

## Problématique de la culture de microspores chez le blé dur *Triticum turgidum* L. var. *durum*

F. Jaiti\*, S. El Jaafari\*\*, I. El Hadrami\*, M. Nachit\*\*\*, M. Baum\*\*\*, J. De Buyser\*\*\*\* et E. Picard\*\*\*\*

\*Laboratoire de Physiologie Végétale, Faculté des Sciences-Semlalia, B.P. 2390,  
40001 Marrakech, Maroc, e-mail : hadrami.fssm@cybernet.net.ma

\*\*Laboratoire de Physiologie Végétale, Université Moulay Ismail, B.P. 4010, Béni Mhamed,  
5000 Meknès, Maroc

\*\*\*ICARDA, P.O. Box 5466, Aleppo, Syria

\*\*\*\*Labo. Morphogenèse Végétale Expérimentale, Université de Paris Sud XI, Bât. 360, F-91405 ORSAY  
Cedex 1, France, e-mail : emmanuel.picard@mve.u-psud.fr

**RESUME** – Ce travail porte sur l'étude de la réactivité *in vitro* des microspores d'un hybride F<sub>1</sub> (Cham-1 x Jenah Khotifa) de blé dur. L'analyse de la fluorescence des microspores après traitement par le FDA durant la première semaine de culture nous a permis de distinguer quatre classes. Le pourcentage de proembryons obtenus sur le milieu CHB3 est de 8,44% et seulement 2% de ces proembryons évoluent en embryons (soit 0,18 embryons par 100 microspores). Le deuxième problème crucial rencontré est celui de l'albinisme. Ainsi, seulement 15 plantes vertes (parmi 1097 plantes régénérées) ont été obtenues à partir de 2824 embryons. L'utilisation d'hormones telles que AIA et kinétine n'a pas amélioré la fréquence de régénération des plantes. De plus, il a été révélé que le pourcentage de régénération des plantes à partir des embryons âgés de plus de quatre semaines diminue de 50% sur les trois milieux utilisés. L'âge des embryons influence donc fortement leurs capacités morphogènes.

**Mots-clés** : Blé dur, culture de microspores, embryogenèse, haploïdie, albinisme.

**SUMMARY** – “Problems of microspore culture in *Triticum turgidum* L. var. *durum*”. In this work, the study of fluorescence of durum wheat (Cham-1 x Jennah Khotifa) isolated microspores during the first week of culture revealed 4 classes. The highest percentage of proembryo formation obtained was 8.44%. Nevertheless, only 2% of these proembryos evolved to embryos (0.18 embryo per 100 microspores). These embryos germinated and chlorophyllian and albino plants were obtained (15 green and 1082 albino plants from 2824 embryos). The use of phytohormones such as AIA and kinetone does not improve the frequency of plant regeneration. In addition, for the 4 week-old embryos, this frequency of plant regeneration decreases to 50%.

**Key words**: Durum wheat, microspore culture, embryogenesis, haploidy, albinism.

### Introduction

La culture de microspores ou de jeunes grains de pollen isolés a permis d'élargir le champ d'action des biotechnologistes. En effet, les microspores isolées constituent un matériel de choix pour les manipulations génétiques permettant l'introduction d'ADN étranger et 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. De plus, elle permet la compréhension des événements cellulaires et moléculaires conduisant à l'embryogenèse gamétique et la régénération des haploïdes doublés. Cependant, le blé dur (*Triticum turgidum* L. var. *durum*), contrairement au blé tendre (*T. aestivum*) est jusqu'ici considéré comme une espèce récalcitrante à la culture de microspores *in vitro* (Hadwiger et Heberle-Bors, 1986). En effet, le rendement en embryons et les taux de régénération de plantes étaient faibles et la plupart des plantes régénérées étaient albinos. Cependant récemment chez *Triticum turgidum* var. *durum* des résultats encourageants ont été obtenus en culture de microspores isolées *in vitro* par Picard *et al.* (1998). Le travail présenté ici porte sur le suivi cytologique des cultures et l'étude de quelques facteurs régissant la culture de microspores chez le blé dur.

