitement C, alors que le taux le plus faible est noté pour la variété Oued Zenati 368 pollinisée par *Aegilops geniculata* (6.03 %) quand le traitement D a été appliqué avec une grande variation du nombre des fleurs pollinisées par rapport aux traitements A et B (Tableau 3).

Cependant, le pourcentage du nombre d'embryons formés par rapport à la nouaison varie de 20.93 % (Oued Zenati 368/ *Aegilops geniculata* lors de l'application du traitement D) à 51.28 % (pour le même croisement lors du traitement C). La pollinisation du Vitron par *Aegilops geniculata* a donné 32.56 et 22.86 % d'embryons/nouaisons respectivement pour les traitements B et C. Alors que, la pollinisation de Oued Zenati 368 par *Aegilops geniculata* a donné 20.93 % d'embryons/nouaisons lors de l'application du traitement D (Tableau 4).

Dans l'ensemble, pour les quatre types de traitements, le rapport embryons/nouaisons apparaît très variable pour les différents croisements, cette variabilité inter-croisements n'explique pas la différence de réponse de chaque variété ou génotype par son effet, parce que les traitements ne sont pas appliqués sur tous les croisements (Tableau 3). On peut admettre que ces fluctuations sont dues, pour une part importante, aux modes de traitements (Tableau3). Globalement, l'injection de 2,4- D, 24 h avant la pollinisation, dans la cavité du dernier entre-nœud combiné avec la pulvérisation des fleurs par le GA₃, 8 et 32 h après la pollinisation (traitement C), s'est révélée très efficace par rapport aux autres traitements en termes de nouaison, d'embryons formés et de plantes vertes. Sur l'ensemble de 23 plantes vertes obtenues, 12 plantes vertes ont été régénérées lors de l'application du traitement C, soit 52.17 % pour tous les croisements. L'application des traitements A et B sur la variété Vitron pollinisée par *Aegilops geniculata* produit peu ou pas de plantes vertes, ainsi que le traitement D qui n'a donné que 9 plantes vertes pour Oued Zenati 368 pollinisée par *Aegilops geniculata*, alors que, la pollinisation de Vitron par *Aegilops geniculata* n'a pas donné d'embryons lors de l'application du traitement D.

Effet du croisement sur les différents paramètres étudiés : Les résultats obtenus dans cette étude mettent en évidence de fortes corrélations entre les différents paramètres étudiés ($r \geq 0.60$) (Tableau 5), sauf une faible corrélation observée entre le nombre de fleurs pollinisées et le nombre de nouaison ($r = 0.37$). Donc, on peut admettre qu'il sera plus efficace d'augmenter l'effectif des fleurs pollinisées **Almoulem & Amleh, 1999**, pour obtenir plus d'embryons et de plantes vertes.

Caractéristiques des caryopses et des embryons récupérés: Après 13 à 16 jours de la pollinisation, les caryopses développés sont prélevés. Les observations enregistrées montrent que la plus part des épis pollinisés ne produisent pas beaucoup de grains, en moyenne, seulement quatre (04) caryopses normaux sont rencontrés sur chaque épi. De même, sur les épis aucune graine n'a été développée sur la partie supérieure. Les caryopses qui résultent de cet essai sont de types très différents (Figure 1): 1- Petits et trapus, 2- Échaudés et allongés, 3- Gonflés et remplis d'un liquide clair au lieu de l'albumen. En outre, la mise en culture des embryons récupérés donne une germination de 31.82 et 72.41 % pour Vitron/ *Aegilops geniculata* et Oued Zenati 368/ *Aegilops geniculata* respectivement. Les pertes à la germination sont dues essentiellement aux embryons anormaux à tailles réduites (Figure 2).

