

Résumé

La salinité est un stress abiotique limitant la production agricole au Maroc. La régénération par androgenèse d'haploïdes doublés tolérants à la salinité représente une technique prometteuse pour l'amélioration génétique des plantes cultivées.

Dans le présent travail, la culture *in vitro* d'anthers sous pression sélective a été d'abord réalisée pour étudier l'effet du stress salin sur la régénération de plantes HD. Trois générations P, G1 et G2 des trois variétés Asni, Arig et Tamelalt d'orge de printemps marocaines (*Hordeum vulgare* L.) ont été utilisées pour vérifier la stabilité génétique. La tolérance à la salinité a ensuite été évaluée par germination *in situ* des grains d'autofécondation et de leur descendance HD obtenus en présence ou en absence de stress salin. Enfin, le séquençage du gène *HVA1* a été effectué pour les différents génotypes et les séquences ont été corrigées et alignées par le logiciel DNA Baser Assembler puis comparée avec sa séquence de référence.

Après la mise en culture de 11343 anthers sur milieu d'induction ; 2259 calcs ou embryons ont été régénérés. Les taux d'induction des trois générations de chaque variété n'étaient pas significativement différents. Après transfert des formations callogènes ou/et embryogènes sur milieu de régénération additionné de concentrations croissantes de NaCl, allant de 0 à 13 g.L⁻¹, 170 plantes ont été obtenues. Asni (G1) semble la plus adaptée au stress salin, régénérant une plante à 12 g.L⁻¹ ; cependant cette plante est albinos. À la dose de 5 g.L⁻¹, une plante fertile pour chacune des générations Asni G1 et G2 est produite.

L'analyse *in situ* de la tolérance à la salinité a montré qu'à partir d'une concentration de NaCl de 10 g.L⁻¹, tous les paramètres classiques de l'évaluation de la germination sont diminués. Toutefois, les HD issus de la variété Tamelalt apparaissent plus tolérants à la salinité par rapport à leurs parents, présentant le meilleur taux de germination jusqu'à 15 g.L⁻¹.

Enfin, les marqueurs du polymorphisme de type SSR et RAPD nous ont permis de classer les HD dans les mêmes groupes que leurs parents. Par ailleurs, le séquençage du gène *HVA1* des génotypes étudiés a présenté 99 à 100% d'homologie avec la séquence de référence avec le numéro d'accès GenBank X78205.1.

En conclusion, les génotypes HD semblent plus tolérants à la salinité et pourraient être intégrés dans un schéma de sélection variétal. La séquence de leur gène *HVA1* a été établie et a été soumise à NCBI GenBank.

Mots clés : *Hordeum vulgare*. L, Androgenèse, pression sélective, haploïdes doublés, NaCl diversité génétique, SSR, RAPD, séquençage.

Abstract

Salinity is abiotic stress in arid and semi-arid regions of Morocco that limits agricultural production. In vitro androgenesis process under salt pressure is recognized as being a valuable method for quick production of salt stress tolerant doubled haploid lines.

The in vitro anthers culture under selective pressure first made it possible to investigate the effect of salt stress on in vitro androgenetic regeneration, and the production of salt tolerant barley doubled haploid lines. Salinity tolerance was then evaluated by in situ germination of self-fertilizing grains and their DH androgenic progeny obtained in the absence or the presence of salt stress. Finally, the *HVA1* gene was sequenced for the different genotypes. Moroccan barley varieties, Arig, Asni and Tamelalt were used A Parent (P), after one round of selfing (G1) and two (G2) to verify genetic stability.

Thus, after culture of 11,340 anthers on induction medium, 2,270 calluses or embryos were generated. According to the induction rate of these formations, the three generations of each variety were not significantly different, pointing out the genetic stability after two selfings. After transfer of the formations on regeneration medium supplemented by increasing concentrations of NaCl, ranging from 0 to 13 g.L⁻¹, 170 regenerants were produced. Asni (G1) showed to be the most salt tolerant, bearing maximal NaCl concentration of 12 g.L⁻¹, but the single regenerated plant obtained was albino. However, G1 and G2 generations of Asni regenerated one green plant each, with NaCl concentration of 5 g.L⁻¹.

Then, the in situ analysis of the tolerance to salinity showed that from a NaCl concentration of 10 g.L⁻¹, all the classic parameters of the evaluation of germination are reduced. However, DHs from the Tamelalt variety appear more tolerant of salinity compared to their parents, with the best germination rate up to 15 g.L⁻¹.

Finally, the SSR and RAPD polymorphism markers allowed us to classify DH in the same groups as their parents. Furthermore, the sequencing of the *HVA1* gene of the studied genotypes presented 99 to 100% similarity with the reference sequence with the GenBank accession number X78205.1.

In conclusion, the HD genotypes seem more tolerant to salinity and could be integrated into a varietal selection scheme. The sequence of their *HVA1* gene has been submitted to NCBI GenBank.

Key words: *Hordeum vulgare*. L, Androgenesis, selective pressure, doubled haploid, NaCl, genetic diversity, SSR, RAPD, sequencing.

N° d'ordre



Université Hassan 1^{er}
Centre d'Études Doctorales



Faculté des Sciences et Techniques
Settat

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention de grade de Docteur en Biologie

Formation Doctorale : Biologie, Santé et Environnement

Spécialité : Biotechnologies, génétique et biologie moléculaire

Sous le thème

Androgenèse en conditions de stress salin chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.) : Analyses *in situ* des haploïdes doublés et leurs parents

Etude de bases génétiques et moléculaires

Présentée par :

Samira HENTOUR

Soutenu le : 17 Octobre 2020

A la Faculté des Sciences et Techniques de Settat devant le jury composé de :

Pr. Ouafa LAMSAOURI	PES	Faculté des Sciences et Techniques, Settat	Présidente
Pr. Mostafa KANDIL	PES	Université Chouaib Doukkali. El jadida	Rapporteur
Pr. Souad CHERKAOUI	PES	Faculté des Sciences. Rabat	Rapporteur
Pr. Aziz BAIDANI	PH	Faculté des Sciences et Techniques, Settat	Rapporteur
Pr. Hafsa HOUMAIRI	PH	Faculté des Sciences et Techniques, Settat	Examinatrice
Pr. Malika FAKIRI	PES	Faculté des Sciences et Techniques, Settat	Directrice de thèse

Année Universitaire : 2019/2020

Samira HENTOUR

Androgenèse en conditions de stress salin chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.) : Analyses *in situ* des haploïdes doublés et leurs parents
Etude de bases génétiques et moléculaires

Année, 2020
Initiale Formation
doctorale BSE

Avant- propos

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur FAKIRI Malika, au sein du laboratoire d'agroalimentaire et santé, équipe Génétique et Biotechnologies de la faculté des Sciences et Techniques de Settat.

Ce travail comporte deux volets : le premier avait pour but d'étudier la réponse androgénétique sous pression sélective contrôlée des trois générations parent (P), génération (G1) et (G2) issues d'autofécondations successives, de deux variétés à deux rangs à savoir Asni et Tamelalt, et une variété à six rangs à savoir Arig 8. Le deuxième volet visait l'analyse de la diversité génétique chez les variétés d'autofécondation et les haploïdes doublés issus de la culture *in vitro* d'anthers des variétés Asni et Tamelalt.

Un stage d'un mois et demi portant sur la technique d'hapodiploïdisation, dans le cadre du projet PRAD a été effectué au sein du laboratoire de biotechnologie végétale de l'institut Genech à Lille-France , sous la direction de Monsieur Paul FORGEOIS, Adjoint de direction chargé des exploitations. Ce stage m'a permis de réaliser une partie expérimentale de ma thèse grâce à l'infrastructure et aux connaissances en biotechnologies végétales notamment la régénération des plantes haploïdes *in vitro* que nous partageons depuis le début de la collaboration entre nos deux laboratoires en 2010.

Dédicace

Je dédie ce travail

À

Mon très cher père et ma très chère mère

en témoignage de ma reconnaissance envers le soutien, les encouragements, la confiance qu'ils m'ont toujours accordé et tous les efforts qu'ils ont fait pour mon éducation ainsi que ma formation

À

Mon mari

pour son soutien moral et scientifique, ses sacrifices et ses encouragements durant toutes ces longues années de thèse

À

Mon cher frère, et mes chères sœurs

pour leur affection, compréhension et patience

À

tous ceux qui ont une relation de proche ou de loin avec la réalisation du présent rapport.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord exprimer ma profonde reconnaissance à ma directrice Madame FAKIRI Malika Professeure-chercheuse à la faculté des Sciences et Techniques, pour la confiance qu'elle m'a accordée en m'accueillant dans son laboratoire et pour ses qualités scientifiques et personnelles, sa patience, son soutien, et son écoute. Recevez, madame, mes plus sincères remerciements pour m'avoir encadrée et soutenue durant ces six années de thèse.

Je tiens à remercier tous les membres de jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger cette thèse.

Mes plus vifs et sincères remerciements s'adressent au Docteur EL GOUMI Younes, pour son temps, ses conseils amicaux et avisés. Votre soutien sans faille s'est avéré déterminant pour mener ce travail à terme et vos compétences scientifiques m'ont permis d'accomplir cette étude.

Mes remerciements s'adressent aussi à Madame le Professeur Ouafa LAMSAOURI, Professeur Sanah ESSAYAGH et Mme Hafsa HOUMAIRI pour leur soutien.

J'adresse toute ma reconnaissance au Professeur Paul FORGEOIS pour m'avoir accueilli pour un stage, dans son laboratoire à l'institut de Genech à Lille.

J'exprime mes plus sincères remerciements au personnel de ce laboratoire, Mélanie WOSTYN, Olivier CARON, Pauline DRUCKE, Morgane BRAY, Muriel PICOT, Myriam BLONDEL et Sophie FOUCHET.

Merci à tous les doctorants et doctorantes du laboratoire Agroalimentaire et Santé, Rabouan OUBAIDOU, Soukaina EL AANACHI, Said RAMMALI et Hanan HOUMAIID qui m'ont soutenu par leur présence ou leur participation de près ou de loin au cours de ce travail.

Enfin et surtout, mes remerciements vont à mon mari Jaafar et à ma famille pour leur aide, leur patience et leur soutien moral.

Résumé

La salinité est un stress abiotique limitant la production agricole au Maroc. La régénération par androgenèse d'haploïdes doublés tolérants à la salinité représente une technique prometteuse pour l'amélioration génétique des plantes cultivées.

Dans le présent travail, la culture *in vitro* d'anthères sous pression sélective a été d'abord réalisée pour étudier l'effet du stress salin sur la régénération de plantes HD. Trois générations P, G1 et G2 des trois variétés Asni, Arig et Tamelalt d'orge de printemps marocaines (*Hordeum vulgare* L.) ont été utilisées pour vérifier la stabilité génétique. La tolérance à la salinité a ensuite été évaluée par germination *in situ* des grains d'autofécondation et de leur descendance HD obtenus en présence ou en absence de stress salin. Enfin, le séquençage du gène *HVA1* a été effectué pour les différents génotypes et les séquences ont été corrigées et alignées par le logiciel DNA Baser Assembler puis comparée avec sa séquence de référence.

Après la mise en culture de 11343 anthères sur milieu d'induction ; 2259 calcs ou embryons ont été régénérés. Les taux d'induction des trois générations de chaque variété n'étaient pas significativement différents. Après transfert des formations callogènes ou/et embryogènes sur milieu de régénération additionné de concentrations croissantes de NaCl, allant de 0 à 13 g.L⁻¹, 170 plantes ont été obtenues. Asni (G1) semble la plus adaptée au stress salin, régénérant une plante à 12 g.L⁻¹ ; cependant cette plante est albinos. À la dose de 5 g.L⁻¹, une plante fertile pour chacune des générations Asni G1 et G2 est produite.

L'analyse *in situ* de la tolérance à la salinité a montré qu'à partir d'une concentration de NaCl de 10 g.L⁻¹, tous les paramètres classiques de l'évaluation de la germination sont diminués. Toutefois, les HD issus de la variété Tamelalt apparaissent plus tolérants à la salinité par rapport à leurs parents, présentant le meilleur taux de germination jusqu'à 15 g.L⁻¹.

Enfin, les marqueurs du polymorphisme de type SSR et RAPD nous ont permis de classer les HD dans les mêmes groupes que leurs parents. Par ailleurs, le séquençage du gène *HVA1* des génotypes étudiés a présenté 99 à 100% d'homologie avec la séquence de référence avec le numéro d'accès GenBank X78205.1.

En conclusion, les génotypes HD semblent plus tolérants à la salinité et pourraient être intégrés dans un schéma de sélection variétal. La séquence de leur gène *HVA1* a été établie et a été soumise à NCBI GenBank.

Mots clés : *Hordeum vulgare*. L, Androgenèse, pression sélective, haploïdes doublés, NaCl diversité génétique, SSR, RAPD, séquençage.

Abstract

Salinity is abiotic stress in arid and semi-arid regions of Morocco that limits agricultural production. In vitro androgenesis process under salt pressure is recognized as being a valuable method for quick production of salt stress tolerant doubled haploid lines.

The in vitro anthers culture under selective pressure first made it possible to investigate the effect of salt stress on in vitro androgenetic regeneration, and the production of salt tolerant barley doubled haploid lines. Salinity tolerance was then evaluated by in situ germination of self-fertilizing grains and their DH androgenic progeny obtained in the absence or the presence of salt stress. Finally, the HVA1 gene was sequenced for the different genotypes. Moroccan barley varieties, Arig, Asni and Tamelalt were used A Parent (P), after one round of selfing (G1) and two (G2) to verify genetic stability.

Thus, after culture of 11,340 anthers on induction medium, 2,270 calluses or embryos were generated. According to the induction rate of these formations, the three generations of each variety were not significantly different, pointing out the genetic stability after two selfings. After transfer of the formations on regeneration medium supplemented by increasing concentrations of NaCl, ranging from 0 to 13 g.L⁻¹, 170 regenerants were produced. Asni (G1) showed to be the most salt tolerant, bearing maximal NaCl concentration of 12 g.L⁻¹, but the single regenerated plant obtained was albino. However, G1 and G2 generations of Asni regenerated one green plant each, with NaCl concentration of 5 g.L⁻¹.

Then, the in situ analysis of the tolerance to salinity showed that from a NaCl concentration of 10 g.L⁻¹, all the classic parameters of the evaluation of germination are reduced. However, DHs from the Tamelalt variety appear more tolerant of salinity compared to their parents, with the best germination rate up to 15 g.L⁻¹.

Finally, the SSR and RAPD polymorphism markers allowed us to classify DH in the same groups as their parents. Furthermore, the sequencing of the HVA1 gene of the studied genotypes presented 99 to 100% similarity with the reference sequence with the GenBank accession number X78205.1.

In conclusion, the HD genotypes seem more tolerant to salinity and could be integrated into a varietal selection scheme. The sequence of their HVA1 gene has been submitted to NCBI GenBank.

Key words: *Hordeum vulgare*. L, Androgenesis, selective pressure, doubled haploid, NaCl, genetic diversity, SSR, RAPD, sequencing.

Table des matières

<i>Avant- propos</i>	<i>i</i>
<i>Dédicace</i>	<i>ii</i>
<i>Remerciements</i>	<i>iii</i>
<i>Résumé</i>	<i>iv</i>
<i>Abstract</i>	<i>v</i>
<i>Table des matières</i>	<i>vi</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>xi</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>xiii</i>
<i>Liste des photos</i>	<i>xv</i>
<i>Liste des annexes</i>	<i>xv</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>xvi</i>
<i>Liste des publications</i>	<i>xviii</i>
<i>Liste des prix</i>	<i>xviii</i>
<i>Liste des communications orales</i>	<i>xix</i>
<i>Liste des communications affichées</i>	<i>xxii</i>
<i>Introduction générale</i>	<i>1</i>
<i>Partie 1 : Revue bibliographique</i>	<i>5</i>
I. L'agriculture au Maroc.....	5
II. La céréaliculture	6
1. La croissance et les étapes de la vie d'une plante	10
2. La culture d'orge	12
.2.1 Taxonomie.....	12
.2.2 Histologie.....	13
.2.3 La valeur nutritive de l'orge.....	14
.2.4 Valeur économique et production mondiale et nationale de l'orge.....	15
3. La sécheresse et la salinisation des sols.....	16
.3.1 La salinisation des sols.....	16

.3.2	La réponse physiologique au stress salin.....	17
III.	Les biotechnologies végétales.....	18
1.	L'haplodiploïdisation	19
1.1.	L'histoire de la production des haploïdes doublés	20
1.2.	Les différentes techniques d'haplodiploïdisation	21
1.2.1.	Croisement interspécifique et intergénérique.....	21
1.2.2.	Gynogenèse.....	22
1.2.3.	Androgenèse	22
1.3.	Les facteurs influençant la culture <i>in vitro</i>	25
1.3.1.	Facteurs internes : génotype	26
1.3.2.	Facteurs externes	26
1.3.2.1.	Le stade de prélèvement des microspores.....	26
1.3.2.2.	Le prétraitement au froid.....	27
1.3.2.3.	Le prétraitement au mannitol	28
1.3.2.4.	Le prétraitement au froid et au mannitol	28
1.3.2.5.	Les milieux de culture	29
1.3.2.6.	Les sels minéraux.....	30
1.3.2.7.	Les substances organiques (source de carbone).....	30
1.3.2.8.	Les vitamines	31
1.3.2.9.	Les régulateurs de croissance.....	31
1.3.2.10.	L'éclairage :	32
1.3.2.11.	L'orientation de l'anthère	32
2.	L'albinisme	33
3.	Pression sélective et vitrovariants orientés	35
4.	La sélection assistée par marqueurs	37
4.1.	RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction).....	39
4.2.	AFLP (Random Amplified Length Polymorphism)	40
4.3.	RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	40
4.4.	SSR (single sequence repeat ou microsatellites)	41
5.	Le gène <i>HVA1</i>	42
<i>Partie 2 : Méthodologie et empirique</i>		44
<i>Chapitre II : la réponse androgénétique sous pression sélective contrôlée</i>		44

<i>I. Introduction</i>	44
<i>II. Matériel et méthodes</i>	45
1. Matériel végétal.....	45
2. Semis de plantes mères.....	45
3. Le prélèvement des épis.....	46
4. Le prétraitement au froid.....	47
5. La culture <i>in vitro</i>	47
5.1. Phase d'induction	47
5.2. Phase de régénération.....	48
<i>III. Résultats</i>	51
1. Induction.....	51
1.1. Effet du génotype	51
1.2. Effet du prétraitement au froid	53
2. Régénération.....	54
2.1. Effet du génotype	54
2.2. Effet du prétraitement.....	55
2.3. Effet du stress salin.....	56
3. Albinisme.....	58
3.1. Effet du prétraitement au froid	59
3.2. Effet du stress salin.....	60
<i>IV. Discussion et conclusion</i>	62
<i>Chapitre III : Evaluation de la tolérance à la salinité par germination in situ des grains androgénétiques et leurs parents d'autofécondation</i>	
	66
<i>I. Introduction</i>	66
<i>II. Matériel et méthodes</i>	67
1. <i>Matériel végétal</i>	67
2. <i>Conditions de croissance des plantes</i>	67
3. <i>Les paramètres mesurés</i>	68
3.1. <i>Le taux de germination</i>	68
3.2. <i>Longueur des racines et des épicotyles</i>	68

3.3.	<i>Taille de la plante</i>	68
3.4.	<i>La réversibilité de l'action du sel</i>	68
3.5.	<i>Le nombre de racines</i>	69
3.6.	<i>La teneur relative en eau</i>	69
4.	<i>Analyse statistique</i>	69
III.	<i>Résultats</i>	69
1.	<i>Le taux de germination final (GF %)</i>	70
2.	<i>La longueur des racines</i>	72
3.	<i>La longueur des épicotyles</i>	74
4.	<i>La taille de la plante</i>	76
5.	<i>Le nombre de racines</i>	78
6.	<i>La réversibilité de l'action du sel</i>	80
7.	<i>La teneur relative en eau (TRE)</i>	82
8.	<i>Classification ascendante hiérarchique (CAH) des génotypes</i>	84
IV.	<i>Discussion et conclusion</i>	85
	<i>Chapitre IV : Analyse de la diversité génétique des plantes haploïdes doublées et leurs parents d'autofécondation</i>	89
I.	<i>Introduction</i>	89
II.	<i>Matériel et méthodes</i>	90
1.	<i>Matériel végétal</i>	90
2.	<i>Extraction d'ADN génomique</i>	90
3.	<i>Contrôle de la qualité et la quantité d'ADN extrait</i>	91
4.	<i>Amplification d'ADN par PCR</i>	92
5.	<i>Analyse des produits PCR</i>	94
6.	<i>Analyse par dendrogramme</i>	95
7.	<i>Indice de polymorphisme (PIC) ou indice de diversité de Nei (H)</i>	95
8.	<i>Nombre efficace d'allèle</i>	95
9.	<i>Séquençage</i>	96
III.	<i>Résultats</i>	96

1. PCR	96
2. Les relations phylogénétiques entre les géotypes d'orge étudiés basées sur l'analyse des données SSR et RAPD	99
3. Séquençage.....	100
<i>IV. Discussion et conclusion</i>	102
<i>Conclusion générale et perspectives</i>	104
<i>Références bibliographiques</i>	106
<i>Annexe 1 : Variétés (Seddik et al. 2005)</i>	137
<i>Annexe 2 : Milieux de culture</i>	140
<i>Annexe 3 : Analyse qualitative et quantitative d'ADN</i>	141
<i>Annexe 4 : Amorces</i>	142
<i>Annexe 6 : diversité génétique</i>	144
<i>Annexe 7: Séquences alignées du gène HVA1 des plantes HD et leurs parents d'autofécondation</i>	145

Liste des tableaux

Tableau 1: Étapes de la vie d'une plante et échelles d'étude de la croissance et du développement	11
Tableau 2: Nombre d'anthères et d'embryons utilisés durant l'expérimentation.....	48
Tableau 3: Classification en fonction de taux d'induction des variétés d'orge en groupes homogènes, selon le test Duncan	52
Tableau 4 : Comparaison des moyennes de régénération des variétés d'orge par le test Duncan	55
Tableau 5: Taux de régénération et d'albinisme pour chaque génération et variété développé sur un milieu de régénération témoin ou salin	57
Tableau 6: Nombre de plantes vertes et albinos régénérées dans des conditions de contrôle et de prétraitement au froid, selon la variété (Tous stress salin confondus)	59
Tableau 7: Nombre de plantes chlorophylliennes et albinos régénérées en fonction de la concentration de NaCl.....	61
Tableau 8: Nombre de plantes vertes et albinos régénérés sous stress salin	62
Tableau 9: L'analyse de la variance (ANOVA) des paramètres étudiés chez les variétés d'orge des différents traitements	69
Tableau 10: Classification en fonction de taux de germination des variétés d'orge en groupes homogènes, selon le test Duncan	72
Tableau 11: Classification en fonction de la longueur des racines des variétés d'orge en groupes homogènes, selon le test Duncan.....	74
Tableau 12: Classification en fonction de la longueur des épicotyles des variétés d'orge en groupes homogènes, selon le test Duncan.....	76
Tableau 13: Classification en fonction de la taille des plantules des variétés d'orge en groupes homogènes, selon le test Duncan.....	78
Tableau 14: Classification en fonction de nombre de racines des variétés d'orge en groupes homogènes, selon le test Duncan	80
Tableau 15: Classification des variétés d'orge en groupes homogènes, selon le test de Duncan pour la réversibilité de l'action de NaCl.....	82
Tableau 16: Classification des variétés d'orge en groupes homogènes, selon le test de Duncan pour la teneur relative en eau	84

Tableau 17 : Composition du milieu réactionnel pour l'amplification par les SSR (volume final/ 25 µl).....	93
Tableau 18 : Composition du milieu réactionnel pour l'amplification par les RAPD 3, 4, 5 et 6 (volume final/ 25 µl)	94
Tableau 19: Cycles réactionnels des amorces et programme PCR.....	94
Tableau 20 : Nombre et poids moléculaire de marqueurs SSR résultant après amplification par les amorces	98
Tableau 21 : Résultats de l'alignement des séquences d'ADN par rapport la séquence de référence (GenBank: X78205.1)	102
Tableau 22: Composition des milieux de culture	140
Tableau 23: Dosage spectrophotométrique d'ADN purifié	141
Tableau 24 : Liste des amorces utilisées dans la technique PCR	142
Tableau 25: Matrice de distance génétique (distance euclidienne) entre les quatre génotypes d'orge issus de l'androgenèse et les trois variétés d'autofécondation selon la méthode de Ward (1963).	144

Liste des figures

Figure 1 : La production mondiale des céréales (Département de l’Agriculture des États-Unis 2018).....	7
Figure 2 : Les principaux producteurs de céréales dans le monde (Département de l’Agriculture des États-Unis 2018)	8
Figure 3 : Les 8 premiers exportateurs de céréales (Département de l’Agriculture des États-Unis 2018).....	8
Figure 4 : La production agricole globale au Maroc (Ministère de l’Agriculture, de la Pêche Maritime 2017).....	10
Figure 5 : Évolution des phases de croissance et des stades de développement du blé. (Hassani 1995).....	11
Figure 6 : Différences Orge à six rangs – Orge à deux rangs (Souilah 2009).	12
Figure 7 : Coupe longitudinale d’un grain d’orge (Guiga 2006)	13
Figure 8 : Coupe transversale des enveloppes, de la couche à aleurone et de l’endosperme amylicé d’un grain d’orge (Guiga 2006).	14
Figure 9 : Production d’orge en volume au niveau mondial de 2008/2009 à 2018/2019 (en millions de tonnes) (Statista 2019).....	15
Figure 10 : Les superficies récoltées, la production ainsi le rendement de l’orge au Maroc durant les années 2010 et 2017 (FAO 2017).....	16
Figure 11 : Les différentes alternatives de développement <i>in vitro</i> de microspores isolées (Seguí-Simarro, Nuez 2007)	24
Figure 12 : Méthodes d’obtention de HD chez les céréales qui ont recours à la culture <i>in vitro</i> (Brian P. Forster et al. 2007).....	25
Figure 13 : L’effet de l’orientation des anthères sur la production de cals à partir des microspores chez l’orge :	33
Figure 14 : Fiabilité de la sélection en utilisant des marqueurs simples et flanquants (Tanksley 1983).....	38
Figure 15 : Schéma expérimental de la pression sélective.....	49
Figure 16 : Effet du génotype sur l’induction androgénétique.	52
Figure 17 : Effet du prétraitement au froid sur l’induction pour chaque génotype.....	53
Figure 18 : Effet du génotype sur la régénération.....	54
Figure 19 : Taux de régénération R % par variété en fonction du prétraitement au froid.	56

Figure 20 : Taux d'albinisme par variété pour tous prétraitements et stress salins confondus.	58
Figure 21 : Taux d'albinisme par variété en fonction du prétraitement au froid.	60
Figure 22 : Taux d'albinisme par variété en fonction du stress salin.....	60
Figure 23 : Expérimentation utilisée pour le test de germination <i>in situ</i> des grains d'orge traités	68
Figure 24 : Effet du stress salin sur la germination final par génotype.....	71
Figure 25 : Longueur des racines en fonction du stress salin.	73
Figure 26 : Longueur des épicotyles par génotype en fonction de l'augmentation de la concentration de NaCl.....	75
Figure 27 : La taille de la plante par génotype en fonction du stress salin.	77
Figure 28 : Nombre de racines par génotype en fonction de la concentration en NaCl.	79
Figure 29 : Réversibilité de l'effet du NaCl à la concentration de 15 g.L ⁻¹	81
Figure 30 : L'effet du sel sur la teneur relative en eau.....	83
Figure 31 : Classification ascendante hiérarchique (CAH) des génotypes.	85
Figure 32 : Localisation de l'amorce Bmag210 sur le chromosome 6H (Rustgi et al. 2014) et de l'amorce HVA1 sur le chromosome 1H (R. K. Varshney et al. 2007).....	93
Figure 33 : Analyse de la distance génétique basée sur les données SSR et RAPD en utilisant le logiciel SPSS et en se basant sur les résultats du tableau 25 annexe 6.	99
Figure 34 : Chromatogramme de séquence d'un produit PCR amplifié par l'amorce HVA1 illustrée par le logiciel BioEdit.....	100
Figure 35 : Alignement des séquences du gène <i>HVA1</i> par le logiciel DNA Baser Assembler v5.....	100

Liste des photos

Photo 1: Culture sous serre des plantes mères à la faculté des Sciences et Technique de Settat	46
Photo 2: Stade de la microspore en fonction de la position du noyau par rapport au pore	46
Photo 3: Régénération de plantes (Décembre 2015 à l'institut de Genech, France).....	49
Photo 4: Plantules chlorophylliennes bien enracinées (Janvier 2016 à la FSTS)	50
Photo 5: Acclimatation des plantes androgénétiques (Janvier 2016 à la FSTS).....	50
Photo 6: Structures morphogénétiques obtenues en androgenèse.....	51
Photo 7: Fréquence de production de plantes albinos par culture <i>in vitro</i> d'anthères.....	58
Photo 8: Germination des grains d'orge après 5 jours à différentes concentrations de NaCl.	70
Photo 9: Analyse des produits PCR sur gel d'agarose à 1,2 % (amplification par l'amorce RAPD3).....	97

Liste des annexes

Annexe 1 : Variétés (Seddik <i>et al.</i> 2005).....	137
Annexe 2 : Milieux de culture	140
Annexe 3 : Analyse qualitative et quantitative d'ADN	141
Annexe 4 : Amorces	142
Annexe 5 : Séquence du gène <i>HVA1 H.vulgare</i> (Himalaya).....	143
Annexe 6 : diversité génétique	144
Annexe 7: Séquences alignées du gène <i>HVA1</i> des plantes HD et leurs parents d'autofécondation.....	145

Liste des abréviations

% : Pour cent

°C : Degré Celsius

2-4 D : Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

A4 : Tamelalt HD4

A5 : Tamelalt HD5

A6 : Tamelalt HD6

A8 : Asni HD8

ABA : Acide Abscissique

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Ae : Nombre efficace d'allèle

AFLP : Random Amplified Length Polymorphism

ANA : Acide Naphtalèneacétique

As : Asni

BAP : Benzyl Amino Purine

BET : Bromure d'Ethidium

pb : paire de bases

CIV : Culture *In Vitro*

CTAB : Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

EDTA : Éthylène Diamine Tétra Acétique

FAO : Food and Agriculture Organisation

G1 : Première Génération d'autofécondation

G2 : Deuxième Génération d'autofécondation

h : heure

H. vulgare : *Hordeum vulgare*

HD : Haploïdes Doubées

HVA1 : *Hordeum Vulgare* Actine1

Kg : kilogramme

LEA : Late Embryogenesis Abundant

M : Mole

mg.L⁻¹ : milligramme par Litre

mm : millimètre

mM : milli Molaire

Mt : Million de tonnes

NaCl : Chlorure de Sodium

O : Arig 8

P : Parent

PCR : Réaction en Chaîne par Polymérisation (Polymerase Chain Reaction)

PIC : Indice de Polymorphisme (Polymorphisme Informative Content)

Qx : Quintaux

RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP : Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction

SAM : Sélection Assistée par Marqueurs

SAU : Surface Agricole Utile

SSR : Simple sequence repeats

TE : Tris EDTA

Tm : Tamelalt

Liste des publications

S. HENTOUR, Y. El Goumi, M. Fakiri, O. Lamsaouri, M. Benbachir, M. Benchekroun. Effect of cold and mannitol pretreatment on the androgenesis and gynogenesis in spring barley varieties (*Hordeum vulgare* L.). Journal of materials and environmental science. 7 (7) (2016) 2583-2594. Article original (Indexé).