### Matériels et méthodes

Le matériel végétal utilisé est cultivé sous serre et constitué d'un hybride F<sub>1</sub> (Cham1 x Jennah Khotifa), matériel fourni par l'ICARDA dans le cadre du programme SEWANA. Les expériences présentées dans cet article ont été réalisées au Laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale d'Orsay (France). Les plantes sont cultivées en pots dans une chambre de culture climatisées de type Strader, sous une photopériode de 16 h de lumière à 22°C et 8 h d'obscurité à 15°C. Le pourcentage d'humidité relative est maintenu à 70 ± 5. Le flux lumineux est assuré par des lampes à vapeur de sodium 400 W (marque type) alternant avec des lampes halogènes 400 W (marque type) 1150 µE/m<sup>2</sup>/s. Les épis sont prélevés lorsque les microspores sont au stade unicellulaire tardif ou bicellulaire précoce (jeunes grains de pollen). Ces épis prélevés sont soumis à un traitement à basse température (4°C) pendant au moins 2 semaines à l'obscurité. Le milieu CHB3 (modifié d'après Chu *et al.*, 1990) a été utilisé pour l'évaluation de la réactivité des jeunes grains de pollen. Les microspores mises en suspension sont cultivées avec une concentration de 50 000 microspores par ml et distribuées dans des boîtes de Pétri (Ø 3 cm) à raison de 1,5 ml par boîte. Le milieu de culture est conditionné par des ovaires provenant d'épis plus âgés que ceux employés pour l'extraction des microspores (5 à 10 ovaires par boîte de Pétri). Les cultures sont incubées à l'obscurité à 26 ± 2°C. Ces cultures sont observées après deux jours pour déterminer leur viabilité en utilisant le diacétate de fluorescéine (FDA) en microscopie optique à fluorescence. La réponse des microspores (division et développement pré-embryonnaire) est suivie et observée par l'utilisation de microscope inverse après une semaine de culture. Le nombre d'embryons formés est évalué après trois à quatre semaines de culture. La régénération de plantes est obtenue sur le milieu de Murashige et Skoog (1962) avec ou sans régulateurs de croissance (AIA et kinétine).

## Résultats et discussion

### Viabilité des microspores

L'analyse de la fluorescence des microspores après traitement par le FDA après deux jours de culture a permis de distinguer quatre classes :

(i) *Classe A* : microspores présentant une grande vacuole avec la fluorescence en forme de croissant très intense d'un côté de la microspore.

(ii) *Classe B* : microspores présentant une fluorescence en forme d'étoile au niveau des extensions du cytoplasme.

(iii) *Classe C* : microspores fluorescentes d'une façon uniforme.

(iv) *Classe D* : microspores présentant une fluorescence sous forme de boules.

Une diminution de moitié de la viabilité des microspores a été relevée après quatre jours de culture (Table 1). Le suivi de microspores viables durant la première semaine de culture a montré que le type B a augmenté considérablement par opposition aux autres types de fluorescence dont les pourcentages ont été réduits de moitié (Table 1). Chez le tabac, les microspores embryogènes sont caractérisées par un cytoplasme de structure organisée. Le noyau se déplace à une position centrale et on note la formation de files cytoplasmiques qui passent à travers la vacuole et relient le cytoplasme périnucléaire au cytoplasme subcortical (Touraev *et al.*, 1997). Ainsi, les microspores présentant la fluorescence de type B sont indicatrices d'un cytoplasme de structure organisée et par conséquent du caractère embryogène de la culture.