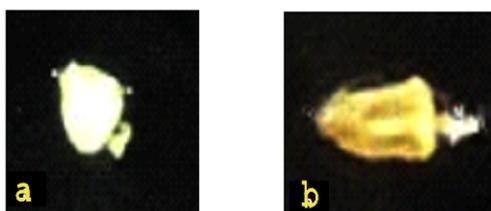


Figure 1: Forme des Caryopses : (a)- petits et (b)- trapus échaudés et allongés

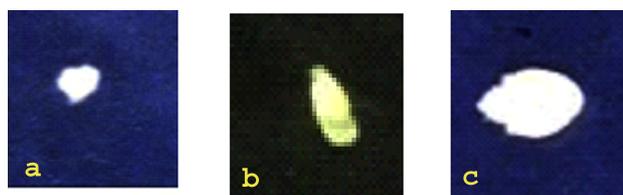


Figure 2: Taille des embryons : (a)- tailles réduites, (b)- taille moyenne et (c)- taille normale.

Caractéristiques morphologiques et phénotypique des hybrides : La variabilité entre les hybrides F1 est très grande pour les deux croisements ainsi que pour le même croisement. Ce sont des hybrides intergénériques vrais avec une dominance des traits morphologiques du parent mâle (*Aegilops geniculata*). Ces traits se manifestent surtout au niveau de l'épi (Figures 3 et

4). En effet, la couleur des épis est différente pour les deux croisements. Les épis sont très lâches, fragiles et se détachent facilement lors de la maturité. Les hybrides F1 montrent un fort tallage avec des feuilles réduites comparées aux parents femelles (blé dur). A l'anthèse les fleurs des hybrides F1 s'ouvrent. En outre, la longueur de l'épi, le nombre des épillets et la hauteur de la plante ont des caractères variables. Ils tendent vers ceux des deux variétés de blé dur.



Figure 3: Couleur des épis des hybrides : (a)- croisement Oued Zenati368 x *Aegilops geniculata*. (épi noir et blanc). (b) croisement Vitron x *Aegilops geniculata* (épi noir).



Figure 4: Caractéristiques morphologiques des épis chez les hybrides au stade anthèse: cas d'un épi issu du croisement Oued Zenati368 x *Aegilops geniculata*.

Obtention de plantes vertes et production du grains: Le par culture *in vitro* a permis d'obtenir d'une part, 4 plantes vertes issues du croisement Vitron/ *Aegilops geniculata*, ces plantes ont présentées un développement végétatif normal jusqu'à maturité mais elles sont complètement stériles. D'autre part, un sauvetage des embryons issues du croisement Oued Zenati 368/ *Aegilops geniculata* a permis l'obtention de 19 plantes vertes avec production de 04 graines à partir de 04 épis de deux plantes différentes : plantes à épis blancs (H₁) et plantes à épis noirs (H₂).

Contrôle cytogénétique des plantes vertes régénérées issues des deux croisements: Le dénombrement chromosomique a permis de déterminer le nombre de chromosomes des plantes hybrides régénérées. En effet, après une description morphologique des chromosomes des deux espèces parentaux, *Triticum durum* (Vitron et Oued Zenati 368) 'AABB' et *Aegilops geniculata* 'UUMM', une étude morphologique comparative est apportée sur toutes les plantes hybrides régénérées. Cette étude nous a permis de déterminer 28 chromosomes pour tous les descendants (Hybrides F₁) avec $2n = 4x = 28$, ABUM (Figure 5).