Samira Hentour, Younes El Goumi, Rabouan Oubaidou, Soukaina El Aanachi, Sanah Essayagh, Ouafa Lamsaouri, Hafsa Houmairi, Malika Fakiri. Results of In vitro androgenesis under increasing salinity conditions for three Moroccan spring barley varieties (*Hordeum vulgare* L.). Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 10 (1) (2020) 112-116. doi: 10.15414/jmbfs.2020.10.1.112-116. Article original (Indexé).

Samira Hentour*, Rabouan Oubaidou, Younes El Goumi, Malika Fakiri. Evaluation of the effect of salinity on seed germination in two Moroccan spring barley varieties and their doubled haploïdes offspring (*Hordeum vulgare* L.). En cours de soumission.

Samira Hentour*, Malika Fakiri. Analyse de la diversité génétique des plantes haploïdes doublées et leurs parents d'autofécondation. En cours de rédaction pour soumission.

Liste des prix

1^{er} prix de la meilleure communication orale lors 1A5^{ème} édition de la Journée Doctorant, CEDoc Sciences et Techniques, Université Hassan 1^{er}, FST Settlat, le 30 Mars 2017.

Liste des communications orales

Samira HENTOUR, Younes EL GOUMI, Malika FAKIRI, Ouafa LAMSAOURI, Mounisif BENCHEKROUN. **Effet du prétraitement au froid et au mannitol, sur la réponse androgénétique chez l'orge de printemps *Hordeum vulgare***. 3^{ème} édition de la Journée Doctorant, CEDoc Sciences et Techniques, Université Hassan 1^{er}, FST Settat, le 16 Juin 2015.

Samira HENTOUR, Rabouan OUBAIDOU, Meryem BENBACHIR, Ouafa LAMSAOURI, Malika FAKIRI. **Évaluation de la capacité androgénétique en conditions salines de trois variétés marocaines d'orge de printemps (*Hordeum vulgare*)**. 2^{ème} édition du Symposium : Santé - Environnement –Développement durable, Université Chouaib Doukali, Faculté des Sciences El Jadida, le 25 Février 2017.

Samira HENTOUR, Younes EL GOUMI, Rabouan OUBAIDOU, Meryem BENBACHIR, Sanah ESSAYAGY, Ouafa LAMSAOURI, Malika FAKIRI. **Study of the salt tolerance of three Moroccan Spring Barley Varieties, Asni, Tamelalt and Arig (*Hordeum vulgare*. L)**. 5^{ème} édition de la Journée Doctorant, CEDoc Sciences et Techniques, Université Hassan 1^{er}, FST Settat, le 30 Mars 2017.

Rabouan OUBAIDOU, **Samira HENTOUR**, Younes EL GOUMI, Ouafa LAMSAOURI, Malika FAKIRI, Sanah ESSAYAGH. **Effect of 2,4-D hormonal pretreatment on the androgenetic and gynogenetic responses of Moroccan barley varieties (*Hordeum vulgare* L.)**. The first international conference on Biotechnology: perspectives Beyond 2020, Université Sultan Moulay Slimane, Faculté plydisciplinaire, Beni mellal, le 18- 19 Décembre 2017.

Samira HENTOUR, Younes EL GOUMI, Rabouan OUBAIDOU, Soukaina EL ANAACHI, Sanah ESSAYAGY, Malika FAKIRI. **Evaluation of the effect of salinity on seed germination in two Moroccan barley varieties (*Hordeum vulgare*. L)**. 6^{ème} édition de la Journée Doctorant, CEDoc Sciences et Techniques, Université Hassan 1^{er}, FST Settat, le 5 Avril 2018.

Rabouan OUBAIDOU, **Samira HENTOUR**, Younes EL GOUMI, Sanah ESSAYAGH, Malika FAKIRI, Ouafa LAMSAOURI. **Effect of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid hormonal pretreatment on the callus formation and doubled haploid production in five Moroccan barley varieties (*Hordeum vulgare L.*)**. 6ème Edition de la Journée Doctorant, CEDoc Sciences et Techniques de l'Université Hassan 1er, FST Settat, 5 avril 2018.

Rabouan OUBAIDOU, **Samira HENTOUR**, Younes EL GOUMI, Sanah ESSAYAGH, Ouafa LAMSAOURI, Malika FAKIRI. **A comparative study of the effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid hormonal pretreatment and cold pretreatment on the gynogenetic response of five Moroccan barley varieties (*Hordeum vulgare L.*)**. The fourth American international agricultural sciences conference (AMAS IV), Agropolis Meknes, may 9-11, 2018.

Samira HENTOUR, Younes El GOUMI, Rabouan OUBAIDOU, Meryem MAISKI, Soukaina EL AANACHI, Sanah ESSAYAGH, Ouafa LAMSAOURI, Hafsa HOUMAIROU, Malika FAKIRI. **Salt stress effect on seed germination in parent and doubled haploïdes Moroccan spring barley varieties (*Hordeum vulgare L.*)**. 1st International Congress of Green Biotechnology «Biotechnology for Sustainable Agriculture» Polydisciplinary Faculty of Taroudant IBN ZOHR University, from 01 to 03 Novembre, 2018.

Soukaina EL AANACHI, Hinde AASSILA, Chawki BENSOUICI, Said RAMMALI, **Samira HENTOUR**, Bouchaib BENCHARKI, Khadija DARI. **Phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity of leaves of marrubium vulgare**, 1st International Congress of Green Biotechnology «Biotechnology for Sustainable Agriculture» Polydisciplinary Faculty of Taroudant IBN ZOHR University, from 01 to 03 Novembre, 2018.

Soukaina EL AANACHI, Hinde AASSILA, Chawki BENSOUICI, Said RAMMALI, **Samira HENTOUR**, Bouchaib BENCHARKI, Khadija DARI. **Evaluation of antimicrobial, antioxidant and sun protection factor activities of leaves of *Marrubium vulgare***, *The Second International Symposium Medicinal Plants and Materials (MPM-2019)*, Tozeur-TUNISIE, 15-19 Février 2019

Samira HENTOUR, Younes EL GOUMI, Rabouan OUBAIDOU, Soukaina EL AANACHI, Sanah ESSAYAGH, Ouafa LAMSAOURI, Hafsa HOUMAIROU, Malika FAKIRI. **Selection of Moroccan barley varieties of *Hordeum vulgare* L. tolerant to salinity using anthers culture.** 5^{ème} Journée Scientifique Nationale de l'Environnement & de la Santé, Sous le thème : L'AGRO-ALIMENTAIRE AU SERVICE DE L'ENVIRONNEMENT & DE LA SANTE, Université Hassan II, Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia, le 18 Avril 2019.

Soukaina EL AANACHI, Hinde AASSILA, Chawki BENSOUICI, Said RAMMALI, **Samira HENTOUR**, Bouchaib BENCHARKI, Khadija DARI. **Phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity of leaves of *Origanum majorana*.** 7^{ème} séminaire international des plantes aromatiques et médicinales « SIPAM 2019 » à ELJADIDA – Maroc, 17-19 Avril 2019

Soukaina EL AANACHI, Hinde AASSILA, Chawki BENSOUICI, Said RAMMALI, **Samira HENTOUR**, Bouchaib BENCHARKI, Khadija DARI. **Antimicrobial, antioxidant and sun protection factor activities of leaves of *Marrubium vulgare*,** *The Fourth International Congress “Microbial Biotechnology for Development” (MICROBIOD 4)* Agadir, 24-26 Avril 2019

Rabouan OUBAIDOU, **Samira HENTOUR**, Younes EL GOUMI, Sanah ESSAYAGH, Chafika HOUASLI, Malika FAKIRI, Ouafa LAMSAOURI. **Morpho-physiological characterization of Doubled Haploid genotypes of barley under salt stress.** 7^{ème} édition de la journée doctorant du CEDoc Sciences et Techniques de l'Université Hassan 1^{er}, FST Settat, 02 Mai 2019.

Liste des communications affichées

Samira HENTOUR, Younes EL GOUMI, Malika FAKIRI, Ouafa LAMSAOURI, Mounisif BENCHEKROUN. **Androgenèse et gynogenèse chez l'orge (*Hordeum vulgare L*), variété : Asni et Tamelalt.** 2^{ème} édition de la Journée Doctorant, CEDoc Sciences et Techniques, Université Hassan 1^{er}, FST Settât, le 12-13 Février 2014.

Samira HENTOUR, Malika FAKIRI, Ouafa LAMSAOURI. **Effet du prétraitement au froid et au mannitol sur l'androgenèse chez des variétés marocaines d'orge de printemps.** 3^{ème} édition de l'école-recherche, sous le thème : Biotechnologie, Biodiversité ? Produits de Terroirs & Valorisation. Laboratoire Biotechnologie & Valorisation des Ressources Naturelles (LBVRN), Université Ibn Zohr, Faculté des Sciences, Agadir, du 02 au 04 Juin 2015.

Samira HENTOUR, Malika FAKIRI, Ouafa LAMSAOURI. **Effet du stress salin sur la réponse androgénétique de variétés marocaines d'orge de printemps.** Colloque international de l'Université Hassan 1^{er} « Substance naturelles : Stress et métabolismes cellulaires, Université Hassan 1^{er}, FST Settât, Le 15-16 Décembre 2016.

Samira HENTOUR, Younes EL GOUMI, Rabouan OUBAIDOU, Meryem BENBACHIR, Sanah ESSAYAGY, Ouafa LAMSAOURI, Malika FAKIRI. **Effet du stress salin sur la réponse androgénétique de variétés marocaines d'orge de printemps (*HORDEUM VULGARE*).** 5^{ème} édition de la Journée Doctorant, CEDoc Sciences et Techniques, Université Hassan 1^{er}, FST Settât, le 30 Mars 2017.

Soukaina ELAANACHI, Hind AASSILA, Said RAMMALI, **Samira HENTOUR**, Saloua KHATIB, Bouchaïb BENCHERKI, Khadija DARI, **Study of antifungal activity of flavonoids extracted from leave of *Marrubium vulgare*, International Conference on Biotechnology - Université Sultan Moulay Sliman Beni Mellal, December 18-19 2017.**

Soukaina ELAANACHI, Saloua. KHATIB, Hind AASSILA, Said RAMMALI, **Samira HENTOUR**, Younes EL GOUMI, Bouchaib BENCHARKI, Khadija DARI. **Chemical composition and antibacterial activity of aqueous and organic extracts from leave of *Marrubium vulgare***, Séminaire international sur les plantes médicinales - l'Université Echahid Hamma Lakhdar, El-Oued Algérie du 17-18 Janvier 2018.

Soukaina EL AANACHI Said Rammali, Hind AASSILA, **Samira HENTOUR**, Younes EL GOUMI, Khadija DARI. **Recherche de l'activité antimicrobienne et antioxydant des souches d'actinomycètes isolées à partir du sol**, 6ème Edition de la Journée Doctorant FST – SETTAT, 5 Avril 2018

Soukaina EL AANACHI, Said RAMMALI, Hind AASSILA, **Samira HENTOUR**, Younes EL GOUMI, Khadija DARI. **Antimicrobial, antioxidant and sun protection factor activities of leaves of *marrubium vulgare***, 7eme édition de la journée doctorant du CEDoc Sciences et Techniques de l'Université Hassan 1er, FST Settata, 02 Mai 2019.

Rabouan OUBAIDOU, **Samira HENTOUR**, Younes EL GOUMI, Sanah ESSAYAGH, Rachid ABOUTAYEB, Chafika HOUASLI, Malika FAKIRI, Ouafa LAMSAOURI. **Sodium chloride effect on growth and physiology of doubled haploid genotypes of barley**. LA5^{ème} Journée Scientifique Nationale de l'Environnement & de la Santé, à la faculté des sciences et techniques de Mohammedia, 18 Avril 2019.

Introduction générale

L'orge (*Hordeum vulgare* L.) est une céréale à paille très importante, riche en hormones, fibres et vitamines. Utilisée dans l'alimentation animale et humaine, elle représente 15 % de la consommation mondiale après le blé, le riz et le maïs ((Horsley, Franckowiak, Schwarz 2009). Elle est cultivée surtout dans les régions semi-arides qui sont caractérisées par une saison sèche s'étendant sur la plus grande partie de l'année et une saison humide avec de faibles précipitations et contribue ainsi à la valorisation des sols marginaux et l'amélioration de la production végétale et animale.

On distingue deux qualités d'orge : l'orge fourragère, destinée à l'alimentation animale et l'orge brassicole (Horsley, Franckowiak, Schwarz 2009). Après avoir subi quelques transformations, les grains d'orge peuvent faire partie de nos plats en cuisine. Toutefois de nombreuses contraintes, biotiques (pucerons, virus, etc) ou abiotiques (stress salin, sécheresse, etc) menacent la production d'orge.

Au cours du cycle végétatif, les plantes subissent les conditions du milieu ambiant dans lequel elles vivent. Elles réagissent en s'adaptant à la variation de ces conditions lorsqu'elles deviennent défavorables. Dans les milieux arides et semi-arides, les stress abiotiques imposent des limites au développement de la plante. La résistance à ces stress est dépendante du génotype qui développe des mécanismes morphologiques, physiologiques et/ou biochimiques pour échapper (esquiver), éviter ou tolérer la contrainte (Levitt 1980).

La salinité, particulièrement la présence de concentrations élevées en chlorure de sodium dans le sol ou dans l'eau, est l'une des contraintes abiotique qui limite le rendement agricole d'orge et les autres céréales comme le blé, le riz et le maïs (Labidi 2017). En condition de contrainte saline, les plantes subissent un stress hydrique dû à l'augmentation des forces de rétention de l'eau dans le sol.

En effet, La forte accumulation des sels autour des racines les empêche de capter l'eau, ce qui entraîne une baisse du potentiel hydrique de la plante. Le manque d'eau provoque alors un stress osmotique au niveau des cellules et des tissus se traduisant par l'augmentation de la concentration en solutés et en ions dans le milieu intracellulaire. La toxicité ionique résulte de l'assimilation excessive des ions Na^+ et Cl^- par la plante.

La croissance d'une plante sous la contrainte saline dépend de sa capacité à rétablir son propre équilibre ionique. En effet, la concentration en Na^+ et Cl^- au niveau du cytosol est

maintenue faible par d'une part, la régulation de l'assimilation de ces ions, et d'autre part, par leur compartimentation au niveau de la vacuole et par leur exclusion extracellulaire. L'accumulation des ions augmente leur concentration dans le cytosol jusqu'à un niveau toxique (Mouhaya 2008).

Par ailleurs, l'effet de la salinité sur la photosynthèse se manifeste essentiellement par la réduction de l'assimilation du CO₂, la conductance stomatique et le ralentissement de l'activité du transport des électrons du photosystème II. La réduction de la photosynthèse par la salinité est l'une des causes majeures de la limitation de la croissance et de la productivité végétale. Dans ce sens, les mesures de la photosynthèse sont souvent utilisées dans les études d'adaptations des plantes à différentes contraintes du milieu, telle que la salinité (Farissi et al. 2014).

Pour surmonter ce problème, la culture de tissus végétaux joue un rôle important dans la production de plantes agricoles et ornementales et dans leur manipulation pour améliorer leurs performances agronomiques. Le choix du matériel végétal et l'amélioration des techniques de production sont des facteurs déterminants pour confronter cette situation (Guasmi et al. 2010). Les biotechnologies apportent ainsi, des nouvelles techniques permettant d'augmenter la tolérance ou la résistance à la salinité et à la sécheresse et de réduire le cycle végétatif.

La culture *in vitro* de cellules et de tissus végétaux a suscité un intérêt considérable ces dernières années car elle fournit les moyens d'étudier les processus physiologiques et génétiques des plantes en plus d'offrir la possibilité d'aider à la sélection de variétés améliorées en augmentant la variabilité génétique.

D'autres stratégies de sélection basées sur l'amélioration génétique ont ainsi été développées. Elles sont basées sur l'utilisation des haplométhodes par culture *in vitro* d'anthers (androgenèse) ou d'ovaires non fécondés (gynogenèse) ou par croisement interspécifique (Chlyah H. et al. 2001).

La culture *in vitro* chez les végétaux est un ensemble de techniques utilisées pour permettre l'entretien ou la croissance de cellules, tissus ou organes de plantes, dans des conditions de stérilité et sur un milieu de culture de composition définie, autant pour des fins de recherche que pour des applications commerciales. Chez les végétaux supérieurs, de structure généralement diploïde, l'haplométhode consiste à détourner d'une vocation sexuée des gamètes, ne portant qu'un seul stock chromosomique, par une dédifférenciation, et à leur faire prendre une voie de type sporophytique.

Ajoutons que l'haplodiploïdisation permet de réduire, non seulement le nombre de cycles d'autofécondation nécessaires pour la sélection du caractère intéressant par rapport aux méthodes classiques d'amélioration (Slama-Ayed, Slim-Amara 2007) mais aussi de fixer rapidement une lignée à partir de parents hétérozygotes et de faire réapparaître parfois, des caractères récessifs intéressants. Soulignons que l'androgenèse, technique de production d'haploïdes doublés à partir de la culture *in vitro* d'anthères au stade uninucléés en passant par le stade embryon pour avoir des lignées homozygotes pures peut être source de variabilité et d'expression nouvelle du génome telle que la tolérance au stress salin.

Le projet engagé dans cette étude, tente donc de statuer sur l'intérêt de cette méthode d'androgenèse, pour améliorer la tolérance à la salinité chez l'orge. Il comprend :

Étape *in vitro* :

- Analyse de la tolérance à la salinité des variétés Arig, Asni et Tamelalt et de leur descendance d'autofécondation par la technique d'androgenèse.

Étape *in situ* :

- Analyse de la tolérance à la salinité par germination *in situ* des grains androgénétiques HD et de leurs parents d'origine.

Étape moléculaire

- Évaluation de la diversité génétique des génotypes d'orge par techniques PCR et séquençage

Notre travail est donc subdivisé en quatre chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique concernant l'ensemble des données nécessaires à la compréhension des objectifs fixés.
- Le deuxième chapitre est réservé à l'étude de la réponse androgénétique des trois variétés d'orge de printemps marocaines (*Hordeum vulgare L.*) sous pression sélective contrôlée. Ainsi, des doses croissantes de NaCl seront ajoutées au milieu de régénération contenant des cals afin de les accoutumer à ce stress et de régénérer des plantes.
- Le troisième chapitre présenté ici traitera l'évaluation de la tolérance à la salinité par germination *in situ* des grains pour tenter de comprendre si les potentialités de tolérance au cours du processus de germination différencieraient entre les plantes androgénétiques HD et parentales

- Le dernier chapitre portera sur l'étude de la diversité génétique à l'aide des SSR et RAPD pour suivre la transmission héréditaire au moyen de ces marqueurs. Le séquençage du produit PCR du gène *HVA1*, permettra la comparaison des différentes séquences générées par cette technique. Cette information serait très utile pour affirmer si la culture *in vitro* sous pression sélective est vecteur de malléabilité et de plasticité du génome.

Partie 1 : Revue bibliographique

I. L'agriculture au Maroc

L'agriculture a été toujours un secteur stratégique pour le développement socio-économique du Maroc qui dispose d'un potentiel agricole considérable à mettre en valeur. En effet, de par sa situation géographique, le Maroc dispose d'une diversité écologique (plaines fertiles, zones humides, zones côtières, microclimats, zones montagneuses, zones semi-arides et arides, désert, etc.) permettant une offre variée de possibilités de productions végétales (dont les cultures hors saison) et animale. (Ministère d'Agriculture et de Pêche Maritime, 2000). La surface agricole est estimée à 8 700 000 hectares (12,25 % de la superficie totale du pays) (AgriMaroc 2016b).

La campagne agricole 2015-2016 a été caractérisée par des conditions climatiques particulières : un sérieux déficit pluviométrique accentué par une mauvaise répartition spatiale et temporelle ainsi qu'une augmentation des températures durant l'automne, période de démarrage et de croissance des céréales.

En effet, avec 198.7 mm, soit un déficit de 42.7 % par rapport à une campagne moyenne et de 45.5 % par rapport à la campagne précédente. La campagne 2015-2016 a affiché le volume pluviométrique le plus faible des 30 dernières années à date.

En outre, en termes agro-climatique, la campagne agricole 2015/16 a connu 98 jours sans pluies durant la période novembre-février (cycle de croissance des céréales), soit la période sèche la plus longue. De plus, durant cette période, les températures étaient supérieures de 2,7° à celle enregistrées en 2014/15 et de 2 à 3° par rapport à une année moyenne. La combinaison de ces conditions a eu des effets négatifs sur l'installation et le développement des cultures céréalières (Ministère d'Agriculture et de Pêche Maritime 2016).

Cependant, la production agricole est largement affectée par des conséquences du changement climatique (une pluviométrie irrégulière, des sécheresses fréquentes et la salinité) à cause de sa situation géographique qui est marquée par des influences sahariennes en plus de la pauvreté et la mauvaise gestion des ressources naturelles. Pour faire face à ces problèmes, le département de l'agriculture a adopté en avril 2008 une nouvelle stratégie de développement agricole appelé Plan Maroc Vert (PMV). Cette stratégie a pour but de relancer l'économie du secteur agricole en se basant sur l'augmentation rapide et focalisée de la productivité céréalière.

Le PMV s'articule autour de deux piliers :

- Le premier pilier porte sur le développement d'une agriculture moderne et à haute valeur ajoutée/haute productivité répondant aux règles du marché en s'appuyant sur les investissements privés, à travers le financement de 1000 projets tant dans la production que dans les industries agro-alimentaires d'un coût total de 10 à 15 milliards de Dh par an.
- Le deuxième pilier concerne l'accompagnement solidaire de la petite agriculture, à travers l'amélioration des revenus des agriculteurs les plus précaires, notamment dans les zones enclavées (Toumi Larbi 2008).

L'agriculture d'une manière générale est un secteur porteur au Maroc, malgré les aléas climatiques et les cultures sont majoritairement céréalières.

II. La céréaliculture

Les céréales constituent la ressource alimentaire la plus importante au monde à la fois pour la consommation humaine que pour l'alimentation de bétail. Les céréales regroupent des plantes de la famille des Graminées ou Poacées et sont dénommées céréales majeures (blé, riz et maïs), céréales secondaires (Orge, sorgho, avoine, mil, seigle, triticale, teff). Selon les dernières statistiques de la FAO et du département de l'agriculture des États-Unis (USDA), la production mondiale de céréales pour l'année 2018 est de 2,600 milliards de tonnes, soit son niveau le plus bas depuis trois ans (FAO 2019; Département de l'Agriculture des États-Unis 2018) (Figure 1).

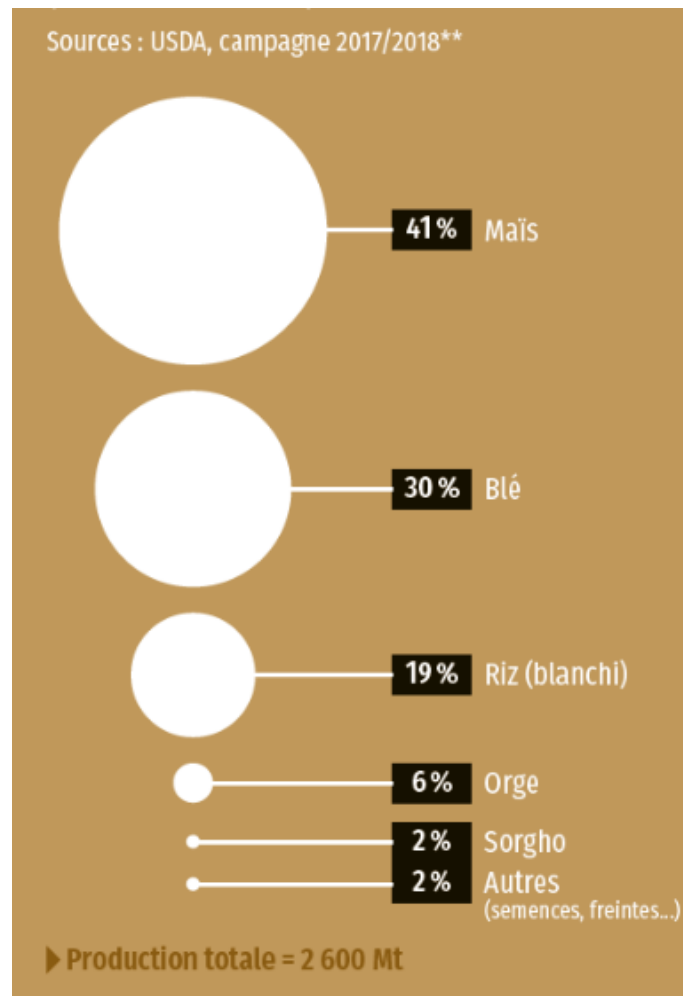


Figure 1 : La production mondiale des céréales (Département de l'Agriculture des États-Unis 2018)

En 2018/2019, 700 millions d'hectares de céréales ont été cultivés dans le monde, soit 49 % des terres arables, 14 % de la surface agricole mondiale et 5 % des terres émergées du monde et 2,6 milliards de tonnes de céréales ont été produites (Département de l'Agriculture des États-Unis 2018). La Chine est le premier pays producteur de céréales au monde suivie des États-Unis, la production totale des céréales dans ces pays est de 499 et 437 Mt respectivement. Comme la Chine a l'une des plus grandes populations du monde, elle doit donc maintenir son niveau de production pour assurer la satisfaction de la demande des céréales dans le pays, mais les dernières statistiques ont montré que ce pays a dépassé le niveau de production de la demande locale au niveau de l'exportation hors du pays (Figure 2).

Source : USDA, campagne 2017/2018**

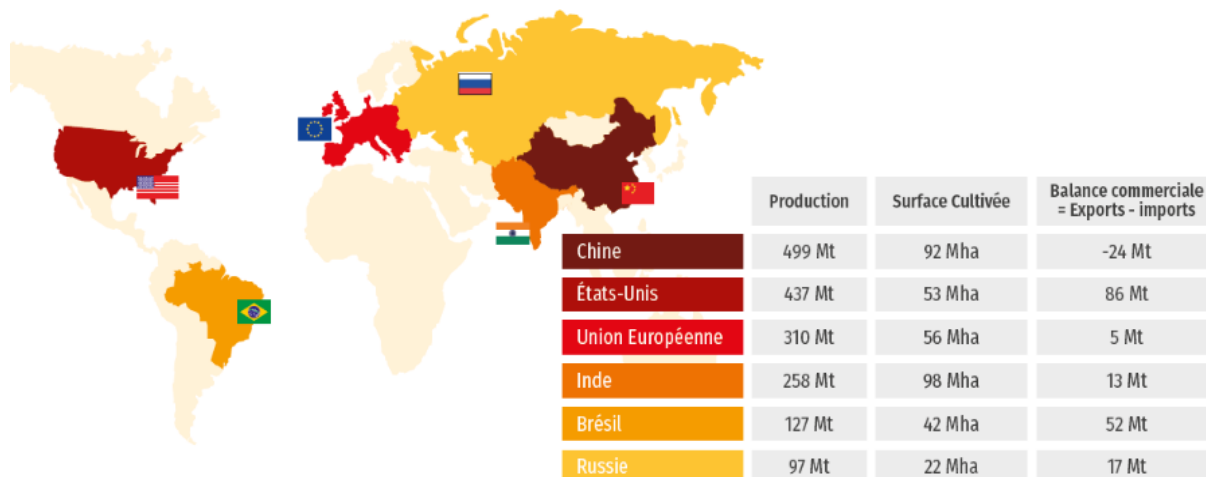


Figure 2 : Les principaux producteurs de céréales dans le monde (Département de l’Agriculture des États-Unis 2018)

Près de 420 millions de tonnes de céréales ont été échangés dans le monde. La valeur des échanges de céréales s'est élevée à 94 milliards de dollars (Département de l’Agriculture des États-Unis 2018).