Table 1. Viabilité des microspores déterminée après deux et six jours de culture chez l'hybride F<sub>1</sub> (Cham1 x Jennah Khotifa)

Jours de culture	Nombre de cellules comptées	Microspores non fluorescentes	Microspores fluorescentes				% moyen de fluorescence
			A	B	C	D	
2	615	534	34	5	44	22	17,07
6	875	793	16	36	18	11	9,25

## Développement préembryonnaire et formation des embryons

Après une semaine de culture, les microspores augmentent de taille et au sein de ces jeunes grains de pollen gonflés, l'observation au microscope inverse a permis de visualiser les divisions cellulaires conduisant à la formation de proembryons. La valeur moyenne de proembryons obtenus étant de 8,44%, soit 6330 proembryons par boîte de Pétri. Cependant, seuls 134 (2%) proembryons évoluent pour donner des embryons, soit un pourcentage de 0,18 embryons par 100 microspores. Ceci pourrait être dû à une insuffisance nutritionnelle ou à d'autres facteurs inhibiteurs. Néanmoins, la phase d'induction des embryons est assez rapide (obtention des embryons à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine) et la méthode utilisée est très simple. Ce qui permet de pallier à ce problème de blocage de développement des proembryons par la multiplication du nombre d'essais.

## Régénération de plantes

On a été confrontés durant cette étape au problème de l'albinisme. Ainsi, à partir de 2824 embryons, 1097 plantes ont été obtenues dont seulement 15 sont vertes (soit 1,31%) alors que 1024 sont albinos et 58 sont anthocyanées (Table 2).

Table 2. Effet du milieu de culture et de l'âge des embryons sur la régénération de plantes chez l'hybride F<sub>1</sub>

Age des embryons	Milieux de culture	Nombre d'embryons mis en culture	Nombre d'embryons régénérant des plantes		
			Vertes	Albinos	Anthocyanées
3 semaines	MS <sub>0</sub>	250	4	173	5
	MS+AIA+Kin	200	0	141	3
	MS+AIA	280	2	164	5
4 semaines	MS <sub>0</sub>	334	2	177	14
	MS+AIA+Kin	350	3	145	6
	MS+AIA	210	1	65	9
5 semaines	MS <sub>0</sub>	400	1	51	2
	MS+AIA+Kin	350	1	56	10
	MS+AIA	350	1	52	4

L'utilisation de l'AIA et de la kinétine ne semble pas améliorer la régénération de plantes (Table 2). En effet, le milieu MS<sub>0</sub> (sans régulateurs de croissance) a permis l'obtention du nombre le plus élevé de plantes vertes à la troisième semaine. De plus, nous avons noté que les plantes régénérées sur le milieu MS<sub>0</sub> et MS contenant de l'AIA sont plus vigoureuses (Table 2).

Les embryons âgés de plus de quatre semaines commencent à perdre leurs capacités morphogènes. En effet, le pourcentage de régénération de plantes diminue de plus de 50% sur les trois milieux utilisés (Table 2).

## Conclusion

En conclusion, la procédure développée, ici, pour la culture de microspores isolées chez le blé dur est simple et rapide. Elle nous a permis d'obtenir avec succès des embryons haploïdes et des plantes chlorophylliennes.

## Remerciements

Les expériences présentées dans cet article ont été réalisées par F. Jaiti au Laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale d'Orsay (France) dans le cadre du programme SEWANA blé dur

et des contrats AUPELF.UREF ARC Céréales et MAE France INRA UPS ICARDA et du Fonds Francophone de la Recherche (FFR) : JER 3008 et LAF 612 associés à l'AUF. Il bénéficie également d'un soutien du FIS (FIS,D/1937-2).

## Références

- Chu, C.C., Hill, R.D. et Brule-Babel, A.L. (1990). High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide containing media. *Plant Sci.*, 66 : 255-262.
- Hadwiger, M.A. et Heberle-Bors, E. (1986). *Pollen plant production in Triticum turgidum ssp. durum*. Dans : *Proceeding of International Symposium of Nuclear Techniques and in Vitro Culture for Plant Improvement*, FAO/IAEA, Vienne, 19-23 août 1985. FAO/IAEA, Vienne, pp. 213-220.
- Jähne, A. et Lörz, H. (1995). Cereal microspore culture. Review article. *Plant Sci.*, 109 : 1-12.
- Murashige, T. et Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15 : 473-497.
- 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.), Saaskatoon, 2-7 août, pp. 44-46.
- Touraev, A., Vicente, O. et Heberle-Bors, E. (1997). Induction of microspore embryogenesis by stress. *Trend in Plant Sci.*, 2 : 297-302.