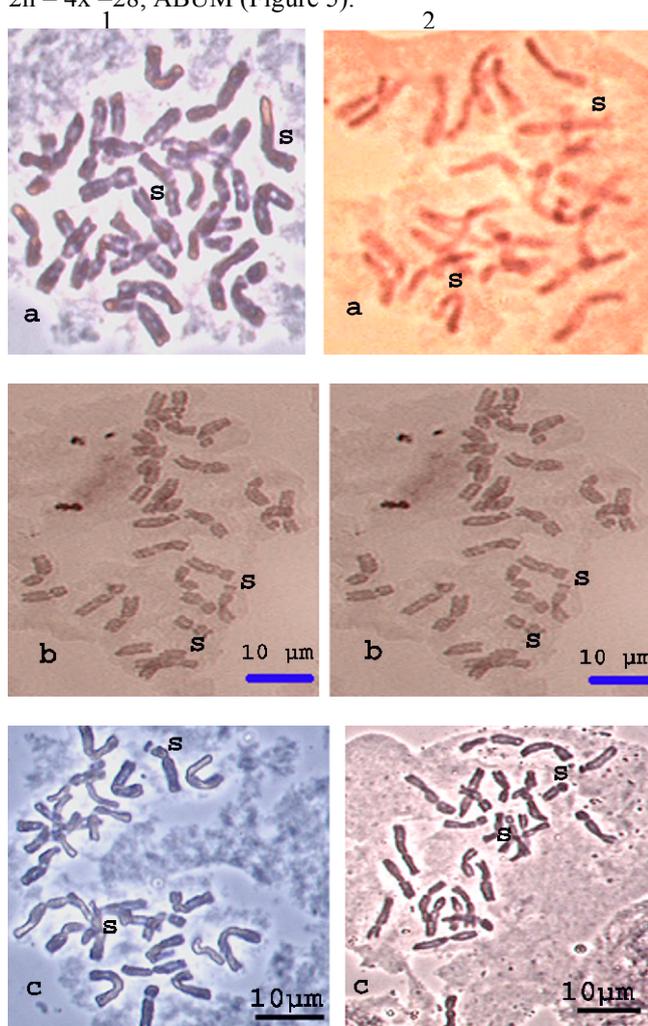


Figure 5: Plaques métaphasiques à 28 chromosomes chez les parents blé dur et *Aegilops* et leurs hybrides. Vitron/ *Aegilops geniculata* (1) et Oued Zenati 368/ *Aegilops geniculata* (2).

1- Vitron (a), *Aegilops geniculata* (b) et l'hybride Vitron/ *Aegilops geniculata* (c).

2- Oued Zenati 368 (a), *Aegilops geniculata* (b) et l'hybride Oued Zenati 368/ *Aegilops geniculata* (c).

Etude de la diversité génétique: L'analyse électrophorétique des deux hybrides avec leurs parents a permis de détecter les différences qui existent entre eux. Le polymorphisme des bandes électrophorétiques est important. Le profil des gluténines de l'hybride H₁ (à épis blancs) est différent pour quelques bandes de celui de l'hybride H₂ (à épis noirs). La plupart des bandes des deux parents sont entièrement exprimées chez l'hybride H₂. L'hybride H₁ présente des bandes en plus comparé aux deux parents étudiés (Figure 6).

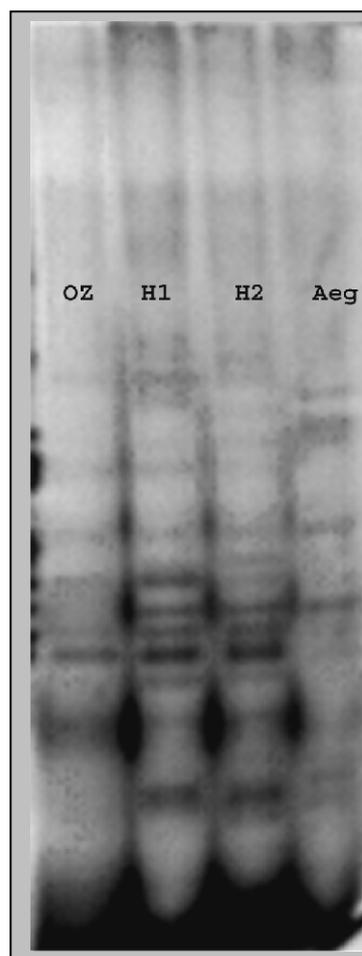


Figure 6: Profil des gluténines, chez les hybrides et leurs parents. Cas du croisement Oued Zenati 368 x *Aegilops geniculata*. **OZ** : parent femelle Oued Zenati 368 ; **H₁** : hybride à épi blanc ; **H₂** : hybride à épi noir et **Aeg** : parent mâle *Aegilops geniculata*