Source : Eurostat / USDA, campagne 2017/2018**
France : commerce intra-communautaire compris

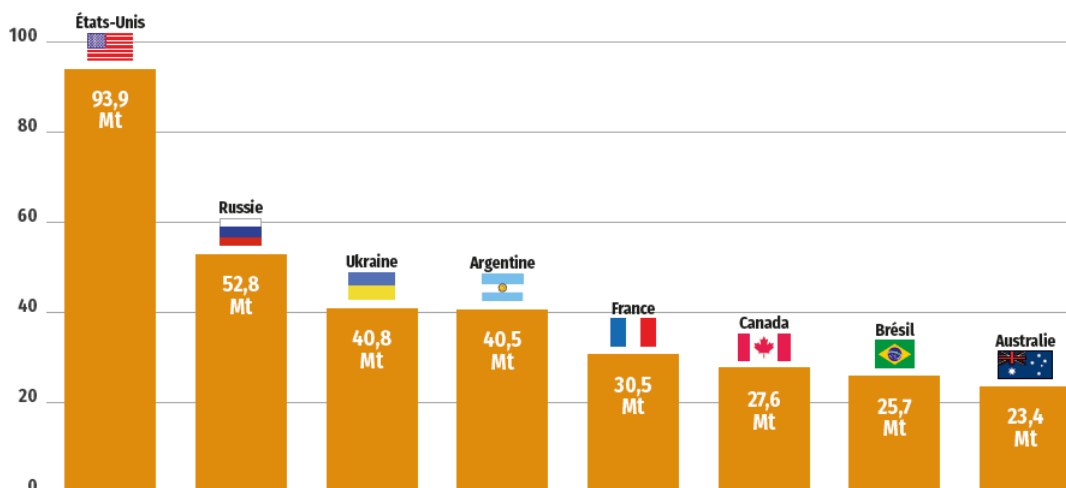


Figure 3 : Les 8 premiers exportateurs de céréales (Département de l’Agriculture des États-Unis 2018)

Le ministère de l’Agriculture fait le point sur la céréaliculture, une des filières stratégiques pour le secteur agricole au Maroc (AgriMaroc 2016a). Elle constitue la principale

activité au niveau des zones rurales du Maroc. En effet, dans la région de Chaouia-Ouardigha l'activité agricole est largement dominée par les céréales.

D'une superficie de près de 8,7 millions d'hectares, la surface agricole utile (SAU) est forte d'une richesse en systèmes agro-climatiques qui lui permet de produire une très large gamme de produits agricoles. L'importance de la superficie des céréales (52 % de la SAU) ainsi que la jachère (20 % de la SAU), témoignent des énormes possibilités d'intensification et de reconversion. L'extension de la superficie céréalière s'est faite parfois sur des terres marginales rendant l'activité agricole encore plus précaire dans ces zones. La dominance de la SAU par les céréales rend l'agriculture faiblement diversifiée est par conséquent plus vulnérable aux aléas climatiques avec toutes ses conséquences sur la variabilité de la production et de la croissance du secteur (Ministère de l'agriculture et de la pêche maritime 2014).

Pour transformer cette situation, le Plan Maroc Vert prévoit un ambitieux programme de reconversion des terres vers des utilisations plus valorisantes notamment l'arboriculture fruitière et les plantations pastorales.

Ces potentiels sont en outre suggérés par les différentiels de rentabilité de la terre utilisée : alors que les céréales accaparent 52 % de la SAU et ne participent à la valeur globale de la production agricole qu'à hauteur de 18 %, le maraîchage, avec seulement 3 % de la SAU, contribue à hauteur de 21 % de la production agricole globale (Ministère de l'Agriculture, de la Pêche Maritime 2017).

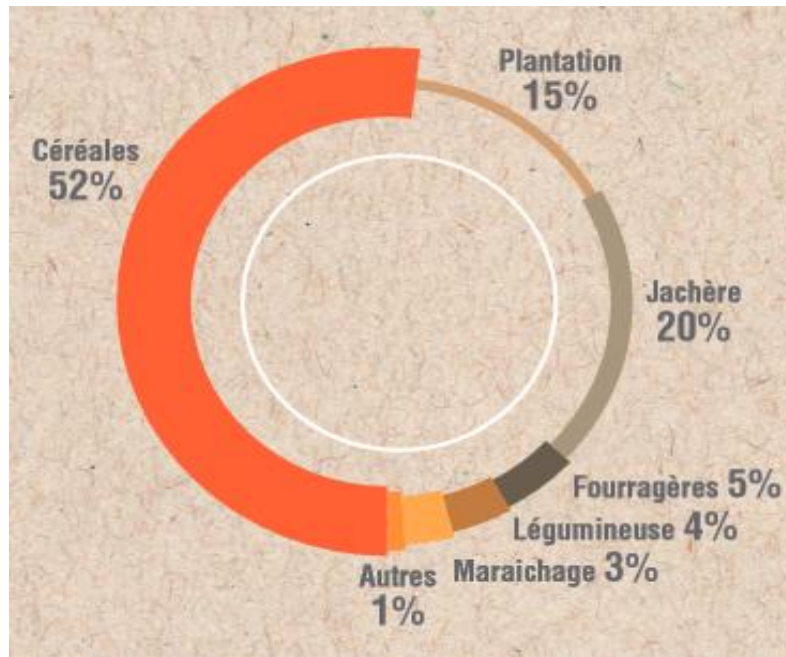


Figure 4 : La production agricole globale au Maroc (Ministère de l’Agriculture, de la Pêche Maritime 2017)

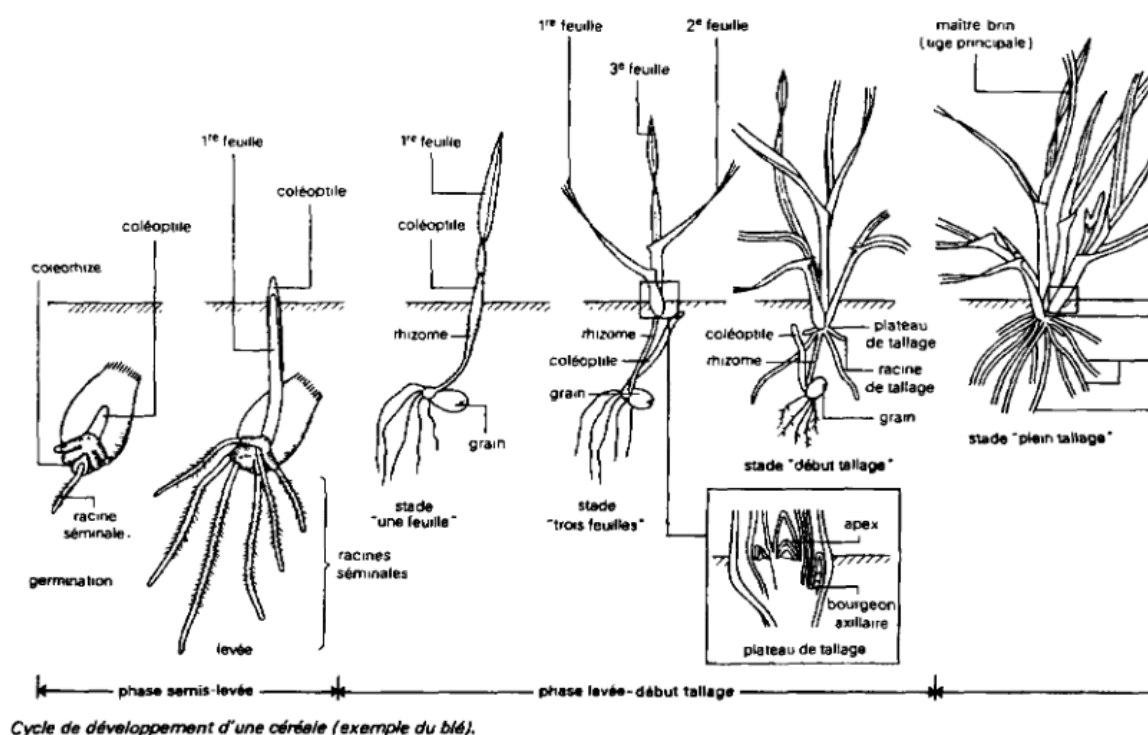
1. La croissance et les étapes de la vie d'une plante

La croissance et le développement des plantes constituent l’ensemble des transformations quantitatives et qualitatives que les plantes subissent au cours de différents stades de sa vie depuis l’implantation jusqu’à la maturité. La croissance des plantes est orientée par des régulateurs biologiques naturels appelés hormones végétales. Le port et la forme de la plante dépendent de l’équilibre de ces messagers de la croissance. La modification de cet équilibre avec des régulateurs de croissance (substance active) permet d’agir sur les mécanismes physiologiques et l’architecture de la plante. Les régulateurs influent principalement sur les gibbérellines, les auxines et l’éthylène.

Le tableau 1 indique les étapes de la vie d'une plante et les échelles d'étude des phénomènes de croissance et de développement. La figure 5 présente l'évolution des phases de croissance et des stades de développement du blé (Hassani 1995).

Tableau 1: Étapes de la vie d'une plante et échelles d'étude de la croissance et du développement

1. Étapes de la vie d'une plante	2. Échelles d'étude
Germination et émergence des plantules	Croissance cellulaire
Période de croissance végétative	Croissance des méristèmes correspondant aux futures feuilles, tiges et racines.
Phase de transition	Croissance de feuille, tige, nœud, inflorescence, grain, racine
Période de croissance reproductive	Croissance d'une plante entière partie aérienne, partie souterraine.
Sénescence progressive des organes et maturité du produit récoltable	Croissance d'un peuplement monospécifique ou plurispécifique.



Cycle de développement d'une céréale (exemple du blé).

Figure 5 : Évolution des phases de croissance et des stades de développement du blé.

(Hassani 1995)

2. La culture d'orge

2.1 Taxonomie

L'orge (*Hordeum vulgare*) est une céréale à paille, monocotylédone, caractérisée par ses épis aux longues barbes autogame, diploïde ($2n = 2x = 14$) avec x égale à 7 représentant le nombre de chromosomes de base de la famille des poacées et la sous-famille des festucoïdées, figurant comme quatrième céréale à l'échelle mondiale après le blé, le maïs et le riz et c'est la plus ancienne céréale cultivée.

L'orge est classée selon les types printemps ou hiver (sensible au gel ou au contraire résistant au froid). Les variétés d'orges d'hiver, résistantes au froid environ jusqu'à -15 °C semées en automne, requièrent une vernalisation (4 à 6 semaines à des températures inférieures à 10 °C) afin de pouvoir amorcer l'épiaison, tandis que celles du type printemps, sensible au gel qui se sèment en fin d'hiver le font sans ce besoin (Cockram, Hones, O'Sullivan 2011). L'orge d'hiver a un cycle végétatif de 210 à 270 jours, et celui du printemps, a un cycle qui varie selon le génotype, le climat et la latitude entre 90 et 150 jours (Moule 1980).

La classification de l'orge est basée sur la fertilité des épillets latéraux, la densité de l'épi et la présence ou l'absence des barbes (Rasmusson, Schaller 1959). Souilah (2009) classe les orges selon le degré de fertilité des épillets et la compacité de l'épi, en deux groupes (Figure 6) :

- Les orges à six rangs, dont les épillets médians et latéraux sont fertiles.
- Les orges à deux rangs, seuls les épillets médians sont fertiles.

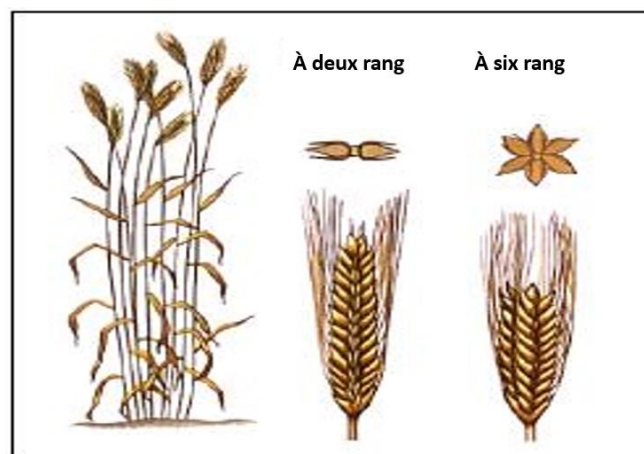


Figure 6 : Différences Orge à six rangs – Orge à deux rangs (Souilah 2009).

Chez l'orge à deux rangs, *H. vulgare* ssp. *distichum*, chaque nœud du rachis compte trois épillets dont un seul est fertile et produit un grain. L'alternance de nœuds d'un côté et de

l'autre du rachis produit un épi à deux rangs. Chez l'orge à six rangs, *H. vulgare ssp. hexastichum*, les trois épillets de chaque nœud contiennent des fleurs fertiles ce qui donne naissance à trois rangées de grains de chaque côté du rachis

Tout au long de son développement, l'orge a un besoin en eau qui varie entre 450 à 500 ml selon le climat et la longueur du cycle végétatif. Un déficit hydrique, en particulier durant les périodes de formation des composantes du rendement, provoque des baisses considérables des rendements en grains et du rapport grain/paille (“Archive Larousse : Larousse Agricole - Orge” 2002). Les besoins en eau d'irrigation pour l'orge dépendent de la variété, des conditions climatiques (température et pluviométrie) et du rendement objectif. Pour atteindre un rendement optimum, l'orge a besoin d'une quantité d'eau comprise entre 390 et 430 mm. Pendant les premiers stades de croissance, la culture d'orge utilise une quantité d'eau comprise entre 1 et 3 mm/jour et qui puisse atteindre 7 à 8 mm/jour pendant la phase de feuille étandard (Si Bennasseur Alaoui 2005).

.2.2 Histologie

Chez les variétés d'orge à grains vêtus ; les glumelles adhèrent au grain et ne s'en séparent pas au battage. Les figures 7 et 8 présentent des coupes longitudinale et transversale d'un grain d'orge.

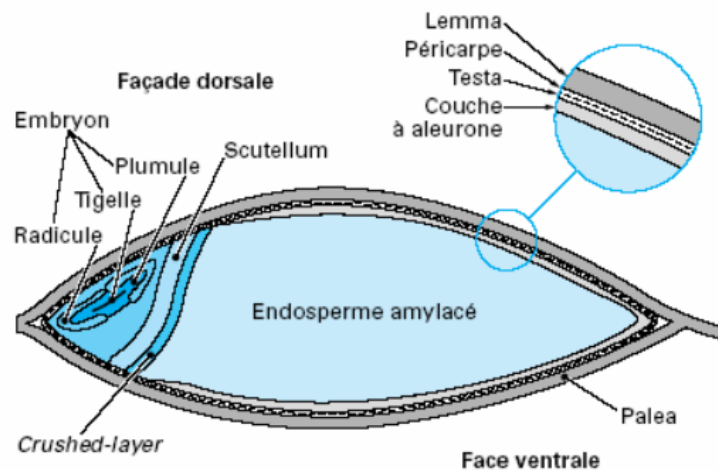


Figure 7 : Coupe longitudinale d'un grain d'orge (Guiga 2006)

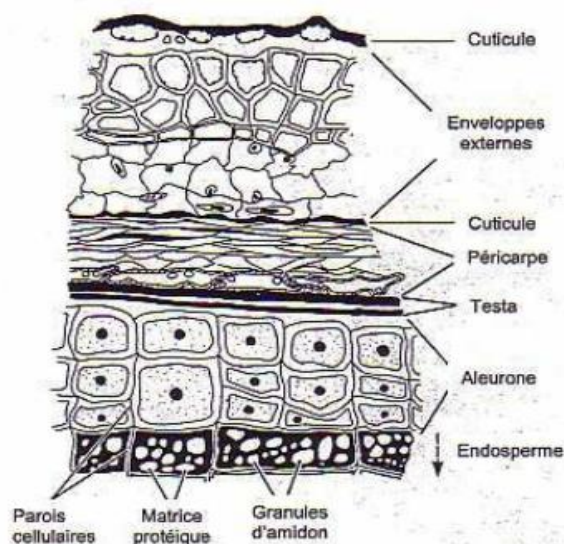


Figure 8 : Coupe transversale des enveloppes, de la couche à aleurone et de l'endosperme amylicé d'un grain d'orge (Guiga 2006).

Les principales parties constituant un grain d'orge sont, de l'intérieur vers l'extérieur :

- l'embryon (plantule complète) ;
- l'endosperme (réserve de matières nutritives) ;
- la couche à aleurone, périphérique (réservoir enzymatique) ;
- le péricarpe - testa (membrane semi-perméable) ;
- et la paroi externe.

.2.3 La valeur nutritive de l'orge

Les grains d'orge comme les autres céréales (blé, maïs, riz, seigle et avoine) sont riches en éléments nutritifs essentiels pour une bonne santé tels que l'amidon, les protéines, les fibres alimentaires, les lipides, les vitamines, les minéraux et les composés phénoliques. Ces éléments essentiellement concentrés dans les parties périphériques du grain constituent une part énergétique essentielle de l'alimentation (Saulnier 2012).

Cette céréale, cultivée depuis des millénaires, constitue un antioxydant qui permet de lutter contre les dommages causés par les radicaux libres. La vitamine E favorise ainsi la prévention des risques de maladies cardiovasculaires, de certains cancers et d'autres maladies liées au vieillissement. De plus, cette céréale présente un indice glycémique faible, soit égal ou inférieur à 55 (Jennie et al. 2003). Les fibres alimentaires solubles de l'orge réduisent considérablement le risque de maladies humaines graves telles que le diabète de type II, les

maladies cardiovasculaires et les cancers colorectaux qui touchent des centaines de millions de personnes dans le monde (H. Collins et al. 2010).

La consommation de l'orge se décline sous diverses formes toutes aussi délicieuses et nutritives les unes que les autres qui aident à réduire le cholestérol qui est un facteur de risque dans les maladies cardiovasculaires (Gouvernement du Canada 2016).

.2.4 Valeur économique et production mondiale et nationale de l'orge.

Les statistiques de la production d'orge indiquent la quantité d'orge produite dans le monde pendant les années de récolte 2008/2009 à 2018/2019. Durant cette période, la production d'orge a nettement fluctué: le volume le plus élevé a été atteint durant la campagne agricole 2008/2009, avec plus de 155 millions de tonnes produites, comparé au volume de production le plus bas se situant à environ 120 millions de tonnes qui a été réalisé en 2010/2011 (Figure 9). Ces fluctuations sont dues au changement climatique.

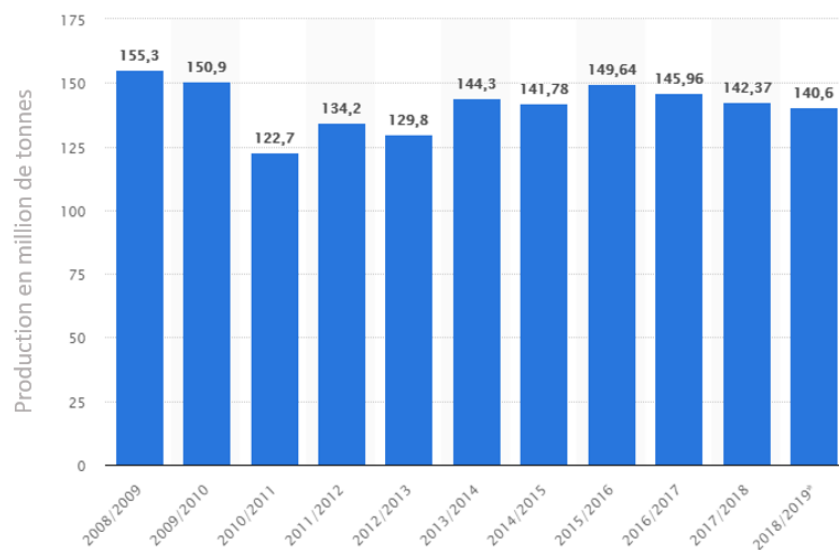


Figure 9 : Production d'orge en volume au niveau mondial de 2008/2009 à 2018/2019 (en millions de tonnes) (Statista 2019)

Le Maroc, de par sa position géographique, son climat, son littoral, entre autres, est fortement affecté par le changement climatique et présente une vulnérabilité de plus en plus croissante. Par conséquent, la production ainsi que le rendement de l'orge connaissent une variation en fonction des années. La production maximale et les rendements les plus élevés ont été obtenus au cours de l'année 2015. Les valeurs plus faibles ont été enregistrées pendant les années 2012 et 2016. Au niveau mondial, 2016 est l'année la plus chaude depuis 1850 avec une

température moyenne supérieure de 1,1 °C par rapport à la période préindustrielle (Douard 2018).

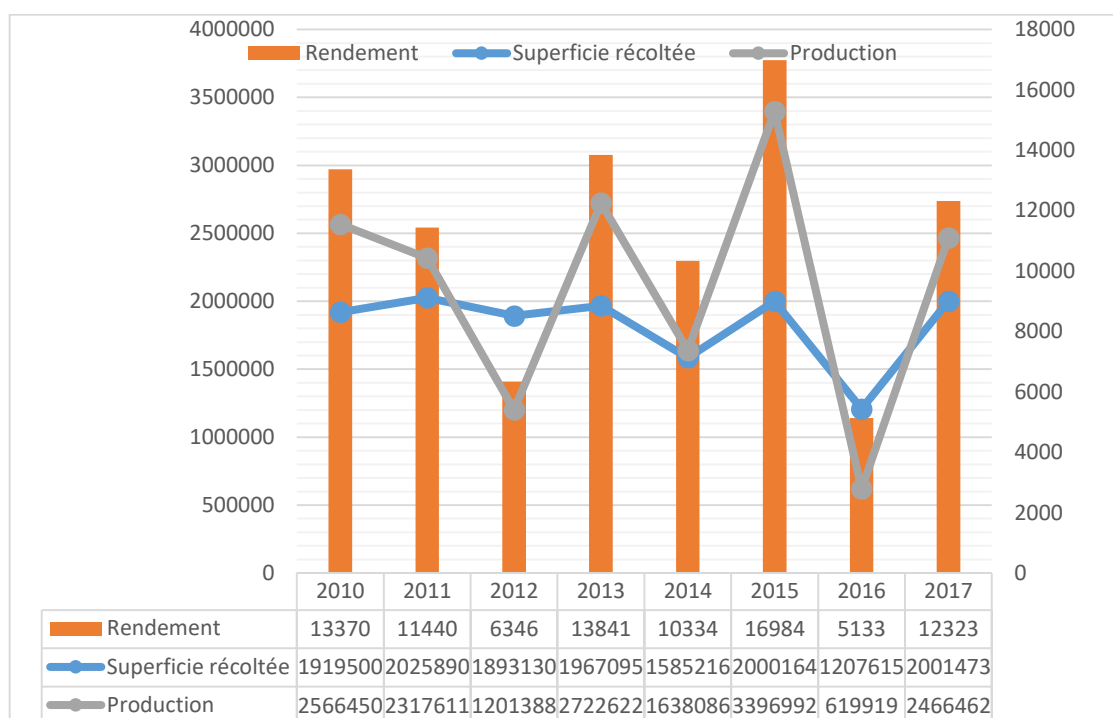


Figure 10 : Les superficies récoltées, la production ainsi le rendement de l’orge au Maroc durant les années 2010 et 2017 (FAO 2017)

D'après le Haut-Commissariat au Plan, les céréales dites principales (blé, orge et maïs) constituent le principal «repas» des Marocains. En moyenne, chacun en consomme 322 kg par an. Cela représente une consommation totale de 100 millions de Qx. On est les premiers dans la consommation de l'orge au niveau mondial (Haut-Commissariat au Plan 2011).

3. La sécheresse et la salinisation des sols

3.1 La salinisation des sols

La salinisation constitue une menace réelle pour la sécurité alimentaire mondiale du fait qu'elle abaisse les rendements des cultures et peut détériorer les terres de façon irrémédiable. Elle peut avoir une origine naturelle : faibles précipitations, évaporation intense, existence d'une roche mère salée (Kalaji M.H. 1993; B P Forster et al. 1990), elle affecte environ 80 % des terres salinisées dite salinisation primaire. Les sels présents à l'état naturel dans le sol sont absorbés à très faible concentration comme éléments nutritifs par les végétaux. Cependant, à des concentrations plus élevées, les sels solubles peuvent empêcher les racines d'absorber l'eau

et les éléments nutritifs et, ainsi, restreindre la croissance des espèces cultivées, d'où un rendement plus faible. La seconde est d'origine anthropique ou humaine en provenant essentiellement d'une eau d'irrigation saumâtre voire même de l'utilisation excessive d'engrais (Binzel, Reuveni 2010; B P Forster et al. 1990) et de la mauvaise combinaison entre la forte évaporation et l'apport inadapté d'eau d'irrigation en relation avec son contenu en sels. La salinisation des sols due à l'irrigation réduit la surface des terres irriguées de 1 à 2 % par an. En effet, chaque minute, trois hectares de terres arables sont détériorés d'une manière souvent irréversible à cause de la salinisation des sols. Ce phénomène progresse rapidement dans le monde et concerne un cinquième des terres irriguées (Labidi 2017).

.3.2 La réponse physiologique au stress salin

La réponse physiologique à la salinité du sol varie de façon continue durant le développement des céréales. Le premier effet du stress salin est le retard de la germination et de l'émergence des racines. Chez l'orge, Cheikh m'hamed et al. (2008) ont montré que le stress salin entraîne une augmentation de la teneur en proline et une réduction des teneurs en chlorophylles (a, b et t) et du potentiel hydrique foliaire. Ouhaddach et al. (2016) ont également montré que l'application du stress salin sur deux variétés Salama et Achar de blé provoque une accumulation de proline, de sucres solubles et de chlorophylle « a », une augmentation du contenu en Na^+ (feuilles et racines), une diminution de K^+/Na^+ (feuilles et racines) et une diminution des niveaux de K^+ dans les racines, et des niveaux de Ca^{2+} dans les feuilles. La salinité a également entraîné une diminution de la teneur en eau, des teneurs en chlorophylle « b » et « t », de la biomasse, de la surface foliaire, de la surface foliaire spécifique, de la hauteur et du nombre de feuilles chez les deux variétés. Boutlelis et al. (2015) ont pu réduire, chez le blé dur, l'effet dépressif du sel sur teneur en eau des plantes stressées en utilisant la BAP à des concentrations 20 et 30 mg.L^{-1} . Ils ont aussi montré une augmentation des différentes teneurs en sucres solubles et en chlorophylles a et b et plus particulièrement sous l'effet de la concentration 10 mg.L^{-1} de BAP utilisée. Ils ont également montré que la salinité a influé sur le taux de proline au niveaux des plantes traitées ou non par la BAP. D'autres auteurs ont prouvé que la teneur en proline est très étroitement liée à la température maximale journalière et à la pluviométrie, l'accumulation de cet acide aminé est un indice de résistance non seulement au stress salin mais également au stress hydrique (Monneveux, Nemmar 1986).

La résistance à la salinité est décrite comme le niveau auquel une croissance et un métabolisme normaux peuvent être maintenus dans des conditions non optimales liées à un environnement salé (Yeo, Flowers 1983). En effet les espèces cultivées sont majoritairement

tolérantes au sel pendant la phase de germination, mais sont plus susceptibles pendant l'émergence du sol et la phase juvénile à cause des hautes concentrations de sel au niveau racinaire. Si la plante survit à ces trois stades, elle devient plus tolérante durant les autres stades de développement (Mouhaya 2008). Cependant, le seuil de concentration en sels qui induirait une réduction de croissance et le degré de réduction de cette croissance varient considérablement d'une plante à l'autre.

La croissance d'une plante dépend à la fois de l'expansion et de la division cellulaire. Etant dépendante de la turgescence, l'expansion cellulaire est très sensible au déficit hydrique et est sous le contrôle de la signalisation ABA. En conditions salines, l'altération du statut hydrique engendre la réduction de la turgescence des cellules réduisant ainsi leur expansion et leur taille et réduisant l'utilisation de l'eau par la plante. Ce fait va entraîner la réduction du développement des nouvelles racines, feuilles et ramifications latérales (Spollen 1993).

Si la durée du stress est courte, la récupération de la plante est complète. En revanche, si la durée est longue, la récupération peut être très limitée car le stress aurait déjà réduit le nombre de cellules dans les zones de division cellulaire.

Le stress salin réduit le taux de photosynthèse (Kawasaki et al. 2001), ce qui en conséquence entraîne la réduction de la croissance. Plusieurs études ont prouvé que le photosystème II joue un rôle particulièrement important dans la réponse de la photosynthèse des plantes supérieures aux stress environnementaux (Baker 1991).

III. Les biotechnologies végétales

La biotechnologie est définie par tout procédé qui utilise la matière vivante (une plante, un animal, une bactérie, un virus) comme agent de production. Le procédé consiste à modifier par manipulation génétique certaines des propriétés de la matière vivante utilisée afin de satisfaire une production spécifique (Gabriel 2004). Pour la biotechnologie végétale l'hypothèse à propos de la totipotentialité des végétaux a été énoncée à Vienne par le physiologiste autrichien Gottlieb Haberlandt en 1902. Il proposait que chaque cellule d'un végétal possède la capacité de donner naissance à une plante entière (Haberlandt 1902). Les biotechnologies végétales fondées sur les techniques de culture de tissus ont été utilisées en 1998 par El Hadrami et al. (1998) afin de confronter les contraintes qui limitent la production du palmier dattier au Maroc. Ainsi des techniques moléculaires ont été utilisées pour comprendre les mécanismes par lesquels les plantes perçoivent les signaux environnementaux (la salinité, le froid, la chaleur et la salinité élevée) et approfondissent leur transmission à la machinerie cellulaire pour activer des réponses adaptatives (Mantri et al. 2012). Des techniques de biotechnologie telles que la

sélection assistée par marqueurs, la culture tissulaire, la mutagenèse *in vitro* et la transformation génétique peuvent contribuer à résoudre ou à réduire les dégâts de certaines de ces contraintes (Dita et al. 2006).

Les biotechnologies végétales représentent initialement un domaine économiquement risqué, donc incertain, pour deux raisons principales souvent évoquées dans le domaine des innovations technologiques : le temps de conception des semences transgéniques et de leur mise sur le marché est très long ; l'investissement initial en recherche et développement représente des sommes énormes (Gabriel 2004).

1. L'haplodiploïdisation

Le processus d'haplodiploïdisation comprend l'obtention de plantes haploïdes à partir des organes porteurs des cellules reproductrices, appelés gamétophyte mâle ou femelle, et le retour vers la phase diploïde. Ces cellules contiennent une copie de l'information génétique qui est normalement présente dans une cellule diploïde sous forme de deux copies, les deux chromosomes homologues. Des lignées pures homozygotes ayant la même information sur les deux chromosomes sont obtenues par doublement du stock chromosomique soit spontanément via une endomitose soit artificiellement après traitement par la colchicine (Bonjean 1995). En une seule génération, les plantes sont donc entièrement homozygotes. Les premiers résultats ont été publiés en 1964 à la suite des travaux de Guha et Maheshwari (1964) sur *Datura* sp.

L'haplodiploïdisation est souvent utilisée dans les programmes de sélection public et privée et permet de réduire de 2 à 3 ans la durée d'un cycle de sélection et d'obtenir des lignées homozygotes à partir des hybrides F1 (Pickering RA, Devaux 1992; Benzaghrou S. 2001).

La réussite des techniques d'haplodiploïdisation est limitée par plusieurs facteurs. D'après Collins (1977), 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/cytokine, les éléments nutritifs) sont les principaux paramètres susceptibles d'influer sur la production de plantes haploïdes à partir de culture d'anthères et d'ovaires non fécondés.

La prolifération de bourgeons, l'induction de racines, l'émission foliaire et l'induction de cals sont nettement influencées par les différents milieux et photopériode, en augmentant la taille d'explant, le nombre de feuilles émises, le nombre de racines et le poids d'explant avec les bourgeons proliférés (Michel 2014).

1.1. L'histoire de la production des haploïdes doublés

En 1921, A.D. Bergner a observé le premier haploïde sporophytique naturel en travaillant avec l'herbe de Jimson (*Datura Stramonium* L). Cela a été rapporté par Blakeslee et al., en 1922 (Blakeslee et al. 1922; Germanà 2011). L'importance des haploïdes dans la sélection végétale et la recherche génétique a été immédiatement reconnue. Depuis lors, le nombre d'haploïdes spontanés dans différentes espèces n'a cessé de croître. Cependant, la fréquence des haploïdes spontanés était trop faible pour une application pratique dans la sélection végétale (Maluszynski et al. 2003).

Au début des années 1960, Guha et Maheshwari (1964) ont découvert qu'il était possible, grâce à la culture *in vitro* d'anthères immatures, de transformer le stade de développement gamétophytique des microspores en un stade sporophytique. Cela leur a permis de produire des embryons et des plantes avec un nombre de chromosomes haploïdes (Germanà 2011). Cette découverte a permis d'approfondir la recherche sur les cultures d'anthères qui ont connu un succès prédominant dans les espèces *Solanaceae*, *Brassicaceae* et *Graminaceae*. Cependant, toutes les cultures d'angiospermes d'intérêt n'ont pas répondu efficacement à l'induction de l'embryogenèse. L'orge (*Hordeum vulgare* L.), le colza (*Brassica napus* L.), le tabac (*Nicotiana* spp.) et le blé (*Triticum aestivum* L.) sont considérés comme des espèces modèles pour la recherche sur l'embryogenèse des microspores en raison de leur haute efficacité de régénération (Brian P. Forster et al. 2007). Il y a cependant d'autres espèces intéressantes sur le plan scientifique ou économique qui restent résistantes à ce type de morphogenèse *in vitro*, comme *Arabidopsis* (cresson). En 1972, Thompson a signalé que la première plante haploïde doublée était la variété 'Maris Haplona' de colza (*Brassica napus*), suivie de la variété 'Mingo' de l'orge (*Hordeum vulgare*) en 1980 (Ho and Jones 1980).

L'intérêt pour les haploïdes s'est manifesté dans l'organisation du premier symposium international «Haploïdes dans les plantes supérieures» qui s'est tenu à Guelph, au Canada, en 1974. Riley, l'un des présentateurs, a fourni une introduction intéressante à l'haploïdie et a couvert une certaine terminologie ainsi qu'une perspective historique pour ceux qui travaillent dans ce domaine (Kasha 1974; Kasha, Maluszynski 2003).

Depuis lors, des recherches approfondies ont été effectuées pour établir des techniques efficaces pour la production d'haploïde et haploïde doublée dans le but d'augmenter les variétés de différentes espèces végétales. Environ 300 nouvelles variétés d'espèces végétales différentes ont été produites et Maluszynski et al. (2003) ont fourni une liste dans leur livre " Doubled haploid production in crop plants : a manual". Diverses méthodes ont été utilisées pour les obtenir telles que l'élimination des chromosomes après hybridation, la méthode de Kasha et

Kao (1970), la pollinisation avec sélection pollinique irradiée de semis jumeaux, la pollinisation *in vivo* ou *in vitro* avec le pollen triploïde la gynogenèse végétale et l'embryogenèse pollinique par l'intermédiaire d'une anthère *in vitro* ou d'une culture isolée de microspores (Germanà 2011; Forster, B.P. et Thomas 2005).

La culture de microspores fournit la voie la plus efficace et la plus uniforme vers la production de masse d'haploïdes doublés. Cependant, elle est techniquement exigeante et nécessite un environnement contrôlé de manière optimale pour la croissance des plantes donneuses. Il est également plus coûteux d'établir un laboratoire pour la culture de microspores que pour la culture d'anthères, car un équipement plus spécialisé est nécessaire. De plus, le risque de contamination est relativement plus élevé pour la culture de microspores, et le protocole exige de travailler dans des conditions aseptiques strictes (Maluszynski et al. 2003).

Alternativement, la culture d'anthères *in vitro* nécessite beaucoup de travail et le coût impliqué est relativement élevé. Cependant, il est techniquement moins exigeant et le risque de contamination de la culture est assez faible (Meyer 2013).

1.2. Les différentes techniques d'haplodiploïdisation

1.2.1. Croisement interspécifique et intergénérique

Le croisement interspécifique et intergénérique, constituent un outil d'amélioration génétique des plantes. Ils représentent un moyen d'introduction de la variabilité et de transfert de caractères désirables des espèces sauvages aux espèces cultivés. Le croisement interspécifique avec *H. bulbosum* (gynogenèse *in situ*) est utilisé pour produire des plantes haploïdes et accélérer le processus de la création variétale. La première variété obtenue par cette méthode « Mingo » a été créé au Canada en 1979 (Doré, Varoquaux 2006). Cette méthode a pour objectif de produire des lignés haploïdes, elle permet également la création d'espèces haploïdes par élimination sélective et spontanée du génome du parent pollinisateur au cours des premières divisions cellulaires de l'embryon (Sitch, Snape, Firman 1985).

Dans le cadre d'un programme de sélection d'haploïdes doublés de blé dur algérien tolérants à la sécheresse, la pollinisation des hybrides en F2 de blé dur, issus de croisements entre variétés locales et introduites, avec *Zea mays*, deux populations du sud algérien et *Hordeum bulbosum* ont permis l'obtention d'embryons avec des taux de 60,53 % pour le croisement blé dur x maïs et de 44,8 % pour le croisement blé dur x *Hordeum bulbosum* (Ramla, Khelafi 2000). Effectivement, Chez le blé, le croisement intergénérique avec le maïs a montré un avantage extraordinaire, cette technique peut donc être utilisée seule pour une production importante d'haploïdes doublés (P. Devaux 1998).

1.2.2. Gynogenèse

La gynogenèse est une technique de production de plantes haploïdes par culture *in vitro* des ovaires ou des ovules non fécondés. Elle permet de régénérer des plantes à partir des cellules sexuelles, spermatozoïdes ou sacs embryonnaires (à l'intérieur de l'ovule) (Y Demarly 1991). Pour la première fois en 1976, le laboratoire d'amélioration des plantes d'Orsay obtient chez l'orge des plantes haploïdes qui étaient uniquement d'origine maternelle (culture d'ovaires d'orge non fécondés) (San Noeum .L 1976).

Dans une étude portée sur des variétés marocaines d'orge, Asni, Tamelet et 905 et une variété européenne de printemps Bérénice, M Fakiri et Sibi (1994) ont montré que la culture d'ovaire permet d'obtenir des plantes chlorophylliennes dont la variété Asni a produit 9 % de plantes haploïdes chlorophylliennes. Elles ont aussi montré l'impact positif de l'obscurité sur le développement de plantes haploïdes qui verdissent dès qu'elles sont exposées à la lumière. La gynogenèse est utilisée pour les génotypes récalcitrants où l'androgenèse ne permet pas de régénérer des plantes haploïdes chlorophylliennes car l'albinisme constitue l'obstacle majeur de cette la technique. Elle permet la stabilité génétique des haploïdes doublés (Touraev, Pfosser, Heberle-Bors 2001).

1.2.3. Androgenèse

L'androgenèse est une méthode prometteuse pour l'amélioration génétique des plantes cultivées (Doré, Varoquaux 2006; Srivastava, Chaturvedi 2008; Shahinul, Narendra 2012). Cette technique mise au point pour la première fois sur *Datura innoxia* par Guha et al. (1964), améliorée par Wernicke et al. (1976) en utilisant un milieu liquide pour favoriser la déhiscence des anthères et diminuer le contact du pollen avec l'anthère. Cette technique a été la première voie d'obtention d'haploïdes par culture *in vitro* d'anthères (sacs contenant le pollen) ou de microspores (Lamsaouri 1991). Les haploïdes androgènes sont produits uniquement à partir du noyau du gamétophyte mâle (Pandey 1973; Seguí-Simarro 2010). En 1998, Laroche a montré que la culture d'anthère permet de raccourcir les délais nécessaires à la production de nouvelles variétés d'orge et grâce cette technique, des plantes homozygotes complètes peuvent être produites en une année par rapport à de longues méthodes de consanguinité qui peuvent prendre plusieurs années et coûter cher (Shahinul, Narendra 2012).

L'embryogenèse des microspores isolées est la méthode la plus couramment utilisée et la plus efficace pour produire des HD (Meyer 2013). Les orges de printemps à six rangs, sont considérées comme récalcitrantes à cause d'une faible embryogenèse et d'une propension à l'albinisme (Patricio Esteves 2014). Chez l'orge, c'est Clapham et al. (1973) qui a été le premier

à rapporter l'obtention de plantes haploïdes par culture d'anthères. Au fil du temps l'efficacité de la technique s'est beaucoup améliorée (Pickering RA, Devaux 1992; P. Devaux, Kasha 2009), et des protocoles assez performants pour être utilisés dans le cadre des projets d'amélioration génétique sont disponibles à partir de 2003 par Cistué et al. (2003), Jacquard et al. (2003) et Szarejko (2003).

L'androgenèse devient un outil indispensable pour produire des haploïdes doublés chez les ligneux, parce que la majorité des arbres sont reproducteurs, fortement hétérozygotes et ont un long cycle de génération (Srivastava, Chaturvedi 2008). La culture *in vitro* d'anthères nécessite en premier lieu des conditions optimales (nutrition minérale, illumination, température et humidité) pour la culture des plantes mères. Au stade uninucléé moyen ou tardif (Patricio Esteves 2014), les tiges sont récoltées contenant des épis dont les anthères contiendraient des microspores à un état précis du développement. Une phase de stress avant la mise en culture est appliquée (P. Devaux, Kasha 2009). Cette phase de stress, aussi appelée « prétraitement » (Hoekstra et al. 1997), s'avère un facteur clé pour commuter la voie morphogénétique en cours, qui amènerait les microspores destinées à former des grains de pollen, vers l'embryogenèse gamétique et donc la régénération *in vitro* de plantes (Touraev, Pfosser, Heberle-Bors 2001) (Figure 11). Pendant cette phase, le prétraitement provoque une synchronisation de la programmation du développement de la voie gamétophytique vers la voie sporophytique (Shariatpanahi et al. 2006). La deuxième phase de l'androgenèse est la phase de culture appelée phase d'induction. Pendant cette phase, la microspore est développée en un embryon. La phase finale de l'androgenèse est la phase de régénération. Durant cette phase, les embryons sont développés en plantes haploïdes (C. Jacquard, Wojnarowicz, Clément 2003). Cependant, les faibles taux d'embryogenèse et de régénération de plantes vertes limitent encore l'utilisation de cette technique dans le secteur privé de l'amélioration des céréales chez le blé et l'orge (Laroche 1998; Chlyah H. et al. 2001; Labbani 2007; Sangaré 2018).

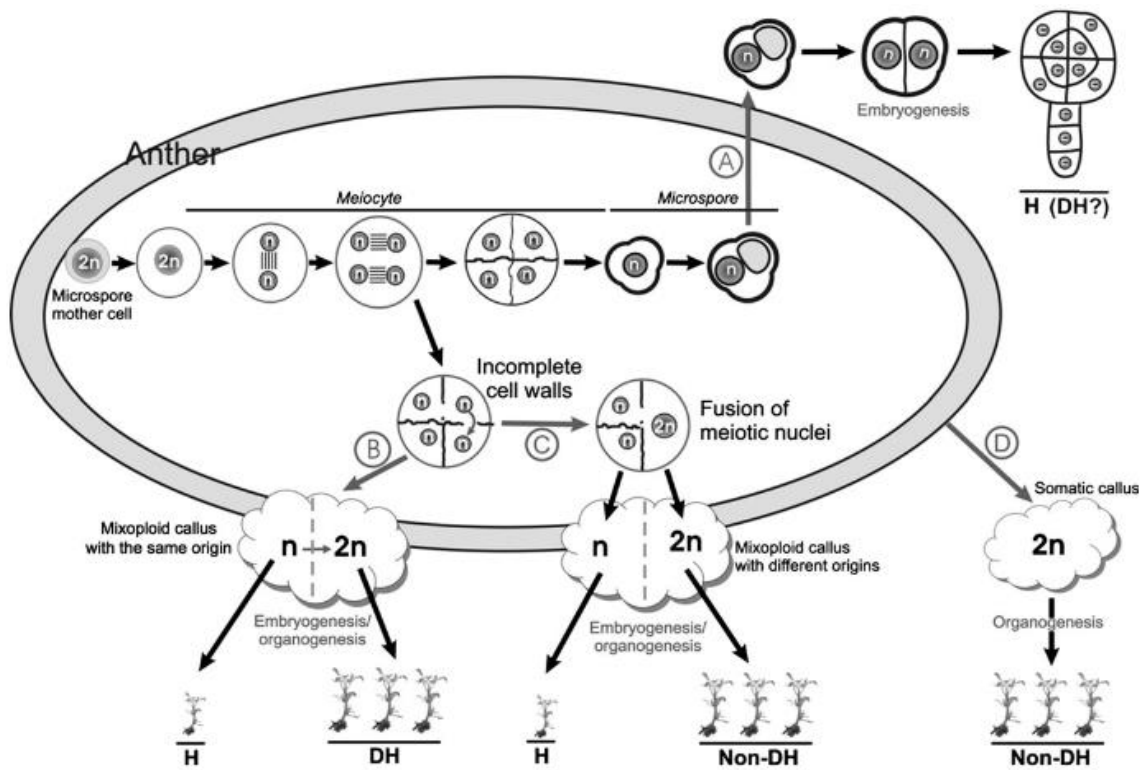
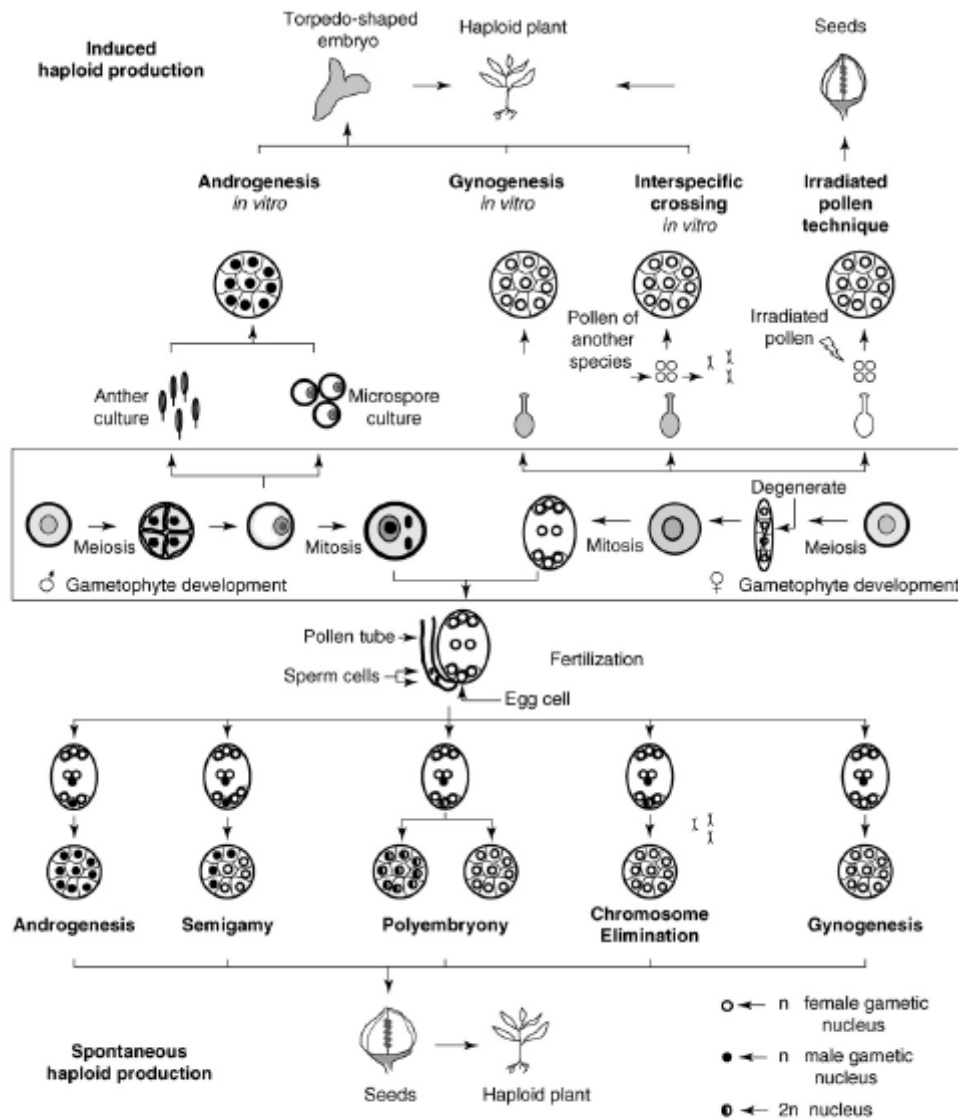


Figure 11 : Les différentes alternatives de développement *in vitro* de microspores isolées (Seguí-Simarro, Nuez 2007)

L'utilisation du protocole optimal pour une culture est particulièrement importante pour les instituts de sélection où la production en masse d'haploïdes doublés est nécessaire. En termes simples, le protocole de culture d'anthers pour le blé peut être utilisé avec succès pour produire des plants d'orge haploïdes doublés. Cependant, le nombre moyen de plantes haploïdes doublées pour la régénération de l'orge peut être inférieur à celui du blé en raison de l'utilisation du même protocole pour les deux cultures (Meyer 2013).



TRENDS in Plant Science

Figure 12 : Méthodes d'obtention de HD chez les céréales qui ont recours à la culture *in vitro* (Brian P. Forster et al. 2007)

1.3. Les facteurs influençant la culture *in vitro*

Les facteurs ayant une influence directe sur l'androgénèse et la gynogénèse sont le génotype (facteur interne) (Kahrizi et al. 2011), les conditions de croissance de la plante donneuse, le stade de prélèvement (Lamsaouri 1991), le prétraitement (stress thermique et stress osmotique) ainsi que le milieu de culture (Picard E, De Buyser J 1975; El-Goumi et al. 2017).

Fakiri et Sibi (1994) ont procédé dans leur étude deux lignes expérimentales, une lumineuse et l'autre sans éclaircissement et ils ont trouvé que l'obscurité a un impact positif sur le développement de plantes haploïdes. Le prélèvement des épis au stade mononucléé tardif ou binucléé était le processus le plus efficace, avec un prétraitement de 14 jours à une température

de 4 °C qui procède la mise en culture des ovaires sur milieu Hunter sans thiamine, ni ANA avec ajout de 2 mg.L⁻¹ de 2-4 D. Les boîtes sont entreposées à l'obscurité avec une alternance de température de 22/18 °C (16/8 heures). Les plantes haploïdes se développaient entre la 7^{ème} et la 10^{ème} semaine d'obscurité, elles verdissaient dès qu'elles sont exposées à la lumière.

1.3.1. Facteurs internes : génotype

La régénération par culture de gamétophytes donne des succès variables selon les espèces. Pour certaines (tabac, blé tendre, riz,...), l'androgenèse est une voie efficace ; pour d'autres, elle n'aboutit pas ou, comme chez le blé dur, *Triticum durum*, elle est souvent associée à un albinisme indésirable des plantes régénérées (Mansouri et al. 2005). Selon les génotypes, le taux d'androgenèse, mesuré par le rapport du nombre de plantes haploïdes régénérées au nombre d'anthères mises en culture, varie de 0 % à plus de 200 % (Hoekstra et al. 1996; Yves. Demarly, Sibi 1996).

L'étude de l'effet des facteurs génotypiques et environnementaux de l'androgenèse *in vitro* des variétés de blé tendre adaptées au Maroc, réalisée par El haddoury *et al*, a démontré que le génotype a un effet très important dans la réussite de l'androgenèse et la sélection de quelque lignées très performantes en androgenèse (El-Haddoury, Chlayah, Picard 1993). Chez l'orge, l'efficacité des méthodes d'haplodiploïdisation par CIV d'anthères ou d'ovaires reste variable selon le génotype utilisé, il y a des génotypes qui répandent mieux que d'autres à la formation des embryons et/ou à la régénération des plantules (Wiethölter et al. 2008).

L'âge de la plante-mère, ce facteur est en fait corrélé avec l'âge du pollen. Tout consiste donc à définir des méthodes de description cytologique du pollen en relation avec la morphologie des plantes, des bourgeons et des anthères. De même la capacité de gynogenèse chez le blé dur est également très dépendante du génotype (Chlyah H. et al. 2001).

1.3.2. Facteurs externes

En 2012, Shahinul, Islam et Narendra ont montré que certains prétraitements individuel ou combiné tels que le stress physique : froid, chaleur, sécheresse, pression osmotique, irradiation gamma, et le traitement chimique : métaux lourds, colchicine ou ABA, peuvent influencer positivement l'efficacité androgénétique.

1.3.2.1. Le stade de prélèvement des microspores

Le stade de prélèvement des microspores est un facteur essentiel de la réussite de la culture *in vitro* (El-Haddoury, Chlayah, Picard 1993). Il pouvait augmenter de 2 à 4 fois la

récolte de microspores embryogéniques (Patricio Esteves 2014). Il diffère d'une technique à l'autre, pour l'androgénèse les microspores au stade uninucléé à noyau centré enregistrent les meilleurs résultats, par contre pour la gynogénèse le stade binucléé ou trinucléé avant l'anthèse est l'optimum pour avoir une bonne induction (Malika Fakiri 1995). Donc chaque stade de développement des microspores est très strictement délimité, si bien qu'une réorientation vers l'androgénèse ou la gynogénèse est toujours délicate; un prélèvement trop précoce ne donne aucun développement ; un prélèvement trop tardif n'a aucun effet, la plupart des microspores évoluant alors vers la maturation du pollen (Yves. Demarly, Sibi 1996).

Pour l'orge, Sunderland et Evans (1980) ont établi une relation entre le stade de microspores, la longueur interligulaire, (c'est à dire la distance entre la ligule de la feuille enroulée et celle de la feuille immédiatement inférieure), et la formation de cals. Ce serait le stade où la vacuole est formée, mais le noyau non encore élargi à l'intérieur de la spore, correspondant à une longueur interligulaire de 140 µm qui serait le plus favorable à la formation des cals.

1.3.2.2. Le prétraitement au froid

Le prétraitement au froid a été utilisé pour la première fois en 1975 par Picard E et De Buyser J afin d'augmenter le rendement de régénération. Pour la mise en évidence de la culture d'anthères, des épis prélevés lorsque les anthères contiennent des microspores au stade uninucléé, vacuolisés. Avant la mise en culture les épis coupés subissent un prétraitement au froid (choc thermique), à 5 °C, pendant 0, 2, 4, 6, 8 et 15 jours (Chlyah H. et al. 2001). L'application de températures basses pendant une durée de 8 jours exerce un effet optimal sur le rendement androgénique par rapport à 0 et 2 jours. 15 jours de froid provoquent une baisse de la réponse favorable (Chlyah, Saidi 1991). Une durée de conservation des épis au froid allant de 7 à 9 jours et la mise en culture des anthères d'épillets de la base des épis permet d'obtenir le maximum d'embryons (El-Haddoury, Chlayah, Picard 1993). Chlyah H. et al. (2001) ont rapporté qu'un prétraitement de 2 à 8 jours au froid (5 °C) améliore significativement les résultats, ce qui permet d'obtenir jusqu'à 10,8 à 13,9 % (milieux P2 ou C17) pour un traitement au froid de 8 jours. Lorsque la durée atteint 15 jours, le taux d'embryons se réduit nettement. D'après El-Goumi et al. (2017), le prétraitement au froid à 4 °C pendant 14 jours a un effet bénéfique juste sur l'induction des cals mais contrairement à la régénération des plantes chlorophylliennes. Bennett et Hughes (1972); Nitch et Norreel (1973) et Picard (1975) ont signalé également l'effet favorable d'un prétraitement thermique pour l'androgénèse.

En gynogenèse, un prétraitement au froid est parfois appliqué, mais peu d'études concernent la durée optimale du traitement. Les prétraitements des épis détachés pendant 0, 5, 10, 15 et 20 jours à 5 °C ont montré que non seulement le froid stimule le processus de formation des cals gynogénétiques, mais qu'il est indispensable à toute réponse positive *in vitro* (Chlyah H. et al. 2001). Les durées de 5 à 10 jours sont les plus favorables à la fois pour l'induction des cals gynogénétiques que pour la régénération de plantes (Mdarhri-Alaoui et al. 1998). Kobaissi (2001) a montré que la régénération par gynogenèse chez le blé dur (*Triticum durum*) dépend de la durée du prétraitement au froid à 4 °C et du génotype. La durée de 7 jours a permis une meilleure régénération pour les variétés Isly et Jori par contre pour les variétés Cocorit, Sarif et Stork la durée de 15 jours était la meilleure.

1.3.2.3. Le prétraitement au mannitol

Le choc osmotique ou le prétraitement au mannitol utilisé pour la première fois par (Roberts-Oehlschlager, Dunwell 1990) est devenu chez les céréales le prétraitement le plus utilisé en CIV d'anthères ou de microspores isolées (Ziauddin, Simion, and Kasha 1990; Hoekstra et al. 1992, 1996; Caredda et al. 1999; Kasha et al. 2001). Ces mêmes auteurs ont rapporté qu'un prétraitement direct des anthères au mannitol allant de 0,1 à 1,5 M pendant 3 à 4 jours à la place d'un prétraitement au froid seul pendant 4 semaines augmente considérablement l'embryogenèse aussi bien que la régénération chlorophyllienne chez l'orge par culture de microspores isolées. De nombreuses études chez les céréales telles que l'orge (Hoekstra et al. 1992; Olsen 1992), le blé (Mejza et al. 1993; T. C. Hu et al. 1995) et le riz (Ogawa, Fukuoka, Ohkawa 1994) ont montré qu'il est préférable d'utiliser un milieu de prétraitement carencé en source carbonée lors du prétraitement des anthères afin d'induire plus favorablement l'embryogenèse.

Pour la gynogenèse, Slama-Ayed et Slim-Amara (2007) ont montré qu'un prétraitement dans une solution du mannitol 0.3 M à 4 °C n'a pas un effet significatif sur la productivité de la culture des ovaires non fécondées, en outre un ajout de 2,4-D, vitamines, glutamine et du maltose comme source de carbone dans le milieu de culture améliore la CIV des ovaires.

1.3.2.4. Le prétraitement au froid et au mannitol

La combinaison des deux prétraitements, froid et mannitol, s'est montrée efficace dans la culture *in vitro* chez les céréales. Chez le blé, cette combinaison est très efficace comme prétraitement, elle permet d'améliorer l'embryogenèse à partir des microspores. Ainsi, elle retarde la première division nucléaire mitotique des microspores et maintient les microspores

au stade uninucléé (T. Hu, Kasha 1999). Chlyah et al. (1991) rapportent qu'en combinant l'action du choc thermique (le froid) et du choc osmotique (le traitement au mannitol), la durée du prétraitement diminue de huit jours quand le froid est appliqué seul à deux jours où l'effet du froid est optimal. Tout se passe comme si une sorte de synergie existait entre ces deux types de traitements. Les travaux de Kasha et al. (2001) sur l'orge et le blé indiquent que le prétraitement des épis simultanément au mannitol et au froid semble retarder la division nucléaire et permettrait la régénération de plantes vertes. Labbani et al. (2007) ont montré que le prétraitement associant mannitol 0,3 M et froid pendant 7 jours avait un effet important sur le nombre d'embryons produits et de plantes vertes régénérées chez le blé. En moyenne, 11,55 plantes vertes ont été produites pour 100 000 microspores (environ l'équivalent de six plantes par épi).