DISCUSSION

L'amélioration variétale consiste à créer une variabilité génétique nouvelle, puis à sélectionner et fixer, parmi cette diversité, les génotypes intéressants. Ainsi l'hybridation interspécifique est un outil important pour l'enrichissement génétique du blé en transférant les gènes souhaitables à partir des espèces sauvages apparentées au blé de la tribu des *Triticeae*. Dans cette étude nous avons essayé de chercher la bonne réponse à l'utilisation des régulateurs de croissance pour la régénération de plantes vertes issues de croisement entre le blé dur et l'espèce sauvage *Aegilops*.

Les résultats obtenus mettent en évidence de fortes corrélations entre les différents paramètres étudiés. En effet, l'augmentation du nombre de fleurs pollinifères est positivement corrélée avec le nombre d'embryons et de plantes vertes obtenues. Par contre, cette augmentation

n'influence pas assez le taux de nouaison ($r=0.37$). Ces observations ont déjà été signalées par **Oury et al., (1993)** qui ont rapporté que l'augmentation du nombre d'épis travaillés implique l'augmentation du nombre de plantes vertes à partir d'une seule plante donneuse. Par conséquent, **Sharma, (1999)**, recommande, dans ses travaux, de polliniser jusqu'à 1000 fleurs par croisements interspécifiques pour augmenter les chances d'obtenir plus des plantes vertes.

Dans notre cas, le croisement du blé dur à partir des variétés Oued Zenati 368 et Vitron, utilisées comme parents femelles avec l'espèce sauvage *Aegilops geniculata* est peu productif en grains. Ce résultat est signalé par plusieurs d'autres travaux qui ont confirmé que la différence du niveau de ploïdie des parents réduit sensiblement la fertilité de la descendance F_1 . Ainsi ils recommandent de prendre le parent qui a le degré de ploïdie le plus élevé comme parent femelle (**Mandy, 1970 ; Sharma & Gill, 1983 ; Wolf, 1985 ; Plucknett et al., 1990 et Bouharmont, 1994**). Ceci n'apas été le cas dans notre étude. Afin de surmonté cette barrière, **Collin et al., 1994**, montrent que le sauvetage d'embryons dans le cas de la pollinisation du blé par le pollen d'*Aegilops*, empêche l'avortement et améliore la production de grains.

A cet effet, l'utilisation des régulateurs de croissance dans les milieux de culture des embryons est préconisée. Il est nécessaire de trouver le meilleur équilibre entre les auxines et les cytokinines pour assurer un bon développement des racines, qui permet à la plante de mieux s'adapter à la culture en sol, et des partis aériens pour permettre le passage à l'autotrophie. En effet, nous avons noté dans cette étude, que l'application de 2,4-D, ainsi que le traitement des épis par le GA_3 a permis de rétablir le maximum d'embryons.

Les résultats de cette étude indiquent clairement qu'une seule application de 2,4-D avant la pollinisation en combinaison avec deux pulvérisations de GA_3 sur les épis du blé, 8h et 32h après pollinisation a amélioré la taille et le nombre d'embryons formés et par conséquent la régénération des plantes hybrides F_1 . En effet, l'application de 2,4 D avant pollinisation peut influencer la germination et la viabilité des embryons. **Riera-Lizarazu et al., (1992)** montrent, dans le cas du croisement blé dur \times orge, que l'application de 2,4 D avant pollinisation répond aux exigences en auxine au premier stade de développement d'embryons par la translocation de corps dissous dans les graines en absence d'un albumen normal. En outre, **Plucknett et al., (1990)**, montrent que l'utilisation de GA_3 favorise l'élongation cellulaire du tube pollinique et assure ainsi la fécondation. Les mêmes auteurs indiquent que le traitement par le GA_3 est efficace en termes de taux de nouaison et de nombre d'embryons formés. Ces résultats sont confortés par ceux de **Sharma, (1999)**.