1.3.2.5. Les milieux de culture

Les milieux de culture jouent un rôle essentiel comme promoteur dans le processus de CIV en général. Guha et Maheshwari (1964) ont produit chez *Datura innoxia* les premières plantes haploïdes en utilisant un milieu contenant du lait de coco, du miel et des éléments minéraux. L'étude du milieu d'induction, dont la composition de base est celle du milieu de Murashige et Skoog (MS), montre que l'acide 2,4-D est indispensable pour l'initiation de cals gynogénétiques et l'obtention des régénérations vertes chez le blé dur (Mdarhri-Alaoui et al. 1998).

Pour l'androgenèse quatre milieux de culture (C₇, N₆, BPTG et P₂) traités par Chlyah et al. (1991) ont montré des résultats différents avec les génotypes de blé dur étudiés. Le pourcentage d'embryons le plus élevé est obtenu avec le milieu C₇ ; N₆ est le milieu le moins favorable, BPTG et P₂ exercent un effet intermédiaire. Le travail effectué par El-Goumi et al. (2014), sur la réponse androgénétique des variétés de blé dur et de blé tendre sur les milieux MS, C17 et BPTG, montre que le milieu de culture joue un rôle très important dans l'induction des embryons. Ils ont constaté que les embryons produits sur milieu C17 régénèrent plus de plantes vertes par rapport à ceux produit sur le milieu BPTG. El-Haddoury et al. (1993) ont aussi rapporté que les génotypes de blé tendre étudiés répondent différemment vis-à-vis du milieu de culture. En 2005, Lazaridou et al. ont montré que l'utilisation du milieu additionné du saccharose diminue l'embryogenèse ou l'inhibe chez certaines variétés d'orge (Nika et Thermi). Haque et al. (2014) rapportent que le milieu FHG est le meilleur des cinq testés (MS, B5, N6, FHG et AMS₃) pour l'induction embryogène et la régénération des plantes.

Quant à la gynogenèse, Mansouri et al. (2005) ont montré que l'obtention de régénérant chlorophyllien par gynogenèse *in vitro* dépend fortement du milieu en plus du génotype et du prétraitement. Chaque génotype se comporte différemment vis-à-vis du milieu d'induction utilisé A et B complètement différents vis-à-vis des quantités des macroéléments, microéléments, vitamines, acides aminés, sucre et de régulateurs de croissance. Ils ont trouvé que les meilleurs taux de régénération, pour 100 ovaires mis en culture, apparaissent chez Isly (21,8 %) avec 7 jours de prétraitement et le milieu d'induction A (7j, /A), chez Cocorit (15j, /A) ce taux est de 18,1 %, tandis que chez Jori trois des conditions donnent des résultats positifs: (7j, /B) avec 9,3 %, (7j, /A) avec 16 % et (11j, /B) avec 17,1 %. Dans des conditions de milieu standards (MS avec 2,4-D à 2 mg.L⁻¹ en présence ou non de kinétine à 1 mg.L⁻¹), trois génotypes de blé dur sur huit ne forment aucun cal et quatre génotypes sont incapables de régénération (Mdarhri-Alaoui et al. 1998).

De nos jours, plusieurs milieux mieux définis sont fréquemment utilisés en raison de leur composition en éléments minéraux. Les milieux de culture partagent le plus souvent les mêmes groupes d'éléments constitutifs, les différences existent dans le choix de la concentration des produits utilisés et certains éléments peuvent être remplacés par d'autres.

1.3.2.6. Les sels minéraux

Les minéraux qui ont une influence prépondérante en CIV peuvent être classés en deux groupes : les macroéléments dont la dose optimale oscille entre 30 et 400 mg.L⁻¹ et les microéléments, qu'il faut employer à faible dose de l'ordre de 1/100 à 5/10 de mg.L⁻¹ (Gautheret, Longchamp 1959).

Les macroéléments sont constitués de six principaux éléments, tous essentiels pour la croissance des végétaux : l'azote (N), le calcium (Ca), le potassium (K), le soufre (S), le magnésium (Mg) et le phosphore (P). Les microéléments importants pour la croissance sont : le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le molybdène (Mo) et le bore (B). Les microéléments et les vitamines ne semblent pas être critiques en phase d'induction. Ceux-ci deviennent plus importants pendant le développement du jeune embryon en plantule. Le fer joue un rôle important dans la différenciation des embryons globulaires et on l'apporte généralement sous forme de chélate (Fe-EDTA) (Sangaré 2018).

1.3.2.7. Les substances organiques (source de carbone)

La capacité photosynthétique des tissus végétaux devient insuffisante lors de la mise en culture et leur développement d'où la nécessité de vitamines, d'acides aminés, et d'autres

substances organiques (Gamborg 1986). Les sources les plus utilisées comme source de carbone sont le saccharose, le galactose, le maltose et le sucrose. Gautheret et Longchamp (1959) rapportent que le saccharose à des concentrations de 3 à 5 % constitue la meilleure source de carbone, mais le glucose est à peu près l'équivalent. Il est employé à une dose comprise entre 2 et 5 %. Ahmim et Vieth (1986) ont trouvé qu'une dose de 1 % de saccharose dans le milieu s'avère suffisant pour obtenir des cals et régénérer des plantules à partir du clone testé. Parmi les substances organiques non-spécifiques pouvant améliorer la croissance et le développement des explants on peut citer, par exemple, le Myo-inositol, l'hydrolysate de caséine, ou les arabinogalactanes, ou d'autres substances qui seront efficaces selon le type d'explant, le génotype, et l'espèce (George, Hall, Klerk 2008).

1.3.2.8. Les vitamines

Les vitamines peuvent être synthétisées par les plantes d'une manière endogène. *In vitro*, la synthèse devient insuffisante d'où la nécessité d'enrichir le milieu par des vitamines essentielles pour assurer le bon déroulement des processus métaboliques, les groupes les plus utilisés sont les vitamines B comme la thiamine, l'acide nicotinique, la pyridoxine, la biotine et l'acide folique (Gautheret, Longchamp 1959).

1.3.2.9. Les régulateurs de croissance

Les régulateurs de croissance ou phytohormones en CIV jouent un rôle essentiel dans l'embryogenèse, l'organogenèse et la morphogenèse. Les auxines et les cytokinines sont les plus recommandées (Dodds John H., Roberts Lorin W. 1985). Les auxines sont des substances possédant un ensemble de propriétés physiologiques. Elles agissent suivant la dose et les interactions avec d'autres régulateurs de croissance. Les auxines favorisent la prolifération cellulaire, mais toxique à forte concentration, et la duplication des acides désoxyribonucléiques (ADN) (Augé et al. 1992).

Chez les céréales, en culture d'anthères, les milieux de cultures sont le plus souvent supplémentés avec quatre principales auxines : acide indole-3-acétique (AIA), acide naphthalène acétique (ANA), acide phénylacétique (PAA) et acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4-D), à des concentrations s'échelonnant de 0.5 à 2 mg.L⁻¹ (Pierre Devaux, Pickering 2005). D'après Cossette (1982), l'augmentation de la concentration de 2,4-D (de 0,1 mg.L⁻¹ à 2 mg.L⁻¹) inhibe l'androgenèse. Chez l'orge, les auxines ont été employées à basse concentration plus que chez toutes les autres espèces. Dans certains cas, l'auxine a été complètement omise en laissant la

BAP (une cytokinine 6-benzylaminopurine) comme unique régulateur de croissance (Kihara et al. 1994).

Les cytokinines ont un effet sur la division cellulaire et jouent un rôle très important dans l'organogenèse en stimulant la formation des bourgeons. Elles permettent la séparation des chromosomes lors de la division cellulaire (Augé et al. 1992). Les Cytokinines (BAP) stimulent la multiplication cellulaire, induit ainsi la néoformation de bourgeons, voir à plus forte concentration la multiplication des méristèmes (Kihara et al. 1994). Chahredine et Ykhlef (2017) ont étudié l'effet de différentes concentrations et combinaisons des deux hormones, auxine et cytokinine, 1-naphthaleneacetic acid (ANA), et 6-benzylaminopurine (BAP): ANA + PAB : M1 (0.5 mg / l + 1 mg / l), M2 (1 mg / l + 0.5 mg / l) , M3 (2 mg / l + 2 mg / l), et ANA seul : M4 (0.5 mg / l), M5 (1.0 mg / l), et M6 (2.0 mg / l) sur la pomme de terre. Ils ont montré que le meilleur développement de cal a été noté chez la variété Spunta en utilisant les milieux M1, M2, M3 et M6.

1.3.2.10. L'éclairage :

Pour l'androgenèse, l'incubation des anthères en CIV à l'obscurité jusqu'à la formation des embryons est nécessaire pour avoir des meilleurs résultats. C'est après leur transfert sur un milieu de régénération qu'on les place à la lumière (photopériode de 16 h/24 h) pour le développement de la plante (Chlyah H. et al. 2001).

La formation de cals par gynogenèse chez le blé dur est également favorisée par une période d'obscurité au début de la culture. Cependant, si une période d'obscurité de 2 à 5 semaines est suivie par un éclairage quotidien de 16 h, la production de cals est nettement améliorée et la régénération de plantes est obtenue (Mdarhri-Alaoui et al. 1998). Ainsi, la formation de bourgeons, à la différence des embryons androgénétiques, semble nécessiter la présence de lumière de façon plus précoce (Chlyah H. et al. 2001).

1.3.2.11. L'orientation de l'anthère

Pour la culture *in vitro* d'anthère, l'orientation de l'anthère mise en culture est un facteur très important dans la réussite de l'androgenèse. Chez l'orge la mise en culture des anthères sur la position cotée influence positivement l'induction et la régénération des plantes chlorophylliennes, chose qui était prouvé par certains auteurs tels que El-Goumi (2015). En 1985, Shannon et al. et Hunter ont apporté que chez l'orge, les embryons se sont développés seulement dans les lobes supérieurs des anthères cultivés sur le bord, c'est-à-dire avec un seul lobe en contact avec le milieu de culture et les anthères cultivées à plat, c'est-à-dire avec les

deux lobes en contact avec le milieu, n'ont pas répondu (figure 13). Chez le riz, Mercy et Zapata (1987) ont démontré que les anthères dans les deux positions produisent des cals et régénèrent des plantes vertes.

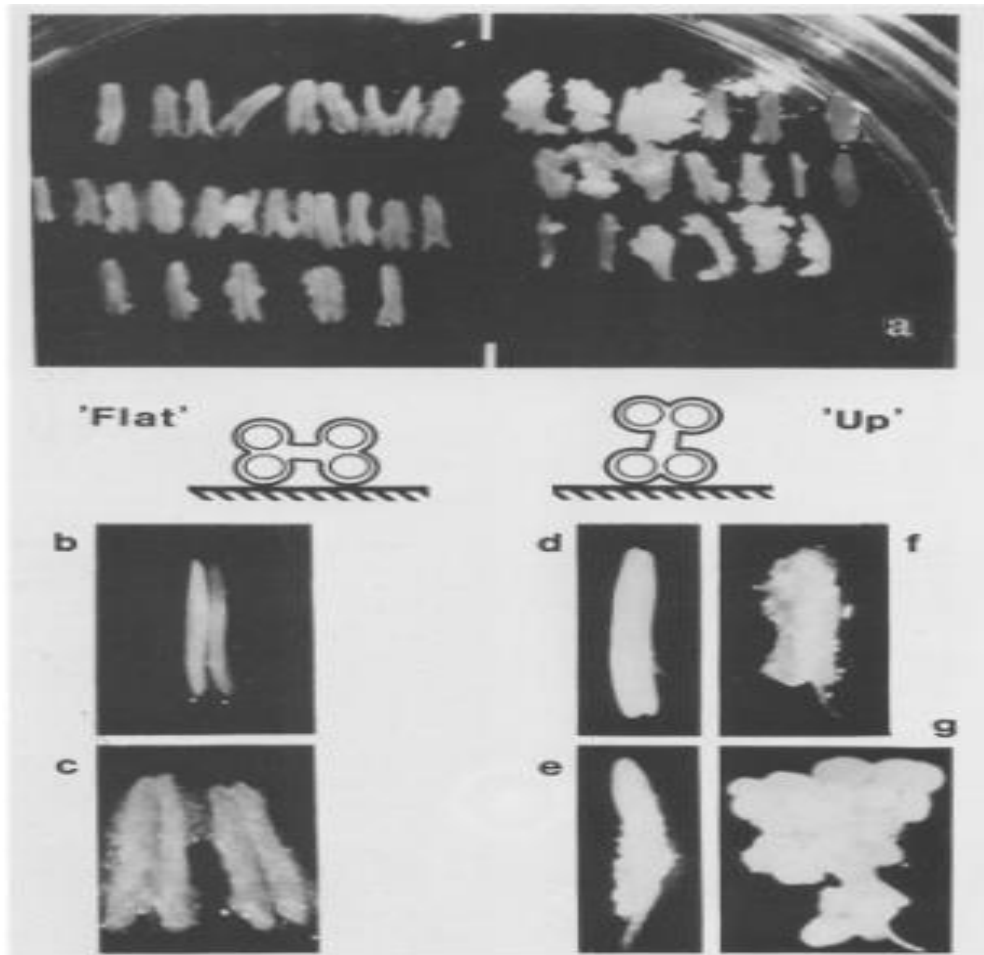


Figure 13 : L'effet de l'orientation des anthères sur la production de cals à partir des microspores chez l'orge :

- (a) Une boîte de Pétri contenant tous les anthères d'un épi, environ chaque moitié dans une orientation, après 28 jours de culture: (b) et (c) Anthères en position plate après incubation pendant 0 et 28 jours respectivement : (d) à (g) anthères en position sur le côté après incubation pendant 0, 3, 6 et 28 jours respectivement (Shannon et al. 1985).

2. L'albinisme

Le problème majeur de l'androgénèse est représenté par la formation de régénérants dépourvus de chlorophylle, dits «plantes albinos» ou albinisme (Wędzony et al. 2009; Muñoz-Amatriaín et al. 2009). Ces plantes ne peuvent pas survivre dans la nature et n'ont aucune valeur agronomique. Ce phénomène se produit exclusivement chez les Poacées et diminue leur

rendement en plantes vertes (Jähne, Lörz 1995). Chaque espèce de cette famille est affectée par l'albinisme, en particulier chez l'orge (*Hordeum vulgare*) et le riz (*Oryza sativa*) (Caredda, Clément 1999). Caredda et al. (2004) ont montré que l'orge de printemps est une espèce récalcitrante conduisant à la régénération de plantes albinos pour la majorité des variétés. El-Goumi et al. (2014) ont montré que le milieu de culture influence la production de plantes vertes ou albinos chez le blé. Ils ont constaté que les embryons produits sur milieu C17 donnent plus de plantes vertes avec un taux d'albinisme de 16,67% et ceux provenant du milieu BPTG régénèrent 66,67% de plantes albinos. Chez L'épeautre (*Triticum spelta* L.), appelé aussi « blé des Gaulois », Lantos et al. (2018) ont trouvé que le prétraitement au froid pendant 12 jours diminue le nombre de plantules albinos produites par culture *in vitro* d'anthères dont il variait de 0,5 à 7,47 albinos / 100 anthères selon le génotype alors que la production de plantules vertes était élevée, en moyenne 41,45 plantules vertes /100 anthères.

Caredda et al. (1999b, 2000, 2004) ont apporté une contribution significative à la compréhension de la physiologie des plastes dans les microspores avant le passage au développement sporophytique, à différents moments de l'androgénèse proprement dite et dans les plantes régénérées. Leurs recherches ont porté sur deux cultivars d'orge, cv d'hiver. «Igri» et cv de printemps. «Cork» : les deux présentent des paramètres numériques d'androgénèse similaires, mais diffèrent considérablement en termes de rapport vert / albinos parmi les plantes régénérées. Le ratio pour Igri était de 7,2 et de 0,03 pour Cork, ce qui s'est traduit par 99,7% de régénérants de Cork étant des albinos (Caredda et al. 2000). Les auteurs ont observé qu'il y avait des différences structurelles entre les plastes des deux cultivars. Chez Igri, les plastes étaient beaucoup plus gros et trois fois plus nombreux que chez Cork. De plus, il y avait plus de membranes thylacoïdes et de grains d'amidon dans Igri.

Les plantes vertes possèdent de nombreux chloroplastes avec des systèmes de membranes internes très développés et peu de granules d'amidon. En revanche, les plastes des plantes albinos ont des systèmes membranaires internes peu développés, un grand nombre de corps prolamellaires et les plastoglobules ne contiennent pas de grains d'amidon (Caredda et al. 2004). Le comportement des plastes au cours de l'androgénèse conduisant à la formation de plantes albinos est dû à la transformation de certains plastes en chloroplastes et d'autres se développent en amyloplast (Makowska, Oleszczuk 2014).

Sur la base de croisements entre des cultivars sensibles à l'albinisme et résistants à l'albinisme, il a été conclu que les gènes responsables de ce caractère sont hérités de manière

mendélienne et, par conséquent, qu'ils doivent être nucléaires (Larsen, Tuveesson, Andersen 1991). Dans un ensemble différent de cartographie des populations d'orge, plus de QTL ont été identifiés: sur le chromosome 2H et associés au nombre d'embryons et de plantes albinos et sur les chromosomes 5H et 6H et corrélés avec la régénération des plantes vertes (Chen et al. 2007).

L'efficacité de l'androgénèse et le rendement en plantes vertes peuvent être améliorés par la manipulation de facteurs externes appropriés. Seuls certains de ces facteurs ont été examinés dans le contexte de l'albinisme (Olmedilla 2010). La plupart des études se concentrent sur la sélection d'un type approprié de contrainte de reprogrammation et des proportions appropriées de composants dans le milieu d'induction. Chez l'orge, les facteurs de stress les plus couramment utilisés sont soit le traitement par le froid seul, soit le stress osmotique combiné à une température basse ou élevée (Oleszczuk, Sowa, Zimny 2006). L'identification des conditions de prétraitement appropriées est difficile, car le stress doit être suffisamment fort pour modifier la voie de développement des microspores, mais suffisamment doux pour ne pas entraîner une mortalité élevée ou perturber la fonction cellulaire. Oleszczuk, Sowa, et Zimny (2006) ont rapporté que le prétraitement des anthères à 0,3 M de mannitol à 32 °C pendant 24h avant la culture des microspores augmente le nombre de plantes vertes régénérées. Cédric Jacquard et al. (2009) ont montré que les ions cuivre participent également à la biosynthèse de la chlorophylle, ainsi qu'à la photosynthèse. Hooghvorst et al. (2018) ont rapporté que les milieux supplémentés en colchicine ont clairement amélioré la régénération des plantules vertes haploïdes doublées chez le riz et que cette régénération est génotype dépendante.

3. Pression sélective et vitrovariants orientés

La pression sélective est une des techniques de culture des tissus végétaux permettant de sélectionner et de développer des plantes tolérantes ou résistantes aux stress abiotiques ou biotiques. Afin d'améliorer la tolérance à la salinité et à la sécheresse chez les plantes, la mutagenèse, l'haplodiploïdisation et la vitrovariation sont les méthodes les plus utilisées pour créer la variabilité agronomique (Karan, Subudhi 2012; El-Goumi 2015). L'application du stress peut être effectuée, soit brutalement, soit de façon progressive. L'application du stress au chlorure de sodium à des concentrations progressives au cours de la culture *in vitro* d'anthère peut entraîner une adaptation des cals au stress abiotique jusqu'à des concentrations sublétales en aboutissant à des souches tolérantes à la salinité (*Hordeum vulgare*) (Sibi, Fakiri 2000).

D'après El-Goumi (2015), l'augmentation de la concentration du NaCl diminue significativement la régénération chez les trois variétés d'orge Asni, Tamelalt et Arig 8. Dans

le cadre de la recherche d'œillet (*Dianthus caryophyllus* L.) tolérant à la salinité, Haouala et al. (2003) ont montré que la croissance des cals est réduite sous pression sélective et le taux de régénération est très affecté en présence de NaCl à 100 mM. L'enracinement des pousses est meilleur sans NaCl et les plantes régénérées présentent des variations somaclonales et celles obtenues sous stress salin ont une meilleure tolérance relative à la salinité que les plantes régénérées en absence de sel.

L'haplodiloidisation est une voie d'obtention de vitrovariation. Chez l'orge (*Hordeum vulgare*), les descendances gynogénétiques présentent une gamme de variabilité pour les critères hauteur de plante, nombre de talles, nombre d'épis, nombre de grains et poids en grains. (Kobaissi 2001). Sibi et Fakiri (2000) ont rapporté dans leur travail que les conditions de stress salin permettent d'obtenir des régénérants prédisposés à la variation. Matheka et al. (2008) ont montré que chez le maïs, la variation somaclonale pour la tolérance à la sécheresse de deux génotypes de maïs kényans, KAT et PH01, a été obtenue par sélection *in vitro*. Afin de déterminer les concentrations appropriées de pression de sélection, des cals âgés de trois mois issus d'embryons immatures ont été cultivés sur un milieu N6 additionné de mannitol ou de polyéthylène glycol (PEG-6000).

Bouharmont et al. (2008) ont étudié le potentiel de variation somaclonale dans l'amélioration du riz et la sélection *in vitro* pour la tolérance au stress. Ils ont sélectionné de nombreuses plantules à partir de cellules cultivées sur un milieu contenant 1,5 % de NaCl. Plusieurs plantes sélectionnées ont montré une tolérance au sel encore plus élevée, or quelques lignées cellulaires ont survécu à une concentration sublétales de NaCl (1,75 %), la descendance d'une plante issue d'une telle sélection n'exprimait pas une tolérance au sel améliorée.

Le stress induit une diversité de réponses qui résultent de l'expression génique et des modifications du métabolisme cellulaire, se traduisant par une variation de la croissance et du développement de la plante (Gilmour et al. 1998).

Dans les années 1950, le sélectionneur ne faisait appel qu'aux outils de la sélection « phénotypique » avec croisement, autofécondation et expérimentation au champ. Aujourd'hui, les marqueurs moléculaires et les études de génomique apportant une connaissance de plus en plus précise des gènes qui contrôlent des caractères physiologiques, la sélection se fait majoritairement sur le génotype. Les marqueurs moléculaires, directement issus du polymorphisme existant au niveau de l'ADN, sont désormais utilisés fréquemment pour l'analyse des ressources génétiques et dans les programmes d'amélioration des plantes (Santoni. S, Faivre-Rampant. P, Prado. E 2000). On parle alors de « Sélection Assistée par Marqueurs » (SAM).

4. La sélection assistée par marqueurs

La sélection assistée par marqueurs moléculaires (SAM) est une méthode de sélection basée sur l'utilisation de marqueurs moléculaires, de petits segments d'ADN situés près d'un gène d'intérêt agronomique (résistance à la salinité, par exemple) dans l'ADN de la plante. Les marqueurs moléculaires, directement issus du polymorphisme existant au niveau de l'ADN, sont désormais utilisés fréquemment pour l'analyse des ressources génétiques et dans les programmes d'amélioration des plantes (Santoni. S, Faivre-Rampant. P, Prado. E 2000).

Les avantages fondamentaux de la SAM par rapport à la sélection phénotypique conventionnelle sont les suivants :

- ✚ Elle peut être plus simple que le dépistage phénotypique, ce qui peut économiser du temps, des ressources et des efforts.

- ✚ La sélection peut être effectuée au stade des semis. Cela peut être utile pour de nombreux traits, mais surtout pour ceux qui sont exprimés à des stades de développement ultérieurs. Par conséquent, les génotypes de plantes indésirables peuvent être rapidement éliminés. Cela peut avoir d'énormes avantages pour la sélection du riz car les pratiques habituelles de production de riz consistent à semer des semences prégermées et à transplanter les plantules dans les rizières, ce qui facilite la transplantation de semis sélectionnés dans le champ principal.

- ✚ Les plantes isolées peuvent être sélectionnées. Avec la SAM, chaque plante peut être sélectionnée en fonction de son génotype. Pour la plupart des caractères, les plantes homozygotes et hétérozygotes ne peuvent pas être distinguées par le dépistage phénotypique classique (Bertrand, Collard and David, Mackill 2008).

La découverte des marqueurs moléculaires de l'ADN nucléaire ouvre une nouvelle ère pour la sélection. En rendant possible l'étiquetage de certains gènes, cela permet de rendre plus efficace la gestion et la manipulation de la variabilité génétique pour construire des génotypes ayant de plus en plus de gènes ou d'associations de gènes favorables (Gallais 1994).

L'utilisation de marqueurs d'ADN dans la SAM repose sur cinq considérations principales : la fiabilité; quantité et qualité de l'ADN requis; procédure technique pour le dosage des marqueurs; niveau de polymorphisme; et le coût (Mackill, Junjian 2008; Mohan et al. 1997).

- ✚ Fiabilité. Les marqueurs doivent être étroitement liés aux loci cibles, de préférence à une distance génétique inférieure à 5 Centimorgan. L'utilisation de marqueurs latéraux ou intragéniques augmentera considérablement la fiabilité des marqueurs permettant de prédire le phénotype (Bertrand, Collard and David, Mackill 2008) (Figure 14).

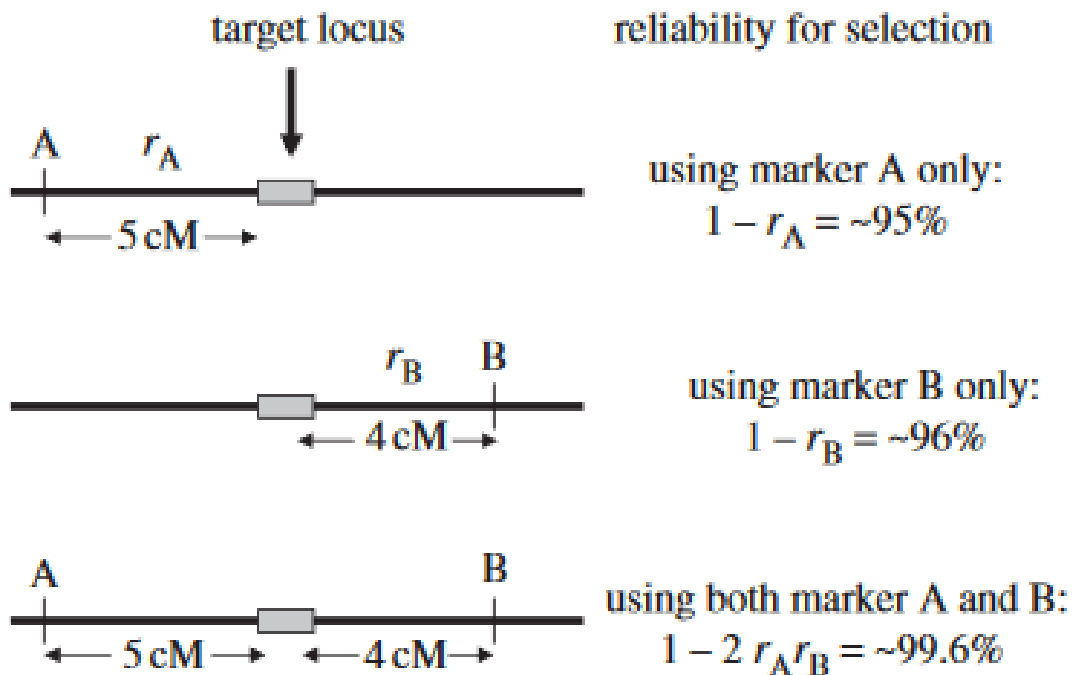


Figure 14 : Fiabilité de la sélection en utilisant des marqueurs simples et flanquants (Tanksley 1983)

✚ Quantité et qualité de l'ADN. Certaines techniques de marquage nécessitent de grandes quantités d'ADN de haute qualité, ce qui peut parfois être difficile à obtenir en pratique, ce qui alourdit le coût des procédures.

✚ Procédure technique. Le niveau de simplicité et le temps requis pour la technique sont des considérations critiques. Des méthodes simples et rapides à haut débit sont hautement désirables.

✚ Niveau de polymorphisme. Idéalement, le marqueur devrait être hautement polymorphe dans le matériel de sélection (c'est-à-dire qu'il devrait faire la distinction entre différents génotypes), en particulier dans le matériel de sélection principal.

✚ Le coût. Le test de marqueur doit être rentable pour que la SAM soit réalisable. (Bertrand, Collard and David, Mackill 2008)

Les approches de pyramide des gènes utilisant uniquement les méthodes de sélection conventionnelles risquent de ne pas être efficaces, principalement en raison des difficultés rencontrées pour sélectionner des génotypes portant différents gènes de résistance. Pour cette raison, les marqueurs moléculaires utilisés dans la SAM sont souvent utilisés pour faciliter le processus de pyramide des gènes. Sanchez et al. (2000) ont aussi montré l'utilité de la SAM dans la pyramide de gènes pour la résistance à la Brûlure Bactérienne (BB) chez le riz, en

particulier pour les gènes récessifs, tels que *xa5* et *xa13*, difficiles à sélectionner par sélection classique en présence d'un gène dominant. Grâce à cette méthode, Souza et al. (2014) ont pu sélectionner des descendants F-4: 7 d'haricot commun «carioca» présentant tous les marqueurs d'ADN associés aux gènes d'intérêt.

Plusieurs techniques de marquage moléculaire sont utilisées dans la cartographie génétique: parmi les marqueurs dont l'emplacement des chromosomes est connu, les marqueurs RFLP, STS et SSR, ils sont utilisés pour identifier les groupes de liaison et pour la cartographie comparative, tandis que les marqueurs RAPD et AFLP qui ont une liaison aléatoire mais fournissent des informations utiles sur le polymorphisme, sont utilisés pour compléter les groupes de liaison avec des marqueurs (Karsai et al. 2007; Vilarinhos 2004).

4.1. RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction)

La technique RFLP est la seule technique de marquage moléculaire non basée sur la PCR. Elle est très utilisée, car elle fournit des profils peu complexes permettant de caractériser l'empreinte génétique d'une plante ou de construire une carte génétique. C'est une technique inventée en 1980 par le scientifique américain Botstein et al. (1980) pour la construction d'une carte de liaison génétique du génome humain. En 1984 le généticien britannique Alec Jeffreys a utilisé cette technique pour étudier les maladies héréditaires dans les familles (Forensics 2019). Elle a été la première technique utilisée pour l'analyse de la diversité génétique chez l'orge (Saghai-Marouf et al. 1984). Le RFLP a été le premier et reste le plus utilisé dans l'estimation de la diversité génétique des espèces eucaryotes (Lu et al. 1996). Il est basé sur la variabilité de la séquence nucléotidique de l'ADN génomique après digestion par des enzymes de restriction. Il pourrait améliorer le rendement du procédé de création variétale en accélérant le choix des individus pendant la phase d'autofécondation, et en maximisant la diversité génétique des plantes constituant le nouveau cultivar. Les niveaux d'hétérozygotie sont estimés par le nombre moyen de bandes dans les loci RFLP (combinaisons sonde-enzyme) (Scotti. C, Pupilli. F, Damiani. F, Arcioni. S 1994).

Les cartes génétiques moléculaires sont généralement construites en analysant la ségrégation de polymorphismes de longueur de fragment de restriction (RFLP) parmi la descendance d'un croisement sexuel (Williams et al. 1990). Des Données RFLP, AFLP, isoenzyme et EST ont été combinés pour produire une carte génétique intégrée contenant 240 loci couvrant 811 cM sur sept groupes de liaison (Jones et al. 2002).

Les régions «minisatellites» hypervariables dispersées dans le génome humain présentent des polymorphismes de longueur de fragments de restriction (RFLP) dus à des

différences alléliques dans le nombre de répétitions en tandem contenant la séquence principale (Motomura et al. 1987).

Les marqueurs RFLP ont montré chez la tomate moins de distorsions de ségrégation que les marqueurs AFLP (Saliba-Colombani et al. 2000).

4.2. AFLP (Random Amplified Length Polymorphism)

La technique AFLP a été découverte par Vos et al. (1995). Elle combine les deux techniques de RFLP et de PCR, elle utilise à la fois les enzymes de restriction et l'amplification PCR. Elle est basée sur l'amplification PCR sélective de fragments de restriction issus d'une digestion totale d'ADN génomique (Shan, Blake, and Talbert 1999). Cette technique est fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de site de restriction et de polymorphisme d'hybridation d'une amorce de séquence arbitraire. Les polymorphismes AFLP offrent un dosage d'ADN multiplex reproductible permettant de génotyper des populations (ELLIS et al. 1997)

L'AFLP a été utilisé en 1998 par Barrett, Kidwell, et Fox (1998) et Barrett et Kidwell (1998) pour évaluer la diversité génétique du blé (*Triticum aestivum* L.), de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) (ELLIS et al. 1997; Schut, Qi, Stam 1997), du maïs (*Zea mays* L.) (Ajmone Marsan et al. 1998), de la laitue (*Lactuca* spp. L.) (Hill et al. 1996), du tournesol (*Helianthus annuus* L.) (Hongtrakul, Huestis, Knapp 1997), du soja (*Glycine max.*L) (VanToai, Peng, St. Martin 1997) et de l'eucalyptus *urophylla* (Gaiotto, Bramucci, Grattapaglia 1997).

De plus, les AFLP détectent les polymorphismes plus efficacement que les RFLP, en raison du plus grand nombre de loci testés dans une seule réaction PCR (Karsai et al. 2007). Les distances génétiques, calculées à partir des données RFLP et AFLP, étaient plus grandes parmi les lignées appartenant à différents groupes hétérotiques par rapport à celles calculées à partir des lignées du même groupe hétérotique (Ajmone Marsan et al. 1998).

4.3. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

L'analyse RAPD (Williams et al. 1990) est basée sur la réaction de la polymérase en chaîne (PCR), permettant d'amplifier et d'augmenter le nombre de fragments limités par deux amorces oligonucléotidiques de manière quasi exponentielle (Saiki et al. 1985). L'amplification de l'ADN génomique est, cette fois ci, réalisée à partir d'amorces de séquences aléatoires (10 bases, environ), utilisées seules ou par couples qui, en amplifiant un ensemble de segments d'ADN distribués de manière aléatoire dans le génome, peuvent détecter des polymorphismes génétiques. La technique RAPD présente plusieurs avantages tels que la facilité et la rapidité

d'analyse, un coût relativement faible, la disponibilité d'un grand nombre d'amorces et l'exigence d'une très petite quantité d'ADN pour l'analyse (Williams et al. 1990), elle est aussi sensible à la détection des variations entre les individus (Corazza-Nunes et al. 2002). D'un point de vue pratique, ce type de marqueur se caractérise par une plus grande facilité de mise en évidence par rapport aux marqueurs de type RFLP ou microsatellites. Les marqueurs RAPD ont permis d'établir des cartes génétiques pour différentes espèces, *Arabidopsis* (Reiter et al. 1992), Luzerne (Echt, Erdahl, McCoy 1992) et la réalisation d'études de diversité génétique (Vierling, Nguyen 1992). Les RAPD présentent également certaines limites en ce qui concerne la reproductibilité et une homologie incertaine des fragments en électrophorèse sur gel (Rieseberg 1996).

Les marqueurs RAPD sont traités comme des marqueurs dominants fournissant au généticien un outil pour explorer la génétique des organismes à reproduction sexuée, avec des applications dans la cartographie des gènes, la génétique des populations, la systématique moléculaire et la sélection assistée par marqueurs dans la sélection végétale (Williams et al. 1993).

4.4. SSR (single sequence repeat ou microsatellites)

Les microsatellites ou SSR sont constitués de séquences de di-, tri- ou tétra-nucléotides répétés en tandem (Panaud, Chen, McCouch 1995). Ils sont les plus couramment utilisés dans la sélection variétale. Ces microsatellites sont des marqueurs co-dominants, dispersés dans le génome d'une espèce et hautement polymorphes par la variation du nombre de répétitions et de ce fait très informatifs (Madesis, Ganopoulos, Tsiftaris 2013). De plus, ils sont facilement détectables par la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et reproductibles (Panaud, Chen, McCouch 1995). Cependant, ils sont fréquemment utilisés, car plus de 2000 microsatellites hautement polymorphes ont été ordonnés de manière précise (en moyenne, 1 tous les 1.6 cM) (Dib et al. 1996).

Les seuls inconvénients de SSR sont qu'ils nécessitent typiquement une électrophorèse sur gel de polyacrylamide et donnent généralement des informations que sur un seul locus par dosage, bien que le multiplexage des marqueurs pour le génotypage soit possible. Ces problèmes ont souvent été résolus en sélectionnant des marqueurs SSR présentant des différences de taille suffisamment importantes pour la détection dans des gels d'agarose, ainsi qu'en multiplexant plusieurs marqueurs en une seule réaction (Sanchez et al. 2000; Sharp et al. 2001).

Les SSR ont été utilisés par Shehadi et al. (2014) pour détecter les génotypes tolérants à la salinité et pour évaluer les relations phylogénétiques entre cinq génotypes différents d'orge. L'étude a montré la tolérance du génotype Tairaya au stade de germination, tandis que sa sensibilité était accentuée aux stades ultérieurs de développement.

5. Le gène *HVA1*

Chez l'orge la taille du génome du *Hordeum vulgare* est considérable puisqu'elle est estimée à $5,44 \times 10^3$ Mb malgré son nombre chromosomique limité (Soleimani, Baum, Johnson 2006). Il est presque deux fois plus important que celui de l'homme et son séquençage a constitué un réel défi à cause du nombre de séquences très similaires qu'il contient et donc très difficiles à assembler (Mayer et al. 2012). En 1993, Kleinhofs et al. ont construit une carte du génome de l'orge comprenant 295 locus.

Le gène *HVA1* appartenant au groupe 3 de protéines LEA (late embryogenesis abundant) qui joue un rôle dans la protection des plantes lors de stress hydrique (Qian et al. 2007). La détermination du stress salin se fait par l'expression de ce gène *HVA1* de résistance à la salinité et à la sécheresse. Plusieurs équipes ont signalé que son expression dans d'autres plantes entraînait une tolérance à la sécheresse et/ou à la salinité et permettait de mieux comprendre les mécanismes de tolérance à ce stress (Hong, Barg, Ho 1992; Oraby et al. 2005). Qian et al. (2007) ont montré que le gène *HVA1* avait tendance à réagir plus tôt chez les génotypes tolérants (après 2 h) par rapport aux génotypes sensibles (après 4 h) et que le niveau relatif d'expression du *HVA1* était toujours plus élevé chez les génotypes tolérants, augmentant rapidement aux stades antérieurs (après 2 à 4 heures de déshydratation).

Les protéines LEA (Dure, Greenway, Galau 1981) sont des polypeptides hydrophiles synthétisés à la fin de l'embryogenèse (Barbara 2006) et impliquées dans la protection des structures cellulaires pendant la déshydratation. Ces protéines sont généralement fortement exprimées pendant la maturation des graines ou dans les tissus végétatifs en réponse aux stress (Ertossi et al. 2006).

Le gène *HVA1* est fortement induit par divers stress et a été utilisé avec succès pour conférer une tolérance stable aux stress abiotiques tels que la sécheresse et la salinité chez plusieurs espèces de plantes transgéniques. Il est généralement transféré chez le riz (Koerniati, Widhianata 2012), le blé et le maïs afin d'acquérir la résistance au stress salin et hydrique. La surexpression du gène *HVA1* a montré une tolérance nettement accrue au déficit en eau et à la salinité chez le riz (Rohila, Jain, Wu 2002), le blé (Sivamani et al. 2000), le maïs (Nguyen, Sticklen 2013) et même chez le mûrier (Checker, Chhibbar, Khurana 2012).

Babu et al. (2004) ont montré que le riz transgénique présente une teneur en eau relative des feuilles plus élevée et une réduction moindre de la croissance des plantes sous stress de sécheresse par rapport aux plantes non transgéniques.

Dans les années soixante-dix Sanger et al. (1977) ont découvert la technique du séquençage, cette technique consiste à déterminer les séquences nucléotidiques dans l'ADN, elle a permis de déterminer la succession des nucléotides pour l'ADN du phage phiX174. Les procédures de séquençage génomique sont applicables à l'analyse des polymorphismes génétiques, à la méthylation de l'ADN au niveau des désoxycytidines et aux interactions acide nucléique-protéine à la résolution d'un nucléotide simple (Church, Gilbert 1984). Dans les années quatre-vingt-dix cette technique a été utilisée pour séquencer pour la première fois des individus humains (Lander et al. 2001). Pour les céréales, les premiers séquençages ont porté sur des génomes de petites tailles : celui du riz, du peuplier et d'*Arabidopsis thaliana* (Doré, Varoquaux 2006).

Partie 2 : Méthodologie et empirique

Chapitre II : la réponse androgénétique sous pression sélective contrôlée

I. Introduction

La forte salinité du sol dans les régions arides et semi-arides est l'une des contraintes abiotiques qui limite le rendement agricole de l'orge, du blé, du riz et du maïs (Mantri et al. 2012). Cette salinité élevée du sol dans ces régions résulte d'une pluviométrie irrégulière et insuffisante ainsi que de la forte évaporation de l'eau du sol (Bennaceur et al. 2001). Plus le climat est aride plus le sol est salin plus le stress osmotique est élevé (Hillel, Braimoh, Vlek 2008). En outre, il est difficile pour les racines d'extraire l'eau de la réserve du sol lorsque le taux de sel est élevé dans la solution. Il en résulte donc un ralentissement de leur croissance (De-Jong-van Lier, van Dam, Metselaar 2009). Les haplométhodes s'avèrent efficaces pour la génération de variétés ayant une meilleure résistance à la salinité et à la sécheresse car ces deux facteurs sont liés (Guasmi et al. 2010).

Nous avons choisi l'androgénèse qui consiste en la culture *in vitro* d'anthères au stade uninucléé en passant par le stade embryon afin de produire des haploïdes doublés et des lignées homozygotes après doublement chromosomique (Guha, Maheshwari 1964; P Esteves, Belzile 2014). Chez *Hordeum vulgare* les plantes haploïdes doublés peuvent être produites par la culture des anthères ou des microspores ou par croisement avec *H. bulbosum* (méthode *bulbosum*) (P. Devaux 1992). Chez l'orge, le doublement spontané du stock chromosomique est fréquent, atteignant 70 à 90 % (P. Devaux 1998; Foroughi Wehr, Wenzel 1993). Par conséquent, indépendamment du génotype, le niveau diploïde sera souvent obtenu sans colchicine ou autre traitement antimitotique (Kahrizi, Mohammadi 2009). Cependant, le nombre élevé de plantes albinos résultant de cette technique diminue le rendement de l'androgénèse (C. P. Hunter 1988) c'est-à-dire le développement de plantes verts.

Le stress salin ou la pression sélective contrôlée *in vitro* permet une haplodiploïdisation susceptible de mettre en évidence la concentration sublétales de sel. Ainsi, l'androgénèse conduite dans des conditions de stress salin faciliterait la sélection de variétés résistantes ou tolérantes à la salinité et donc à la sécheresse ce qui réduit la durée du cycle de sélection des variétés d'orge les mieux adaptées aux régions arides et semi-arides.

II. Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de trois générations Parent (P), génération (G1) et (G2) issues d'autofécondations successives de trois variétés fixes d'orge de printemps ($2n = 14$), Asni (A) modérément sensible et Tamelalt tolérante à la salinité (Tm) avec deux rangs, et Arig (O) sensible à la salinité avec six rangs, fournies par l'INRA-Settat (Annexe 1).

Classification systématique

Règne	Végétale
Sous règne	Eucaryotes
Embranchement	Archégoniates
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Glumales
Famille	Poacées (Graminées)
Sous famille	Festucoïdées
Tribu	Triticées
Sous tribu	Triticinées
Genre	<i>Hordeum</i>
Espèce	<i>Hordeum vulgare</i>
Nom vernaculaire	Orge

2. Semis de plantes mères

Le semis des grains d'orge a été réalisé dans des pots de 20 cm de diamètre à raison de 7 grains par pot cultivés sous serre expérimental à la Faculté des Sciences et Techniques de Settat. Le semis a été échelonné du mois de novembre jusqu'au mois de février avec un décalage de cinq jours entre deux semis successifs. L'arrosage quotidien et le désherbage manuel ont été régulièrement pratiqués pour garder de bonnes conditions de croissance et éviter toute concurrence avec les plantes adventices. Le bon état sanitaire de l'expérimentation a permis de n'avoir recours à aucun traitement anti-fongique ou anti-parasitaire.



Photo 1: Culture sous serre des plantes mères à la faculté des Sciences et Technique de Settat.

3. Le prélèvement des épis

Le prélèvement des épis et la mise en culture *in vitro* (CIV) a été fait quand les grains de pollen sont au stade uninucléé à noyau centré. L'étude cytologique est indispensable pour déterminer précisément le stade adéquat de prélèvement des épis. Les trois étamines ont été fixées et colorées dans le mélange du carmin acétique, elles sont ensuite écrasées modérément entre lame et lamelle afin de dissocier les cellules les unes des autres et libérer les microspores. Cette technique présente l'avantage d'être rapide et permet de repérer facilement les différents stades de la microsporogénèse. (Photo 2)

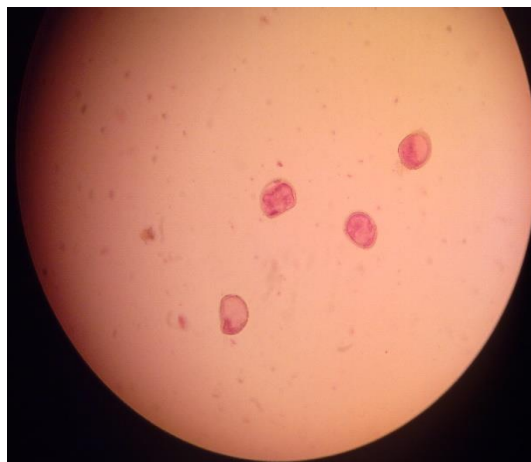


Photo 2: Stade de la microspore en fonction de la position du noyau par rapport au pore.

Pour faire le repérage de ce stade des critères phénotypiques en relation avec le stade du gamétophyte mâle ont pu être définis telles la longueur des barbes émergeant de la gaine de la dernière feuille (Blanc 1990; Forest 1988; Kandil 1990) ou la distance entre les deux dernières

feuilles appelé espace interligulaire (P Devaux 1987). Cette distance est comprise entre 2,5 et 5 cm pour les variétés Asni et Tamelalt et entre 3 et 8 cm pour la variété Arig (El-Goumi 2015). En fonction des conditions de culture des plantes mères, ces critères sont très variables d'une variété à une autre.

4. Le prétraitement au froid

Les épis récoltés au moment où les microspores sont au stade uninucléé à noyau centré sont prétraités au froid à 4 °C pendant 14 jours (Powell 1988; El-Goumi 2015). Ils sont enroulés dans du papier filtre imbibé d'eau et du papier aluminium et mis au réfrigérateur à 4 °C. Les épis n'ayant subi aucun prétraitement et dont les anthères ont été directement extraites et mises en culture sur le milieu d'induction ont été utilisés comme témoin.

5. La culture *in vitro*

La culture *in vitro* d'anthères a été réalisée en trois années successives (2013, 2014 et 2015).

5.1. Phase d'induction

Avant la mise en culture, les épis témoin ou prétraités au froid sont stérilisés sous hotte à flux laminaire par de l'éthanol 95° sur du papier absorbant stérile. Après élimination des glumes et glumelles, 11343 anthères (Tableau 2) sont prélevées à l'aide d'une pince à pointe fine stérile et déposées en position coté (Malika Fakiri 1995; El-Goumi et al. 2017), à raison d'un épi par boîte, dans des boîtes de Pétri de 55 mm contenant le milieu d'induction FHG modifié (C. P. Hunter 1988) et additionné de 2 mg.L⁻¹ d'ANA et 1 mg.L⁻¹ de BAP à pH 5,6 (Annexe 2). Ce milieu a été utilisé afin d'induire la formation des cals et/ou embryons.

Pour toutes les variétés, avec et sans prétraitement au froid, les boîtes inoculées ont été scellées avec du parafilm et incubées à 25 °C pendant 4 à 8 semaines, dans une étuve à l'obscurité.

Tableau 2: Nombre d'anthères et d'embryons utilisés durant l'expérimentation.

Variété	Tm P	Tm G1	Tm G2	A P	A G1	A G2	O P	O G1	O G2	Somme
Anthères mises en culture	1857	2187	2733	563	143	1045	430	1050	735	11343
Anthères réactives	36	45	86	62	116	149	8	16	9	527
Embryons non stressés	53	159	129	115	282	286	27	46	10	1107
Embryons stressés	54	152	129	121	294	318	27	47	10	1152

Tm P : Tamelalt P, **Tm G1** : Tamelalt G1, **Tm G2** : Tamelalt G2, **A P** : Asni P, **A G1**: Asni G1, **A G2**: Asni G2, **O P**: Arig P, **O G1**: Arig G1, **O G2** : Arig G2.

5.2. Phase de régénération

La régénération des 2259 cals ou embryons, c'est-à-dire des formations (1 à 2 mm de diamètre) formé à partir d'anthères a été faite à la fois à la Faculté des Sciences et Techniques de Settat et à l'institut de Genech en France dans respectivement des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre et des barquettes en plastique de 80, contenant du milieu de régénération FHG à pH 5,8, additionné de 35 g.L⁻¹ de saccharose et 0,4 mg.L⁻¹ de BAP (annexe 2).

Le principe de la méthode de pression sélective utilisée est basé sur le transfert de formations formées sur milieu d'induction, issue soit des anthères prétraitées au froid ou non (témoin), sur milieu de régénération additionné de concentration croissante en sel. Simultanément avec des cultures témoins sur un milieu de régénération sans sel, selon la figure 15, des concentrations croissantes de NaCl ont été progressivement ajoutées à ce milieu, jusqu'à la concentration sublétales afin d'accroître la tolérance au stress salin. Après une à deux semaines, ils ont régénéré des plantules haploïdes vertes ou albinos (Photo 3).

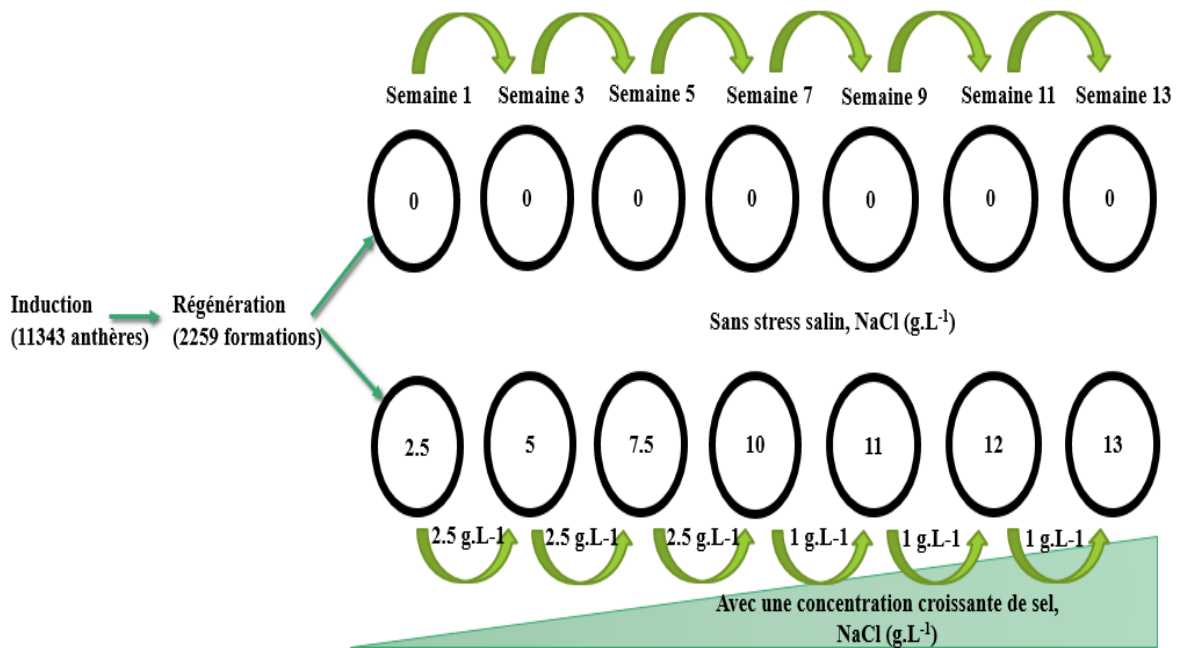


Figure 15 : Schéma expérimental de la pression sélective

Après la phase d'induction, les callosités et embryons (formations) ont été placés sur du milieu de régénération. Pendant toute l'expérience, les boîtes de contrôle étaient constituées de cultures sur milieu sans sel. Parallèlement, les formations ont été placées sur le même milieu de régénération contenant au départ 2,5 g.L⁻¹ de NaCl. Toutes les deux semaines, le transfert des cals et/ ou non régénérés a été effectué sur un nouveau milieu frais avec des concentrations croissantes en sel de 5, 7,5, 10, 11, 12 et 13 g.L⁻¹. Jusqu'à 10 g.L⁻¹, un écart de 2,5 g.L⁻¹ a été utilisé, au-delà de 10 g.L⁻¹ de NaCl, un incrément de 1 g.L⁻¹ a été appliqué. Les plantules chlorophylliennes formées sur milieu témoin ou salin sont transférées sur milieu d'enracinement.

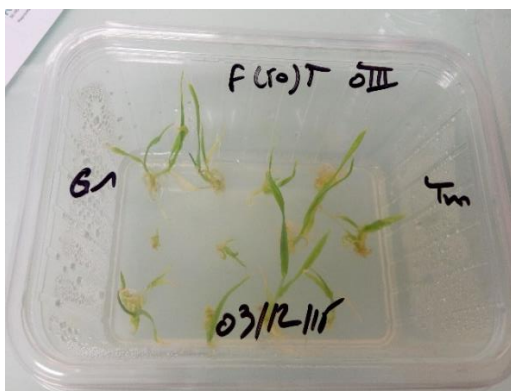


Photo 3 : Régénération de plantes (Décembre 2015 à l'institut de Genech, France).

Les plantes chlorophylliennes obtenues soit sur milieu témoin ou milieu salin sont transférées sur milieu d'enracinement contenant 20 g.L⁻¹ de saccharose et 1 mg.L⁻¹ d'ANA (Annexe 2). Une fois bien enracinées (photo 4), elles sont repiquées en petits pots contenant 2/3 sable et 1/3 terreau pour assurer leur développement et leur tallage. (Photo 5)



Photo 4: Plantules chlorophylliennes bien enracinées (Janvier 2016 à la FSTS)



Photo 5: Acclimatation des plantes androgénétiques (Janvier 2016 à la FSTS)

Les paramètres suivants ont été calculés :

- Taux d'induction (I %) = (Nombre d'anthères réactives / nombre d'anthères mises en culture)*100
- Taux de régénération (R %) = (Nombre total de plantes régénérées / Nombre de cals et/ou embryons mis en régénération)*100
- Taux d'albinisme (A %) = (Nombre de plantes albinos / Nombre total de plantes régénérées)*100

Analyse statistique :

L'analyse statistique a été effectuée par le logiciel JMP SAS version 11 pour estimer l'existence d'interactions entre les différents paramètres étudiés. Une variable est considérée comme significative si $p < 0.05$. Le logiciel SPSS a été utilisé pour étudier l'effet génotype sur l'induction et la régénération en utilisant le test Duncan (**Duncan 1955**) qui se base sur la comparaison des moyennes.

III. Résultats

Après 4 à 8 semaines de mise en CIV d'anthers des variétés étudiées, des structures bien différenciées embryogènes et/ou callogènes apparaissent. La morphogenèse observée sous loupe binoculaire d'embryons ou de cals et de plantes régénérées chez les trois variétés Asni, Tamelalt et Arig est semblable aux stades initiaux. Ensuite, ces structures évoluent en embryons (Photo 6, a) ou cals (Photo 6, b). Dans certains cas, nous avons observé des cals embryogènes constitués de cellules de type embryogène évoluant en embryon d'origine unicellulaire (Photo 6, c).

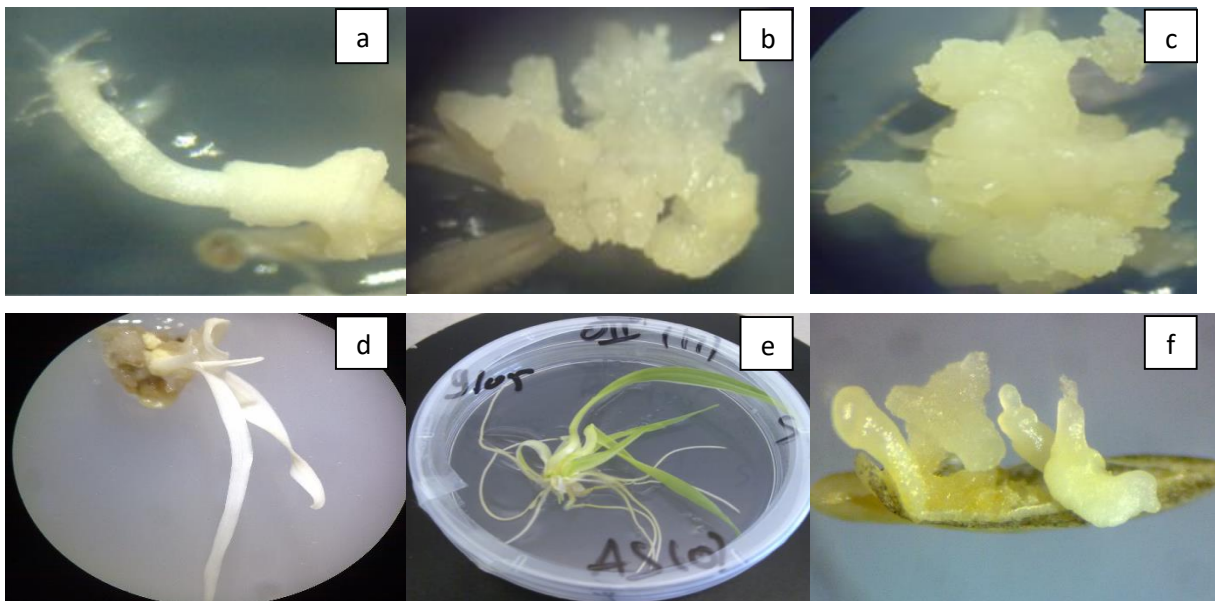


Photo 6: Structures morphogénétiques obtenues en androgenèse.

a : embryon androgénétique, b : cal androgénétique, c : cal embryogène, d : Premières ébauches foliaires de plante régénérée, e : plantule chlorophyllienne bien enracinée, f : embryons et cal granulé formés sur le lobe supérieur de l'anthere.