Généralement, les hybrides intergénériques sont stériles. Cette stérilité trouve son explication dans le comportement des chromosomes en méiose dans les cellules mères du pollen. Elle constitue un grand obstacle au transfert des gènes désirables des espèces apparentées dans le blé. Ainsi, les hybrides issus du croisement *Triticum turgidum* L. \times *Aegilops geniculata* sont fortement stériles. Dans le cas de

notre étude, quatre graines seulement, sont naturellement obtenues. La stérilité d'hybrides F_1 est signalée par plusieurs autres travaux, qui indiquent que le taux d'appariement entre les chromosomes de blé et ceux des espèces sauvages apparentées est très faible (**Chen et al, 1992 ; Almouslem & Amleh, 1999 ; Jauhar, 1992, 1995**). Ainsi, la stérilité d'hybride produit d'une hybridation intergénérique peut être attribuer à une distribution irrégulière des chromosomes à l'anaphase I qui résultante d'une disjonction irrégulière des multivalents. Néanmoins, dans la présente étude, le dénombrement chromosomique de toutes les plantes produites stériles et fertiles, a révélé la présence de 28 chromosomes, ce qui traduit une disjonction chromosomique régulière (**Jauhar, 1995 ; Xu & Joppa, 1995**). En effet, **Tourte, (1998)**, rapporte que les plantes qui paraissent fertiles ont généralement connu, au cours des premières divisions, une ou plusieurs caryocinèse non suivie de cytotidièrese, qui ont spontanément rétabli la diploïdie.

Cependant, dans notre cas, plusieurs traits non désirables du parent sauvage sont dominants chez l'hybride formé, surtout la robustesse ou fragilité de l'épi à la maturité, épis lâches à très lâches et l'ouverture des fleurs lors de l'anthèse, ce qui rend l'hybride allogame. Il est claire, que la production d'hybride intergénérique Oued Zenati 368 \times *Aegilops geniculata*, dérivé de la contribution chromosomique du parent sauvage. Ainsi, pour supprimer le maximum des gènes ou traits non désirables liés aux chromosomes du parent sauvage il est nécessaire d'effectuer une série successive de back-cross avec le blé.

En effet, la fertilité des hybrides F_1 , quelle que soit sa portion, offre une forte possibilité d'introduire directement les traits désirables dans le blé à partir d'*Aegilops geniculata* et reconstitue ainsi un nouveau génome du blé dur, en incorporant les chromatines désirables, par back-cross, directement sur les hybrides F_1 pour restaurer le maximum des compléments chromosomiques du blé.

Tableau 1: Différentes combinaisons des traitements hormonaux et périodes d'applications

Traitements	Application de 2,4-D et de GA_3	Références
A	le 2,4-D 24 h après la pollinisation et le GA_3 24, 48 et 72 h après la pollinisation.	Chlyah, et al., 1999
B	le 2,4-D 24 h après la pollinisation et le GA_3 24 h après la pollinisation.	Inagaki, 1986 et Riera-Lizarazu, et al., 1992. Chlyah, et al., 1999
C	le 2,4-D 24 h avant la pollinisation et le GA_3 8 et 32 h après la pollinisation.	Torabinejad et Mueller, 1993.
D	le 2,4-D 24 h avant la pollinisation et le GA_3 24 h après la pollinisation.	Dewey, 1984 ; Inagaki, 1986 et Riera-Lizarazu, et al., 1992.

Tableau 2: Effectifs des paramètres étudiés pour les deux croisements

Variables étudiées	Vitron/ <i>A. geniculata</i>	Oued Zenati 368/ <i>A. geniculata</i>	Total
Epis pollinisés	46	44	90
Fleurs fécondées	1029	953	1982
Nouaison	122	82	204
Embryons obtenus	22	29	51
Plantes vertes	4	19	23

CONCLUSION

Les résultats de cette étude montrent que la réussite de sauvetage d'embryons dépend beaucoup plus de la qualité des caryopses produits. De même, le développement des embryons est fonction de leurs tailles et leurs morphologies. La caractérisation électrophorétique suggère que les deux hybrides obtenus sont issus de deux génotypes sauvages distincts. Par ailleurs, l'obtention de graines intergénériques fertiles, à 28 chromosomes, constitue une première étape pour la création de germoplasme viable et le transfert de gènes étrangers d'*Aegilops geniculata* vers le blé dur afin de produire des génotypes de blé dur résistants aux stress biotiques (maladies et ravageurs) et abiotiques (sécheresse, hautes températures et froid).

Tableau 3: Effet des traitements hormonaux sur les paramètres de chaque croisement

Traitement	Croisement	NFP	NN	TN	NE	E/N	NPV	PV/N (%)	PV/E(%)
A	Vit/Aeg	205	38	18,54	0	0	0	0	0
	OZ/Aeg	----	----	----	----	----	----	----	----
B	Vit/Aeg	708	43	6,07	14	32,56	2	4,65	14,29
	OZ/Aeg	----	----	----	----	----	----	----	----
C	Vit/Aeg	70	35	50	8	22,86	2	5,71	25,0
	OZ/Aeg	240	39	16,25	20	51,28	10	25,64	50,.
D	Vit/Aeg	46	6	13,04	0	0	0	0	0
	OZ/Aeg	713	43	6,03	9	20,93	9	20,93	100
Total	Vit/Aeg OZ/Aeg	1982	204	18,32	51	21,27	23	9,49	31,55

NFP : nombre de fleurs pollinisées ; **NN** : nombre de nouaisons ; **TN** : taux de nouaisons ‘‘nombre de nouaisons/ nombre de fleurs pollinisées’’ ; **NE** : nombre d'embryons ; **E/N** : nombre d'embryons/ nombre de nouaisons ; **NPV** : nombre de plantes vertes ; **PV/N** : nombre de plantes vertes/ nombre de nouaisons ; **PV/E** : nombre de plantes .vertes/ nombre d'embryons (---) : pas d'application.

Tableau 4: Valeurs moyennes des paramètres étudiés pour chaque traitement

Traitement	Taux de nouaison	Nombre d'embryons	Nombre de plantes vertes	Embryons/Nouaisons (%)	Pla,tes vertes/Nouaison (%)	Plantes vertes/Embryons (%)
A	4,61 b	0	0	0	0	0
B	1,52 c	14	2	8,14	1,16	3,75
C	27,46 a	32	14	21,31	9,23	31,25
D	4,86 b	10	10	30,23	30,23	50
Moy/Total	9,61	56	26	14,92	10,16	21,25

Tableau 5: Matrice des corrélations entre les différents paramètres ($\alpha = 0,05$).

	NEP	NFP	NN	NE	NPV
NEP	1,00				
NFP	1,00	1,00			
NN	0,90	0,90	1,00		
NE	0,92	0,91	0,83	1,00	
NPV	0,62	0,60	0,37	0,82	1,00

NEP : nombre d'épis ; **NFP** : nombre de fleurs pollinisées ;
NN : nombre de nouaisons ; **NE** : nombre d'embryons ;
NPV : nombre de plantes vertes.

REFERENCES

[1]- Al Hakimi & Monneveux, 1993. variation of some morphological traits of drought tolerance in tetraploid wheats. In: biodiversity and Wheat Improvement, A.B.Darmania (ed.), Jhon Wiley and sons, 199 - 216.

[2]- Alexander, 1969 In : Jahier, J., A.M. Chevre, F. Eber, R. Delourme, & A.M. Tanguy, 1992. Techniques de cytogénétique végétale. (eds), INRA, Paris. France. Pp. 184.