1. Induction

1.1. Effet du génotype

Les résultats montrent l'effet du génotype sur la réponse androgénétique chez les trois variétés étudiées. Tous prétraitements confondus, le génotype influence la réponse des anthers à l'induction. Les trois générations de la variété Asni présentent les taux d'induction les plus élevés, allant de 9,29 % pour P à 14,07 % pour G1 et 13,97 % pour G2. Par contre Arig s'est montrée la plus faible par rapport aux autres variétés dans la capacité d'induction de cals et/ou d'embryons, les taux enregistrés sont respectivement pour P et G1 de 1,42 % et 1,26 % (Figure 16).

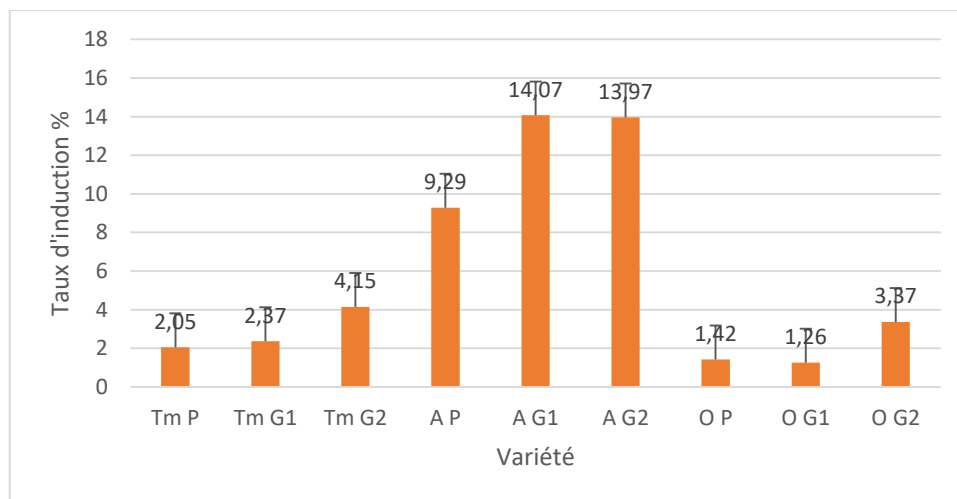


Figure 16 : Effet du génotype sur l'induction androgénétique.

Tm P: Tamelalt P, **Tm G1 :** Tamelalt G1, **Tm G2 :** Tamelalt G2, **A P :** Asni P, **A G1:** Asni G1, **A G2:** Asni G2, **O P:** Arig P, **O G1:** Arig G1, **O G2 :** Arig G2.

Le test Duncan nous a permis de partager les neuf variétés étudiées en quatre groupes homogènes en comparant leurs moyennes. Le premier groupe regroupe Arig G1, Arig P, Tamelalt P et Tamelalt G1, le deuxième et le troisième groupes contiennent respectivement la génération G2 de Arig et Tamelalt et Asni P et le dernier groupe regroupe Asni G2 et Asni G1.

Tableau 3: Classification en fonction de taux d'induction des variétés d'orge en groupes homogènes, selon le test Duncan.

Variété	I % groupe 1	I % groupe 2	I % groupe 3
Arig G1	1.26		
Arig P	1.42		
Tamelalt P	2.05		
Tamelalt G1	2.37		
Arig G2	3.73	3.73	
Tamelalt G2	4.15	4.15	
Asni P		9.29	9.29
Asni G2			13.97
Asni G1			14.07
Signification (p)	0.377	0.060	0.106

Les trois groupes 1, 2 et 3 se distinguent par leur capacité à induire des formations. Dans un même groupe, les valeurs ne diffèrent pas de manière significative.

Selon les taux d'induction enregistrés, les trois générations de chaque variété n'étaient pas significativement différentes, soulignant ainsi la stabilité génétique après deux générations d'autofécondation.

1.2. Effet du prétraitement au froid

Les résultats obtenus montrent une hétérogénéité de réponse au prétraitement au froid. Pour Asni le prétraitement au froid a un effet négatif sur l'induction embryonnaire : les taux sont passés de 24.58 % à 2.55 % pour G2, de 21.13 % à 0.83 % pour G1 et de 10.45 % à 7.67 % pour P. Pour Tamelalt G1 et Arig P, le froid se révèle aussi négatif : les taux ont baissé de 3.75 % à 1.10 % pour Tm G1 et de 2,09 % à 0,89 % pour O P. Par contre pour les générations P et G2 de la variété Tamelalt, le prétraitement entraîne une légère diminution du taux d'induction passant respectivement de 2.17 % à 1.94 % et de 4.69 % à 4.14 %. Alors que pour les deux générations G1 et G2 de la variété Arig, nous avons remarqué une forte augmentation des taux d'induction après prétraitement au froid dont le taux a passé de 0 % pour les deux générations à 7,08 % pour G2 et à 3,91 % pour G1.

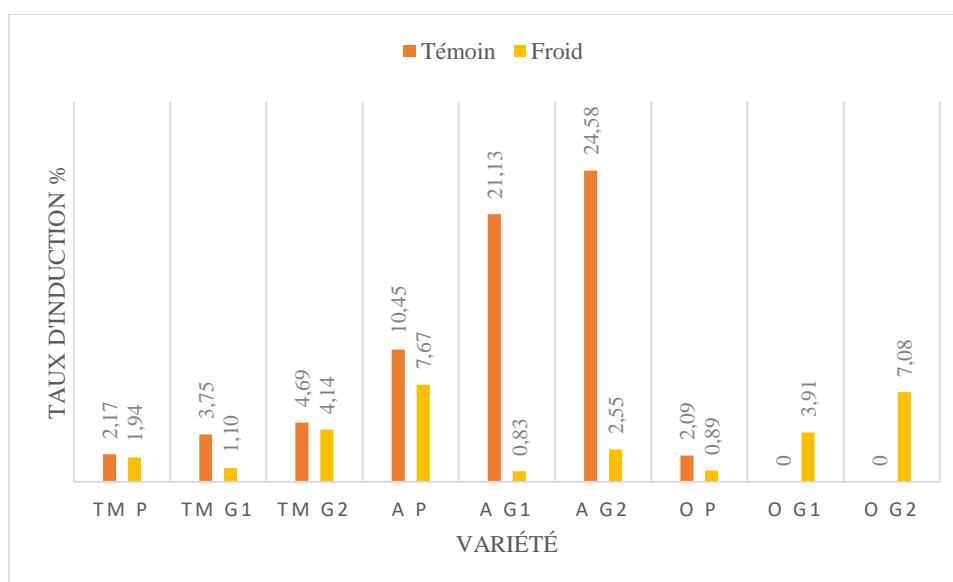


Figure 17 : Effet du prétraitement au froid sur l'induction pour chaque génotype.

Tm P : Tamelalt P, **Tm G1 :** Tamelalt G1, **Tm G2 :** Tamelalt G2, **A P :** Asni P, **A G1:** Asni G1, **A G2:** Asni G2, **O P:** Arig P, **O G1:** Arig G1, **O G2 :** Arig G2.

Le test χ^2 montre l'effet du prétraitement au froid sur la capacité androgénétique des variétés étudiées. Le test statistique met en évidence la réponse hautement significative ($P < 0.0001$) des générations G1 et G2 des deux variétés Asni et Arig.

Paramètre	Tm P	Tm G1	Tm G2	A P	A G1	A G2	O P	O G1	O G2
χ^2	0,088	2,592	0,025	1,715	54,582	104,091	0	52,821	25,057
ddl	1	1	1	1	1	1	1	1	1
valeur p	0,7662	0,1074	1,8754	0,1903	<,0001***	<,0001***	1,9939	<,0001***	<,0001***

*** : Hautement significatif

2. Régénération

Dans cette étude, nous avons étudié l'effet du génotype, du prétraitement au froid et du stress salin. 2259 cals et/ou embryons ont été repiqués sur milieu de régénération additionné de concentrations croissantes en NaCl (0 (témoin), 2,5, 5, 7,5, 10, 11, 12 et 13 g.L⁻¹) afin de régénérer des plantes résistantes ou tolérantes au stress salin.

2.1. Effet du génotype

Tous prétraitements et stress salins confondus, le repiquage de 2259 formations, comprenant 1107 témoins (sans stress salin) et 1152 stressés (Tableau 2), sur milieu de régénération a mis en évidence l'hétérogénéité de réponse des différentes générations des variétés étudiées. Les taux de régénération diffèrent selon la variété, Arig P présente le taux de régénération le plus élevé (8.66 %) alors que les générations G1 et G2 de la même variété enregistrent les taux de régénération les plus faibles de 1,36 % et 1,25 % respectivement (Figure 18).

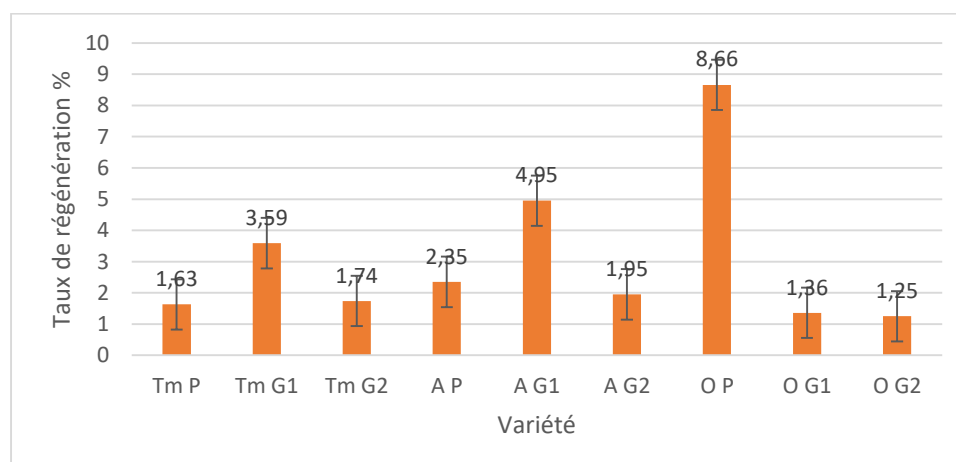


Figure 18 : Effet du génotype sur la régénération.

Quant à l'effet du génotype sur la régénération, le test Duncan montre que la variété Arig P n'appartient pas au même groupe que les autres variétés.

Tableau 4 : Comparaison des moyennes de régénération des variétés d'orge par le test Duncan

Variété	Groupe 1	Groupe 2
Arig G2	1,25	
Arig G1	1,36	
Tamelalt P	1,63	
Tamelalt G2	1,74	
Asni G2	1,95	
Asni P	2,35	
Tamelalt G1	3,59	
Asni G1	4,95	
Arig P		8,66
Signification (p)	,060	1,000

2.2. Effet du prétraitement

Les résultats de l'effet du prétraitement au froid sur la régénération androgénétique montrent que le froid a un effet positif sur la régénération des variétés Tm G2, A P, O P et O G2. Les taux de régénération passent respectivement de 1.55 % à 18.75 %, de 6.06 % à 11.67 %, de 0 % à 27.5 % et de 0 % à 5 %. Par contre pour les autres variétés, le prétraitement au froid a influencé négativement leur régénération.

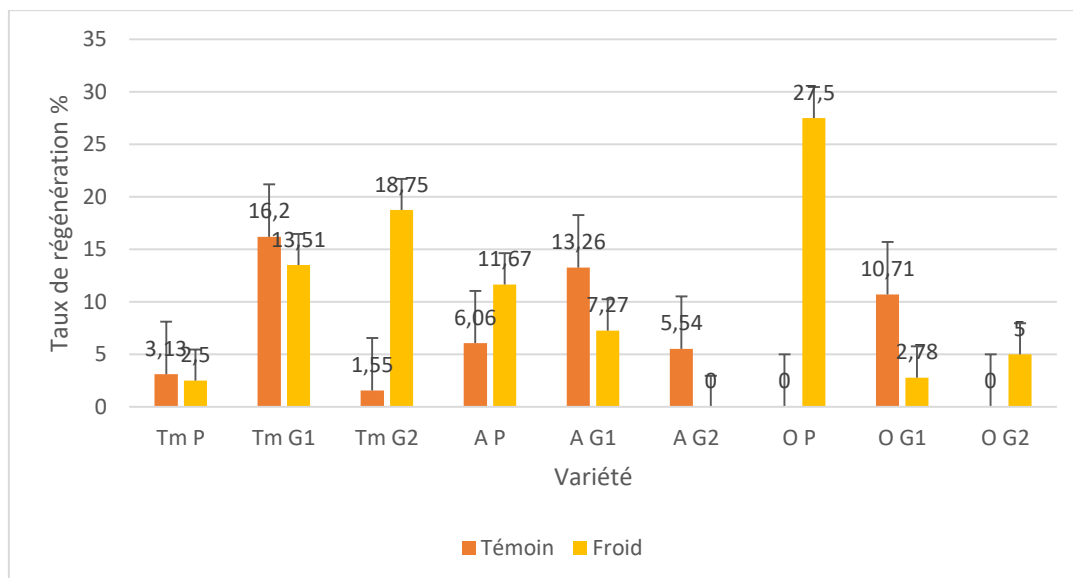


Figure 19 : Taux de régénération R % par variété en fonction du prétraitement au froid.

Les résultats obtenus du test χ^2 mettent en évidence l'effet génotype qui a un rôle très important pour la régénération. Lors du prétraitement au froid, les génotypes montrent un effet hautement significatif pour les deux séries (témoin, prétraitement au froid). Cet effet positif du prétraitement au froid est uniquement marqué chez la variété Tm G2 ($p < 0.05$).

Effet	Génotype/prétraitement		Prétraitement/génotype								
	Témoin	Froid	Tm P	Tm G1	Tm G2	A P	A G1	A G2	O P	O G1	O G2
χ^2	18,618	18,593	0,302	2,433	12,766	1,137	1,915	1,883	0	4,003	0
ddl	6	8	1	1	1	1	1	1	0	1	0
Valeur P	0,017*	0,0049**	0,5827	0,1188	0,0004**	0,2864	0,1664	0,17	.	0,0454*	.

* : significatif, **très significatif, *** : hautement significatif

Génotype/prétraitement : la réponse des génotypes au prétraitement au froid (tous génotypes confondus)

Prétraitement/génotype : l'effet du prétraitement au froid sur chaque génotype (tous prétraitements confondus)

2.3. Effet du stress salin

Pour le stress salin, les résultats montrent l'effet négatif du sel sur le taux de régénération quel que soit la variété. Dans les conditions de contrôle (sans stress salin), les taux maximaux de régénération étaient de 29,6 % pour O P, 12,4 % pour A G1 et 15,1 % pour Tm G1. Mais malgré cette efficacité, il y avait un niveau élevé d'albinisme, atteignant souvent 100 %. Seul O P avec 37,5 % et Tm G1 avec 50 % d'albinisme ont donné des plantes vertes. Après culture sur milieu salin, les valeurs de régénération les plus élevées ont été exprimées à 5 gL^{-1} de stress

salin, pour A G1 et A G2, avec des taux de 5,8 % et 4 %, respectivement, et pour lesquels l'albinisme est apparu à un niveau de 94,1 % pour A G1 et 92,3 % pour A G2. La plupart des régénérants se sont révélés être albinos, mais la régénération s'est produite dans plusieurs valeurs de concentrations de sel, jusqu'à 12 g.L⁻¹ comme pour A G1 avec un taux de 0,2 %.

Tableau 5: Taux de régénération et d'albinisme pour chaque génération et variété développée sur un milieu de régénération témoin ou salin.

NaCl (g.L ⁻¹)	O P		O G1		O G2		A P		A G1		A G2		Tm P		Tm G1		Tm G2	
	R %	A %	R %	A %	R %	A %	R %	A %	R %	A %	R %	A %	R %	A %	R %	A %	R %	A %
0	29.6	37.5	8.7	100	10	100	8.4	100	12.4	100	8.4	100	5.7	100	15.1	50	4.7	100
2.5	3.7	100	0	-	0	-	4	100	2.9	100	0	-	0	-	0	-	0	-
5	3.7	100	0	-	0	-	0.8	100	5.8	94.1	4	92.3	3.4	100	1.2	100	3.1	100
7.5	3.1	100	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
10	0	-	0	-	0	-	0.7	100	0.5	100	0.5	100	0	-	0	-	0	-
11	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
12	0	-	0	-	0	-	0	-	0.2	100	0	-	0	-	0	-	0	-
13	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-

O: Arig, As: Asni, Tm: Tamelalt

P: Parent, G1: 1^{er} génération d'autofécondation et G2: 2^{ème} génération d'autofécondation

R %: Taux de régénération, A %: Taux d'Albinisme

Les résultats sont rapportés pour chaque génération. Les rapports des régénérants totaux et des albinos sont donnés en pourcentage, sur le nombre de formations, après culture sur milieu sans sel ou sur milieu avec des concentrations croissantes de NaCl.

Dans les conditions de stress salin, le test χ^2 montre que l'effet du génotype reste le plus marqué pour le témoin sans adjonction de sel. Pour toutes concentrations salines confondues, les variétés A G1 et Tm G1 présentent des résultats significatifs par rapport aux autres dont la valeur p est de 0.0432 pour A G1 et de 0.0140 pour Tm G1. Par contre lors du stress salin, le test χ^2 montre l'effet négatif de NaCl sur la régénération.

Effet Paramètres	Génotype/NaCl		NaCl/génotype								
	Témoin	NaCl	O P	O G1	O G2	A P	A G1	A G2	Tm P	Tm G1	Tm G2
Test χ^2	40.334	19.372	3.360	0	0	1.584	4.088	3.747	0,017	6.036	0.147
ddl	15	15	1	0	0	1	1	1	1	1	1
Valeur P	0.0004***	0,1974	0.0668	.	.	0.2082	0.0432*	0.0529	0.8971	0.0140*	0.7013

* ; significatif, *** : hautement significatif

Génotype/NaCl : la réponse des génotypes au stress salin (tous génotypes confondus)

NaCl/génotype : l'effet du stress salin sur chaque génotype (toutes concentrations NaCl confondues)

3. Albinisme

Quel que soit la variété, le développement *in vitro* de cals et/ou embryons en plantes chlorophylliennes ou albinos montre que le taux d'albinisme est très fréquent et atteint 100 % chez la majorité des variétés étudiées. Pour tous prétraitements et stress salin confondus, ce taux varie des valeurs minimales de 53.57 % enregistrée par la variété Tm G1 et 54,55 % par O P, à une valeur maximale de 100 % pour Tm P, Tm G2, A P, O G1 et O G2 (Figure 20).

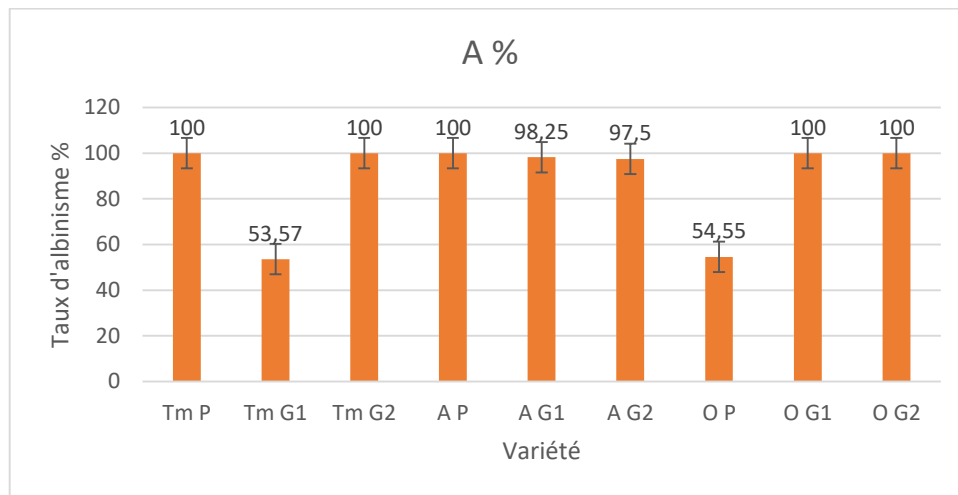


Figure 20 : Taux d'albinisme par variété pour tous prétraitements et stress salins confondus.

Tm P: Tamelalt P, **Tm G1 :** Tamelalt G1, **Tm G2 :** Tamelalt G2, **A P :** Asni P, **A G1:** Asni G1, **A G2:** Asni G2, **O P:** Arig P, **O G1:** Arig G1, **O G2 :** Arig G2.



Photo 7: Fréquence de production de plantes albinos par culture *in vitro* d'anthères.

3.1. Effet du prétraitement au froid

Les résultats portés sur le tableau 6 expriment le nombre de plantes albinos obtenues par rapport au nombre total de plantes régénérées, la figure 21 montre que le taux d'albinisme est très fréquent et atteint 100 % pour toutes les variétés à l'exception des variétés Tamelalt G1 et Arig P sans prétraitement (témoin) et Asni G1 et G2 prétraitées au froid dont les taux d'albinisme sont respectivement de 13.33 %, 54.54 %, 98.18 % et 97.44 %.

Tableau 6: Nombre de plantes vertes et albinos régénérées dans des conditions de contrôle et de prétraitement au froid, selon la variété (Tous stress salin confondus).

Conditions Plants	Témoin			Froid			Nombre total par variété
	Verte	Albinos	Somme	Verte	Albinos	Somme	
Arig P	0	0	0	5	6	11	11
Arig G1	0	3	3	0	1	1	4
Arig G2	0	0	0	0	1	1	1
Σ Arig	0	3	3	5	8	13	16
Asni P	0	7	7	0	7	7	14
Asni G1	1	54	55	0	2	2	57
Asni G2	1	38	39	0	1	1	40
Σ Asni	2	99	101	0	10	10	111
Tamelalt P	0	4	4	0	1	1	5
Tamelalt G1	0	13	13	13	2	15	28
Tamelalt G2	0	7	7	0	3	3	10
Σ Tamelalt	0	24	24	13	6	19	43
Nombre total par traitement	2	126	128	18	24	42	170

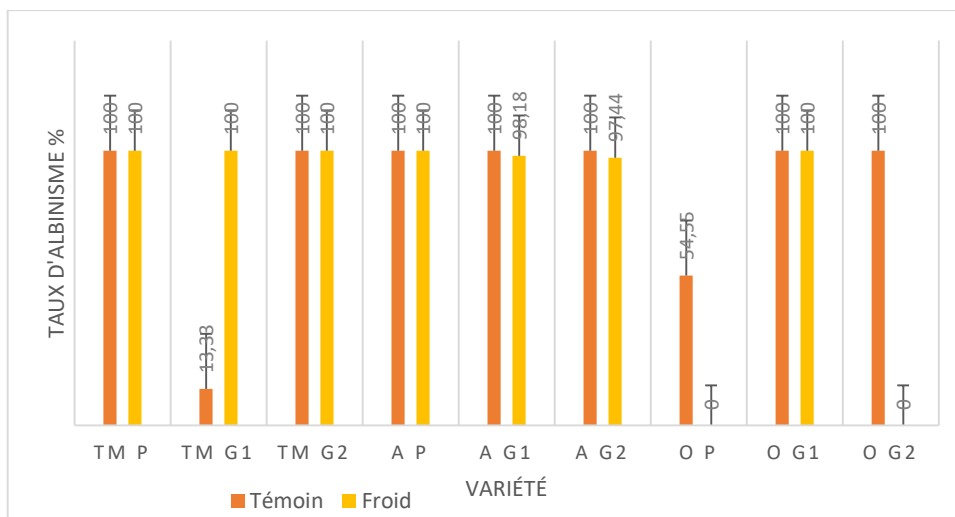


Figure 21 : Taux d'albinisme par variété en fonction du prétraitement au froid.

Remarque : les valeurs 0 dans la figure signifie l'absence de plantes chlorophylliennes ou albinos.

3.2. Effet du stress salin

Le nombre de plantes chlorophylliennes et albinos formées à partir d'embryons et cals et le taux d'albinisme chez les différentes variétés étudiées sont indiqués dans la figure 22. La figure montre que la fréquence d'albinisme est élevée quel que soit la variété et atteint 100 %. Les taux d'albinisme les plus faibles sur milieu témoin ont été enregistrés chez les variétés Arig P (37,5 %) et Tamelalt G1 (50 %), en présence du stress salin les taux les plus faibles ont été enregistrés par Asni G1 et Asni G2 et ils sont de l'ordre de 95,45 % et 93,75 % respectivement.

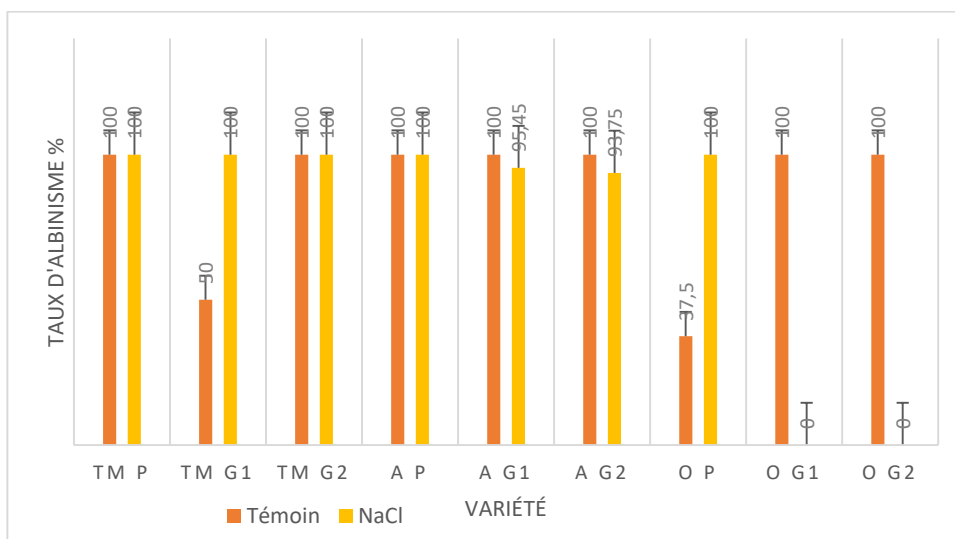


Figure 22 : Taux d'albinisme par variété en fonction du stress salin.

Remarque : Aucune plante n'est obtenue pour les variétés O G1 et O G2 stressées au sel.

On remarque que le stress salin a réduit significativement la productivité de plantes vertes. Sans stress salin, nous avons pu avoir 13 plantes vertes de la variété Tamelalt G1 et 5 de la variété Arig P. Bien que l'albinisme reste un obstacle majeur à la régénération de plantes vertes en présence du stress salin chez l'orge, nous avons pu sélectionner deux plantes vertes de la variété Asni, une plante de chaque génération G1 et G2 à une concentration de 5 g.L⁻¹ de NaCl (Tableau 7 et 8).

Tableau 7: Nombre de plantes chlorophylliennes et albinos régénérées en fonction de la concentration de NaCl.

	Contrôle		Stress salin g.L ⁻¹													
	0		2,5		5		7,5		10		11		12		13	
Variété	Ch	Ab	Ch	Ab	Ch	Ab	Ch	Ab	Ch	Ab	Ch	Ab	Ch	Ab	Ch	Ab
Tm P	0	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tm G1	13	13	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tm G2	0	6	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A P	0	10	0	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
A G1	0	35	0	2	1	16	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0
A G2	0	24	0	1	1	12	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
O P	5	3	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
O G1	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O G2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

En se basant du tableau 8, le témoin, sans sel, a donné un nombre total de 117 plantes régénérées pour les trois variétés, comprenant 99 albinos et 18 plantes vertes. La voie de stress salin a régénéré 53 plantes, dont 51 albinos, tandis que 2 plantes sont vertes obtenues pour Asni, sur milieu salin 5 g.L⁻¹. Parmi le nombre total de 170 régénérants, il y avait 150 albinos et 20 plantes vertes.

Tableau 8: Nombre de plantes vertes et albinos régénérés sous stress salin

Conditions Plants	Témoin			Stress salin			Nombre total par variété
	Verte	Albinos	Somme	Verte	Albinos	Somme	
Arig	5	8	13	0	3	3	16
Asni	0	69	69	2	40	42	111
Tamelalt	13	22	35	0	8	8	43
Nombre total par traitement	18	99	117	2	51	53	170

Nombre de plantes régénérées inventoriés pour la voie de contrôle et également pour les résultats cumulés des expériences de stress salin.

L'analyse statistique des résultats obtenus après cette étude montre un effet non significatif du stress salin contrairement au témoin sur la régénération et l'albinisme pour tous géotypes confondus. Pour chaque variété l'effet significatif a été uniquement marqué chez les variétés Asni et Tamelalt pendant la phase de régénération alors que pour l'albinisme les trois variétés ont enregistré des résultats non significatifs.

	Effet	Géotype/NaCl		NaCl/géotype		
	Paramètres	Témoin	NaCl	Arig	Asni	Tamelalt
Reg	χ^2 Test	79.520	48.988	44.000	305.452	219.750
	ddl	2	12	1	1	1
	p-value	0.0004***	0.213	0.142	0.049*	<000***
Alb	χ^2 Test	6.000	1.143	4.000	5.000	2.000
	ddl	2	12	1	1	1
	p-value	<0001***	0.565	0.261	0.287	0.157

Reg : Régénération, **Alb** : Albinisme

Géotype/NaCl : la réponse des géotypes au stress salin (Tous géotypes cumulés)

NaCl/géotype : l'effet du stress salin par géotype (Toutes concentrations de NaCl cumulées)

p-value : signification, * : significatif, *** : hautement significatif

IV. Discussion et conclusion

L'application d'un stress salin aux cals et embryons durant la phase de régénération par l'adjonction des concentrations croissantes en NaCl a pour objectif de sélectionner des lignées pures d'orge de printemps marocaines (*Hordeum vulgare* L.) tolérantes à la salinité chez trois variétés Asni, Tamelalt et Arig. Le but est de déterminer le seuil de résistance à la salinité chez

les cals et/ou embryons régénérants dérivés de chacun de ces variétés et d'obtenir des plantes HD potentiellement résistantes ou tolérantes à la salinité.