[3]- Almouslem, A.B. & N. Amleh, 1999. An intergeneric hybrid between durum wheat and diploid wheatgrass *Lophopyrum elongatum* (Host) A. Love. *Kuwait J Sci Eng* 26: 143-153.

[4]- Bohorova N; Pfeiffer W.H, Mergoum M; Crossa J; Pacheco M and Estano P., 2001. Regeneration potential of CIMMYT durum wheat and triticale varieties from immature embryos. *Plant Breeding* 120, 291-295.

[5]- Bouharmont, J. 1994. Création variétale et amélioration des plantes. In : Ameziane, E.H.T. & Persoons, E. (eds), *Agronomie moderne, bases physiologiques et agronomiques de la production végétale*. Pp 312-338. HATIER – AUPELF. UREF, Paris, France.

[6]- Cauderon et Gay, 1984, cité In : Jahier, J., A.M. Chevre, F. Eber, R. Delourme, & A.M. Tanguy, 1992. Techniques de cytogénétique végétale. (eds), INRA, Paris. France. Pp. 184.

[7]- Cauderon Y., 1981. Hybridation interspécifique et amélioration des plantes. I- évaluation des voies d'étude des relations entre espèces. *C.R. Acad.Agric. Fr.*, 67,1001-1012.

[8]- Chen, Q., Jahier, J. & Cauderon, Y. 1992. Production and cytogenetic analysis of BC₁, BC₂ and BC₃ progenies of an intergeneric hybrid between *Triticum aestivum* (L.) Thell. and tetraploid *Agropyron cristatum* (L.) Gaerth. *Theor Appl Genet* 84: 698 – 703.

[9]- Chlyah, O., O. Amail, N. Saidi, S. Cherkaoui, O. Lamsaouri, A.B. Chlyah. & H. Chlyah. 1999. Haplodiploïdisation chez le blé dur par croisement

intergénériques : blé dur × *Hordeum bulbosum* et blé dur × maïs. *Cahiers Agricultures*. 8 : 330-333.

[10]- Collin, J., Comeau, A. & Bizimungu, B. 1994. Hybridation interspécifique pour l'introgession de gènes de résistance aux maladies chez le blé. Rapport de recherche. Univ Laval. Canada.

[11]- Damania A.B., 1991. the use of genetic resources in breeding durum wheat. *Plant Breeding abstract*, 61 (8), 873-881.

[12]- Dewey, D.R. 1984. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial *Triticeae*. In: Gustafon, J.P. (eds), *Gene manipulation in plant improvement (16th Stadler Genet Symp)*. Pp 209 – 279. Plenum., New York, USA.

[13]- Doussinault G ; Pavoine M,T ; Jaudeau B ; Jahier J., 2001. evolution de la variabilité génétique chez le blé. Dossier de l'environnement de l'INRA, N° 21. p 91-103

[14]- Ekmekci, Y. and Terzioglu, S. 2005. Effect of oxidative stress induced by paraquat on wild and cultivated wheats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 83: 69-81.

[15]- Farooq, S. and Azam, F. 2006. A new allopolyploid wheat for stressed land and poverty alleviation, *Field Crops Research*. *In press*.

[16]- Gamborg, O.L., Miller, R.A. & Ojima, K. 1968. *Exp Cell Res* 50: 151 – 158.

[17]- Inagaki, M. 1986. Crossability of Japanese wheat cultivars with *Hordeum bulbosum* L. *Jpn. J Breed* 36: 363 – 370.

[18]- Jauhar P.P., & Joppa L.R., 1996. Chromosome pairing as tool in genome analysis: Merits and limitations. In: Jauhar P.P. (Ed) *Methods of Genome Analysis in Plants*. Pp. 9-37. CRC Press, New York, USA.

[19]- Jauhar, 2003. Haploid and doubled haploid production in durum wheat by wide hybridation. M. Maluszynski et al. (eds.), *doubled haploid production in crop plants*, 161-166.

[20]- Jauhar, P.P. 1992. Synthesis and cytological characterization of trigeneric hybrids involving durum wheat, *Thinopyrum bessarabicum*, and *Lophopyrum elongatum*. *Theor. Appl. Genet.* 84: 511-519.

[21]- Jauhar, P.P. 1995. Meiosis and fertility of F₁ hybrids between hexaploid bread wheat and decaploid tall wheatgrass (*Thinopyrum ponticum*). *Theor. Appl. Genet.* 90: 865-871.

[22]- Mandy G. 1970. *Pflanzenzüchtung - Kurz und bündig*. VEB Deutscher Landwirtschafts-verlag, Berlin.

[23]- Nachit, M., E. Picard, P. Monneveux, M. Labhilili, M. Baum, & R. Rivoal. 1998. Présentation d'un programme international d'amélioration du blé dur pour le bassin méditerranéen. *Cahiers Agricultures*. 7 (6) : 510-15.

[24]- Oury, F.X., Pichon, M. & Rousset, M. 1993. Une comparaison entre 2 méthodes d'haplodiploïdisation chez le blé tendre : l'androgénèse *in vitro* et le

- croisement interspécifique avec le maïs. *Agronomie* 13: 95 – 103.
- [25]- Plucknett, D.L., Nigel, J.H.S, Williams, J.T. & Murthi Anishetty, N. 1990. Banques de gènes et alimentation mondiale. Traduire par Commeau, M.F. & Ron, E. Pp CTA – INRA, Paris, France.
- [26]- Riera-Lizarazu, O., Wade, G., Dewey, W.G. & Carman, J.G. 1992. Gibberellic acid and 2,4- D treatments for wheat × barley hybridization using detached spikes. *Crop Sci* 32: 108 – 114.
- [27]- Sharma H.C & Gill B.S., 1983. Current status of wide hybridation in wheat. *Euphytica* 32:17-31.
- [28]- Sharma, H.C. 1999. Embryo rescue following wide crosses. In: Hall, R.D. (eds), *Methods in molecular biology*, vol. 111. Pp 293 – 307. Plant cell culture protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- [29]- Singh, N.K., K.W. Shepherd, & G.B. Cornish. 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunit of glutenin. *Cereal. Sci. J* 14: 203-208.
- [30]- Torabinejad, J. & R.J. Mueller. 1993. Genome analysis of intergeneric hybrids of apomictic and sexual Australian *Elymus* species with wheat, barley and rye: implication for the transfer of apomixis to cereals. *Theor. Appl. Genet.* 86: 288-294.
- [31]- Touraine, B. & Meimoun, A. 1985. Etude comparée de la sensibilité au sel d'un triticales et d'une orge. *Agronomie* 5(5) : 391-395.
- [32]- Tourte, Y. 1998. Génie génétique et biotechnologie: Concept et méthodes. Application à l'agronomie et aux bio-industries. (eds), Dunod. Paris.
- [33]- Wang R.R.C., 1989. an assessment of genome analysis based on chromosome pairing in hybrids of perennial triticeae. *Genome*
- [34]- Wolf, E. C. 1985. Conserving biological diversity. In: L. R. Brown, E. C. Wolf, L. Starke, W. U. Chandler, C. Flavin, S. Postel, and C. Pollock, *State of the world: A world watch Institute Report on Progress Toward a Sustainable Society*. W. W. Norton, New York. Pp. 124-146.
- [35]- Xu, S.J., & L.R. Joppa, 1995. Mechanisms and inheritance of first division restitution in hybrids of wheat, rye, and *Aegilops squarrosa*. *Genome*. 38: 607-615.
- [36]- Yunchao, K., Yongfang, W., Beaudoin, F., Leader, D. J., Edwards, K., Pool, R., Wang, D., Mitchell, R. A. C. and Shewry, P. R. 2006. Transcriptome analysis reveals differentially expressed storage protein transcripts in seeds of *Aegilops* and wheat. *Journal of Cereal Science*. 44: 75-85.