La réussite de la culture *in vitro* est dépendante de plusieurs facteurs tels que la saison de développement, les conditions de culture de la plante donneuse, le génotype, la position du bouton floral, le stade de prélèvement et le prétraitement (Labrani 2007; Kahrizi et al. 2011; Hentour et al. 2016). Dans cette étude, seul l'effet du génotype et du prétraitement aussi bien sur le taux d'induction que sur la régénération en condition de stress salin ont été analysés. L'effet du génotype est nettement marqué ce qui est en accord avec bon nombre de travaux antérieurs (Kahrizi et al. 2011; El-Goumi 2015).

Quant au prétraitement au froid à 4 °C pendant 14 jours, les résultats obtenus semblent montrer l'effet négatif de ce prétraitement sur l'induction de la culture d'anthères quel que soit la variété à l'exception des deux générations G1 et G2 de la variété Arig pour lesquels le prétraitement s'est avéré bénéfique. Nos résultats sont en contradiction avec ceux de Karimzadeh et al. (1995) qui ont montré que le prétraitement au froid induit la formation de cals et la régénération de plantes vertes. Or Oleszczuk et al. (2006) suggèrent que le prétraitement au froid des talles à 4 °C pendant 2 semaines induit la division des microspores. Par ailleurs des résultats similaires chez la variété Igri ont été rapportés par Powell (1988) mais ils sont en contradiction avec ceux de Lazaridou et al. (2005) qui ont travaillé avec deux variétés d'orge de printemps à deux rangs Niki et Thermi et une variété d'hiver de blé tendre Karina. Par contre, certains auteurs ont montré que la chaleur donne des résultats meilleurs. Dumas de vaulx et al. (1981) ont prouvé que le passage des anthères de piment à 35 °C et à l'obscurité pendant les huit premiers jours de culture permet d'obtenir des plantes haploïdes et diploïdes à des fréquences plus élevées. Keller et al. (1979) ont ainsi montré que la culture des anthères de *Brassica campestris* à 35 °C pendant un ou trois jours avant la culture à 25 °C a considérablement stimulé le rendement d'embryons dérivés de microspores, plus de 100 plantes ont été régénérées à partir d'embryons cultivés avec une fréquence de plantes haploïdes supérieure à 70 %. Par conséquent, il reste toujours à comprendre que certains facteurs peuvent en influencer d'autres comme les conditions de culture peuvent influencer l'état physiologique de la plante donneuse qui à son tour peut influencer la réussite du prétraitement et par la suite le rendement androgénétique lui-même (Lazar, Schaeffer, Baenziger 1990). D'après Kruczkowska et al. (2002), l'objectif de l'application du prétraitement avant l'ensemencement des anthères sur milieu d'induction est de provoquer un stress afin de changer la voie du développement des microspores de la voie gamétophytique vers la sporophytique. Pour ce qui est du taux d'induction, la variété Asni répond le mieux pour tout prétraitement confondu.

L'application de concentrations croissantes de NaCl lors des repiquages des cals et/ou embryon dans le milieu de régénération diminue clairement le taux de régénération des différentes variétés étudiées comparativement au témoin. En effet, El-Yacoubi et al. (2004) rapportent que le stress salin entraîne une réduction de croissance et la nécrose des cals, ce qui est approuvé par nos résultats dont le taux de régénération diminue en augmentant la concentration en NaCl. La différence de réponse des variétés vis-à-vis du stress salin met en évidence une interaction variété-stress salin qui est fortement dépendante de la variété. D'après notre travail, la variété Asni G1 montre une résistance au stress salin et régénère une plante à la concentration maximale de 12 g.L⁻¹. Par contre chez les autres variétés aucune régénération n'a été observée au-delà de 7,5 g.L⁻¹. Par ailleurs, Sibi et al. (2000) avaient trouvé des régénérants à des concentrations supérieures à 15 g.L⁻¹.

La régénération de plantes haploïdes par androgenèse est certes une technique efficace pour sélectionner les variétés résistantes à la salinité (Benderradji L 2013) mais les plantes régénérées sont souvent albinos ce qui limite l'utilisation de cette technique. Dans notre étude, les résultats montrent que les fréquences de l'albinisme varient entre 50 % et 100 % selon les variétés ; la production de plantes vertes dépend de la variété (Lazaridou et al. 2005) et les variétés Tamelalt G1 et Arig P présentent les taux d'albinisme les plus faibles respectivement de 53.57 % et 54.55 %. Castillo et al. (2000) et Caredda et al. (2004) ont montré que l'orge de printemps est une espèce récalcitrante conduisant à la régénération de plantes albinos pour la majorité des variétés, ce qui a été confirmé par nos résultats. Esteves & Belzile (2014) ont montré que les variétés d'orge à six rangs sont considérés comme particulièrement récalcitrantes en raison d'une faible fréquence d'embryogenèse et d'un taux élevé d'albinisme. Les résultats observés montrent que le stress salin n'améliore pas l'obtention de plantes chlorophylliennes où le taux moyen d'albinisme varie de 87.50 % pour le témoin à 89.32 % pour la série stress salin, ce qui rappelle les résultats obtenus par El-Goumi (2015). Nos résultats montrent aussi que le prétraitement au froid ne favorise pas la production de plantes vertes. D'après Oleszczuk et al. (2006) le type du prétraitement appliqué a un effet sur le nombre de plantes albinos et chlorophylliennes régénérées et sur leur fertilité. Sriskandarajah et al. (2015) ont augmenté le nombre de plantes vertes régénérées chez le cultivar de printemps Mitja, *Hordeum vulgare* L., de 6 % à 42 % en modifiant le mode de culture et la composition du milieu de culture par l'ajout d'hydrolysate de caséine à un milieu de régénération intermédiaire. Caredda et al. (1999b) ont montré, après des études cytologiques en microscopie électronique, que le problème d'albinisme est dû non seulement à des perturbations morphologiques des chloroplastes mais aussi à la quantité de ces derniers. En effet, il a été remarqué un nombre

inférieur de chloroplaste chez les microspores en régénération et aussi une diminution significative, chez les cultivars susceptibles à l'albinisme, de nombre de copies d'ADNcp par chloroplaste (Caredda et al. 2004). Des travaux antérieurs ont indiqué qu'un abaissement généralisé de la quantité de génomes chloroplastiques chez les microspores et des remaniements du génome chloroplastique seraient à l'origine de l'albinisme (Maglione 2018). À l'échelle biochimique, une absence de chlorophylle a et b a été signalée chez des plantes albinos issues d'androgenèse (Asakaviciute, Jacquard, Clement 2006).

Cette étude fait ressortir l'effet du stress salin sur la régénération *in vitro* des cals et/ou embryons par culture des anthères chez l'orge de printemps marocaine *Hordeum vulgare* L. Au cours de la phase d'induction, le prétraitement au froid potentialise la variété Arig à produire des cals et/ou embryons. Par contre, pour les autres variétés, l'application du prétraitement au froid a été néfaste pour l'induction des cals et/ou embryons et cet effet peut être dû aux conditions climatiques de culture de plantes donneuses. Les résultats ont montré que la variété Asni, quel que soit la génération, serait la variété la plus résistante à la salinité et capable de régénérer les plantes dans les concentrations de NaCl seraient les plus élevées. En effet, Asni G1 a donné une plante à une concentration maximale de 12 g.L⁻¹ NaCl. En présence de sel, toutes les plantes régénérées étaient albinos à l'exception de deux plantes vertes des variétés Asni G1 et Asni G2.

Chapitre III : *Evaluation de la tolérance à la salinité par germination in situ des grains androgénétiques et leurs parents d'autofécondation*

I. Introduction

La productivité agricole dans le monde entier est soumise à des contraintes environnementales, en particulier à la sécheresse et à la salinité en raison de leur impact élevé et de leur large distribution. Les plantes sont toujours exposées aux différents types de contraintes (abiotiques et/ou biotiques) dont le stress salin est l'une des principales contraintes abiotiques (Bartels, Sunkar 2005; Chadli, Belkhodja 2007) qui peuvent gravement réduire la croissance et le rendement des cultures. Les perturbations les plus importantes sont enregistrées au niveau de la rhizosphère (Binzel, Reuveni 2010) à cause de fortes accumulations de sels dans les eaux d'irrigation (Berthomieu et al. 2003).

L'accumulation de sels (et en particulier des sels de sodium) est une des principales menaces physiologiques qui pèsent sur les écosystèmes. Le sel perturbe le développement des végétaux en limitant leur assimilation des éléments nutritifs et en réduisant la qualité de l'eau à disposition pour les végétaux. Il affecte le métabolisme des organismes du sol et mène à une réduction importante de la fertilité du sol. Un niveau de salinité élevé des sols provoque le flétrissement des plantes du fait d'une augmentation de la pression osmotique et des effets toxiques des sels. La croissance des plantes est réduite immédiatement après l'exposition à NaCl avant que le Na⁺ ne s'accumule à des concentrations toxiques dans la pousse (Tilbrook et al. 2017).

Les végétaux ont un potentiel génétique considérable pour la tolérance aux stress environnementaux. En particulier le rendement des plantes cultivées présente différents degrés de sensibilité aux stress salin et hydrique (Zid. E, Grignon. C 1991). La tolérance à la présence des sels tel que le chlorure de sodium (NaCl) est une qualité largement recherchée chez les végétaux d'intérêt agronomique pour élargir leur culture dans les régions arides et semi arides. Cette qualité diffère d'une famille à l'autre, le riz se révèle plus sensible alors que l'orge est plus tolérant (Karan, Subudhi 2012). Le stress salin diminue, la germination quotidienne, le poids sec, la surface foliaire, la teneur en eau des feuilles et la teneur en K⁺ et augmente les teneurs en proline et en Na⁺ (Abdi et al. 2016).

La réponse au sel des espèces végétales dépend de plusieurs variables, commençant par l'espèce même, de sa variété, aussi de la concentration en sel, des conditions de culture et du stade de développement de la plante (Bennaceur et al. 2001; Mrani Alaoui et al. 2013). L'amélioration de la production agricole dans les zones touchées par la salinité est basée sur l'identification et la sélection des variétés tolérantes à ce stress.

La germination constitue une étape primordiale dans le cycle du développement des plantes. Vue son importance, notre étude sur les trois variétés d'orge Asni, Tamelalt et Arig et leurs descendances androgénétiques Tamelalt HD et Asni HD a été faite pour évaluer leur comportement germinatif et leur croissance à des concentrations croissantes en NaCl de 0, 5, 10 et 15 g.L⁻¹.

II. Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Afin d'évaluer l'effet de la salinité sur le processus de germination chez l'orge, nous avons utilisé des grains de trois générations Parent (P), G1 et G2 d'autofécondation de trois variétés se distinguant par leur résistance à la salinité (Tamelalt, Asni et Arig) et leur première génération des haploïdes doublés obtenus à partir de cals haploïdes dans notre laboratoire par Dr El Goumi Younes, Tamelalt HD (A4, A5, A6) stressés à 5 g.L⁻¹ de NaCl et Asni HD (A8) sans stress.

2. Conditions de croissance des plantes

Le pouvoir germinatif des grains est évalué à l'aide d'un test de germination *in situ* dans des boîtes de Pétri couvertes de papier filtre imbibé de 5 ml de solutions salines de différentes concentrations (5, 10 et 15 g.L⁻¹) et un témoin sans sel (0 g.L⁻¹). Les grains sont désinfectés avec de l'eau de javel à 5 % pendant 10 min, puis rincés abondamment à l'eau distillée stérile. Lors de chaque test, 3 répétitions de 5 grains de chaque génotype et chaque traitement (Figure 23) sont mises à germer dans un incubateur à 25 °C à l'obscurité et arrosés de 5 ml de solution appropriée chaque 3 jours jusqu'au 10^{ème} jour. La germination est identifiée par la sortie de la radicule des téguments de la gaine dont la longueur est d'au moins 2 mm (Hajlaoui, Denden, Bouslama 2007; Mrani Alaoui et al. 2013).

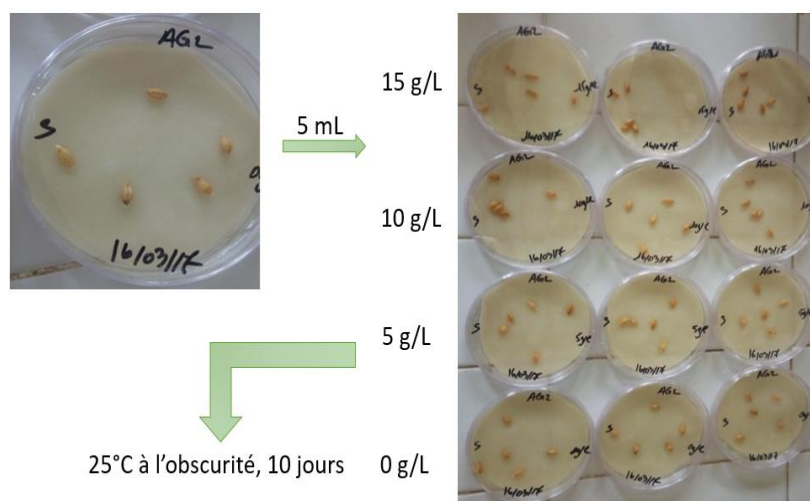


Figure 23 : Expérimentation utilisée pour le test de germination *in situ* des grains d'orge traités

3. Les paramètres mesurés

3.1. Le taux de germination

Il constitue le paramètre principal pour étudier la capacité de germination de différents génotypes utilisés. Il correspond au nombre de grains germés sur le nombre total de grains.

$$\text{GF \%} = (\text{Nombre total de grains germés} / \text{Nombre total de grains}) * 100$$

3.2. Longueur des racines et des épicotyles

La longueur de la racine primaire et celle de l'épicotyle ont été mesurées à l'aide d'une règle graduée et du logiciel image j, et ce pour évaluer la croissance de la plante vis-à-vis du stress.

3.3. Taille de la plante

Mesurée en cm après 10 jours de culture à différentes concentrations de chlorure de sodium.

3.4. La réversibilité de l'action du sel

Ce paramètre est mesuré pour déterminer l'origine de l'effet dépressif du sel s'il est de nature osmotique ou toxique. Les grains sont mis à germer à 15g.L^{-1} pendant 4 jours à raison de 5 grains par boîte avec 3 répétitions. Au quatrième jour, les grains non germés sont rincés 3

fois pour éliminer le sel non absorbé puis transférés dans des boîtes recouvertes de papier wattman imbibé d'eau distillée stérile pour 4 jours supplémentaires.

3.5. Le nombre de racines

Ce paramètre nous permet d'étudier l'effet du sel sur la rhizogenèse chez l'orge.

3.6. La teneur relative en eau

Elle correspond à la quantité d'eau liquide contenue dans la plante germée. La teneur en eau est mesurée directement en pesant d'abord le poids frais de 5 plantes, ce qui détermine une masse : m_h , puis le pesant après l'avoir passé dans une étuve à 60 °C pendant 24h pour faire évaporer l'eau : on mesure ainsi un poids m_s , nécessairement inférieur au précédent.

$$\text{TRE \%} = [(m_h - m_s) / m_s] \times 100$$

4. Analyse statistique

Les résultats sont soumis à l'analyse de la variance (ANOVA) et les moyennes sont comparées selon la méthode de Duncan au seuil de 5 % pour déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes.

III. Résultats

Les résultats obtenus après cette étude mettent en évidence la relation génotype/concentration NaCl et montrent que l'agent stressant, NaCl, a une influence sur les différents paramètres étudiés.

En effet, les résultats de l'analyse de la variance (ANOVA) ont révélé des effets très hautement significatifs pour le génotype, le stress salin et pour l'interaction génotype x stress salin (Tableau 9).

Tableau 9: L'analyse de la variance (ANOVA) des paramètres étudiés chez les génotypes d'orge des différents traitements

Source de variation	ddl	G F %	Long racine	Long épicotyle	Taille de la plante	Nbre de racines	Réversibilité NaCl	TRE
Génotype	12	589,74***	29,02***	13,14***	7515,41***	9,55**	1900,16***	10,38***
NaCl	3	4319,37***	1200,53***	2753,97***	63,51***	15,429**	11634,60***	6032,77***
Génotype x NaCl	36	402,09***	33,28***	22,38***	93,81***	3,074***	1226,55**	130,57***

GF % : Germination Finale, **Long** : Longueur, **Nbre** : Nombre, **TRE** : Teneur Relative en Eau,

** : hautement significatif, *** : très hautement significatif.

1. Le taux de germination final (GF %)

Le test de germination *in situ* des grains d'orge montre que la salinité affecte d'une manière très remarquable la germination finale comparativement au témoin (Photo 8).

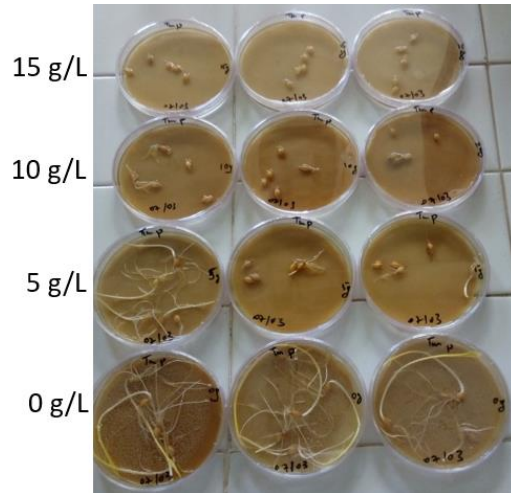


Photo 8: Germination des grains d'orge après 5 jours à différentes concentrations de NaCl.

Les résultats portés sur la figure 24 présentent la réponse génotypique de la germination au stress salin. On remarque que les taux de germination des grains soumis aux différents niveaux de stress salin sont relativement réduits en comparaison avec le témoin surtout pour la variété Tamelalt quel que soit la génération (Tm P, Tm G1 et Tm G2), par rapport au témoin, le taux de germination de Tamelalt P a été réduit d'environ 69,23 % à 15 g.L⁻¹. Il est à constater aussi qu'il y a une différence de capacité de germination entre les grains d'autofécondation et les grains androgénétiques. A l'exception du génotype Tamelalt HD 5 (A5) dont le taux de germination diminue lorsque l'intensité de NaCl est élevée soit 73,33 % à 10 g.L⁻¹ et 53,33 % à 15 g.L⁻¹ (avec une réduction de 46,67 %), le taux de germination finale des autres génotypes reste élevé, au environ de 80 % et 100 %, même si la concentration en sel augmente.

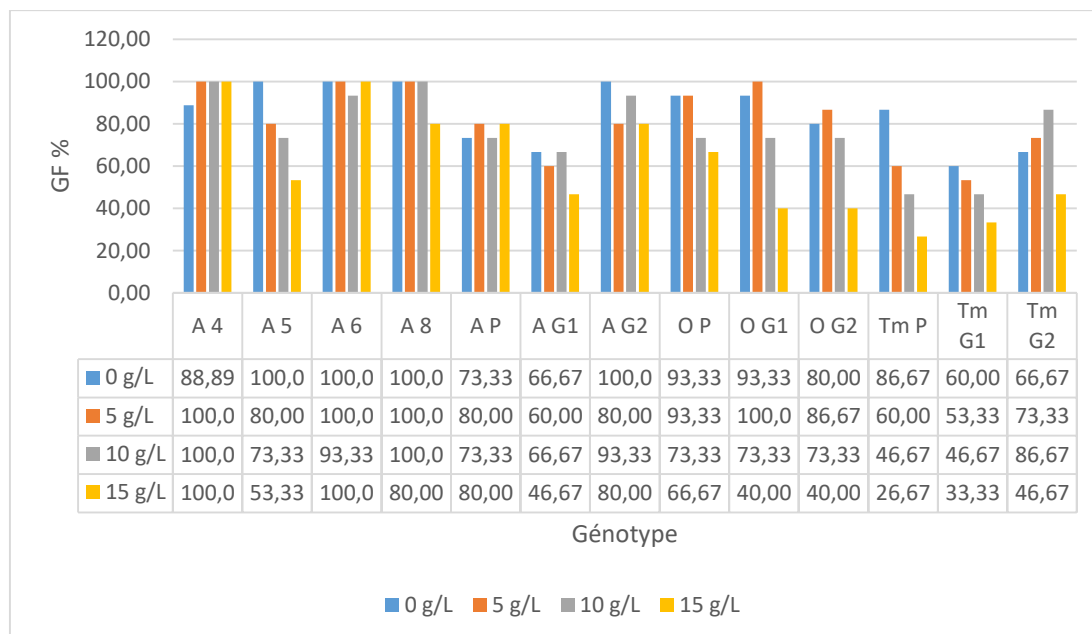


Figure 24 : Effet du stress salin sur la germination final par génotype.

A4 : Tamelalt HD 4, **A5 :** Tamelalt HD 5, **A6 :** Tamelalt HD 6, **A8 :** Asni HD 8, **AP :** Asni P, **AG1 :** Asni G1, **AG2 :** Asni G2, **OP :** Arig P, **OG1 :** Arig G1, **OG2 :** Arig G2, **TmP :** Tamelalt P, **TmG1 :** Tamelalt G1, **TmG2 :** Tamelalt G2.

L'analyse de la variance selon le test Duncan classe les génotypes en neuf groupes homogènes (tableau 10). En premier lieu se classe les génotypes androgénétiques Tamelalt HD 4 (A4) et Asni HD8 (A8) présentant les taux de germination les plus élevés de 97,22 % et 95 % respectivement suivi des génotypes Tamelalt HD6 (A6) et Asni G2 (88,33 %). Dans le troisième groupe, on trouve les variétés Arig P qui a enregistré un taux moyen de 81,67 % et Asni P et Arig G1 avec un taux de 76,67 % pour chacune. Et en dernière position se place la variété Tamelalt G1 (Tm G1) avec le taux moyen le plus faible de 48,33 %. Cette classification montre que cette dernière est sensible à la salinité au stade de germination.

Tableau 10: Classification en fonction de taux de germination des géotypes d'orge en groupes homogènes, selon le test Duncan.

Géotype	Groupes homogènes						Moyenne des taux de germination (%)
Tm G1	A						48,33
Tm P	A	B					55
A G1	A	B	C				60
Tm G2		B	C				68,33
O G2		B	C	D			70
A5			C	D	E		75
O G1				D	E		76,67
A P				D	E		76,67
O P				D	E		81,67
A G2					E	F	88,33
A6					E	F	88,33
A8						F	95
A4						F	97,22
Signification	0,13	0,059	0,059	0,11	0,11	0,056	

A4 : Tamelalt HD 4, **A5** : Tamelalt HD 5, **A6** : Tamelalt HD 6, **A8** : Asni HD 8, **A P** : Asni P, **A G1** : Asni G1, **A G2** : Asni G2, **O P** : Arig P, **O G1** : Arig G1, **O G2** : Arig G2, **Tm P** : Tamelalt P, **Tm G1** : Tamelalt G1, **Tm G2** : Tamelalt G2.

Dans un même groupe, les valeurs ne diffèrent pas de manière significative.

2. La longueur des racines

Après 10 jours de germination à différentes concentration en NaCl dans des boîtes de Pétri, la longueur des racines a été mesuré (Figure 25). Les résultats de l'analyse du système racinaire obtenus montrent que la salinité a un effet inhibiteur sur la croissance des plantes d'orge se traduisant par une diminution de la longueur des racines en fonction de l'augmentation de la salinité. L'intensité de cet effet diffère d'un géotype à l'autre selon leur sensibilité. Les grains des plantes HD semblent plus résistants au stress salin par rapport aux parents. En condition de stress modéré, la longueur des racines est légèrement affectée. L'effet sévère du stress salin est très remarqué à la concentration 15 g.L⁻¹.

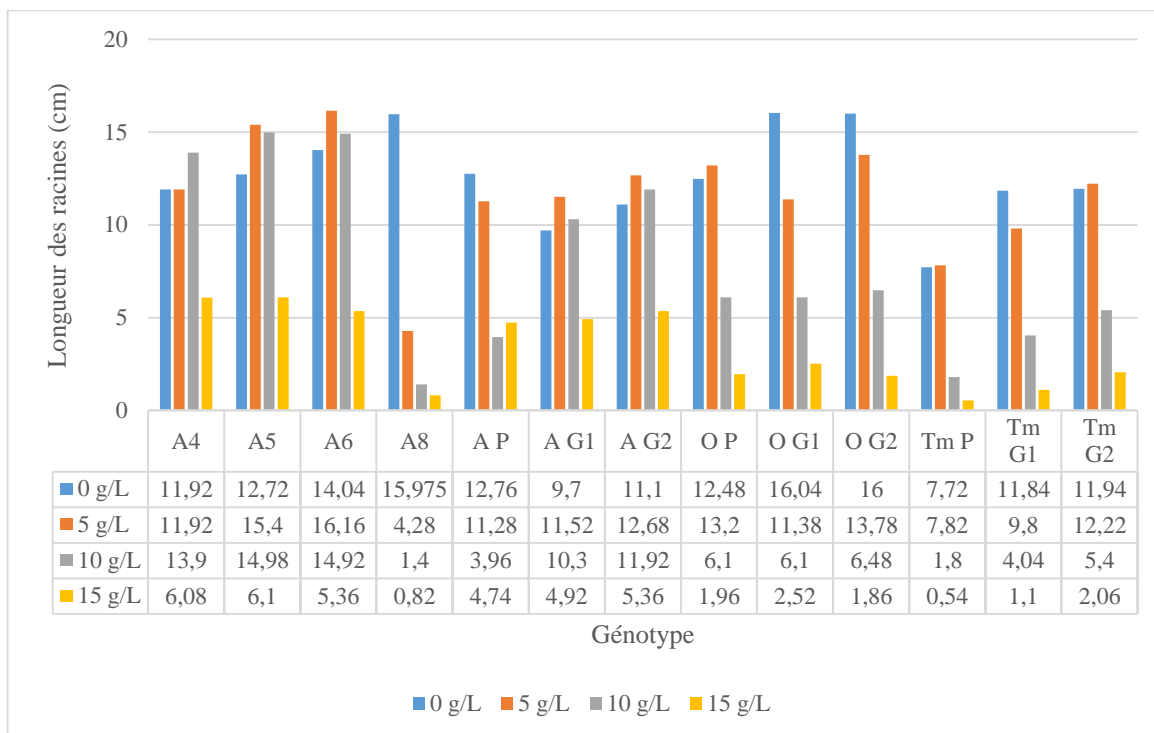


Figure 25 : Longueur des racines en fonction du stress salin.

A4 : Tamelalt HD 4, **A5** : Tamelalt HD 5, **A6** : Tamelalt HD 6, **A8** : Asni HD 8, **A P** : Asni P, **A G1**: Asni G1, **A G2** : Asni G2, **O P** : Arig P, **O G1** : Arig G1, **O G2** : Arig G2, **Tm P** : Tamelalt P, **Tm G1** : Tamelalt G1, **Tm G2** : Tamelalt G2.

Le test Duncan classe les génotypes en tenant compte de la longueur des racines en neuf groupes homogènes. Les génotypes Tamelalt HD (A6, A5 et A4) présentent la longueur moyenne des racines la plus élevée, par contre la variété Tamelalt P (Tm P) se trouve en dernière position (Tableau 11).

Tableau 11: Classification en fonction de la longueur des racines des génotypes d’orge en groupes homogènes, selon le test Duncan.

Génotype	Groupes homogènes							Moyenne de la longueur des racines (cm)
Tm P	A							4,47
A8	A	B						5,49
Tm G1	A	B	C					6,695
Tm G2		B	C	D				7,905
A P		B	C	D				8,185
O P		B	C	D				8,435
O G1			C	D	E			9,01
A G1			C	D	E			9,11
O G2			C	D	E			9,53
A G2				D	E	F	G	10,265
A4					E	F	G	10,955
A5						F	G	12,3
A6							G	12,62
Signification	0,155	0,075	0,099	0,173	0,057	0,053	0,061	

A4 : Tamelalt HD 4, **A5** : Tamelalt HD 5, **A6** : Tamelalt HD 6, **A8** : Asni HD 8, **A P** : Asni P, **A G1** : Asni G1, **A G2** : Asni G2, **O P** : Arig P, **O G1** : Arig G1, **O G2** : Arig G2, **Tm P** : Tamelalt P, **Tm G1** : Tamelalt G1, **Tm G2** : Tamelalt G2.

3. La longueur des épicotyles

Comme pour la longueur des racines, après 10 jours de germination à différentes concentration en NaCl, la longueur des épicotyles a été mesurée et les résultats sont présentés dans la Figure 26. Les résultats de l’analyse du système foliaire montrent qu’en conditions de stress modéré, la longueur des épicotyles est légèrement affectée. Plus la concentration de NaCl augmente plus la longueur de l’épicotyle diminue, cette effet dépressif du sel est très remarqué

à partir de la concentration 10 g.L⁻¹. Pour la variété Arig et le génotype A8, le sel a affecté négativement leur système foliaire et nous avons constaté qu'à la concentration 15g.L⁻¹ il n'y avait presque pas de pousse (0 cm pour Arig et 0,02 cm pour A8). Notons que par rapport aux témoins (0 g.L⁻¹) une réduction de 99,64 % pour O P, 99,88 % pour A8 et de 100 % pour O G1, O G2 et Tm P a été enregistrée.

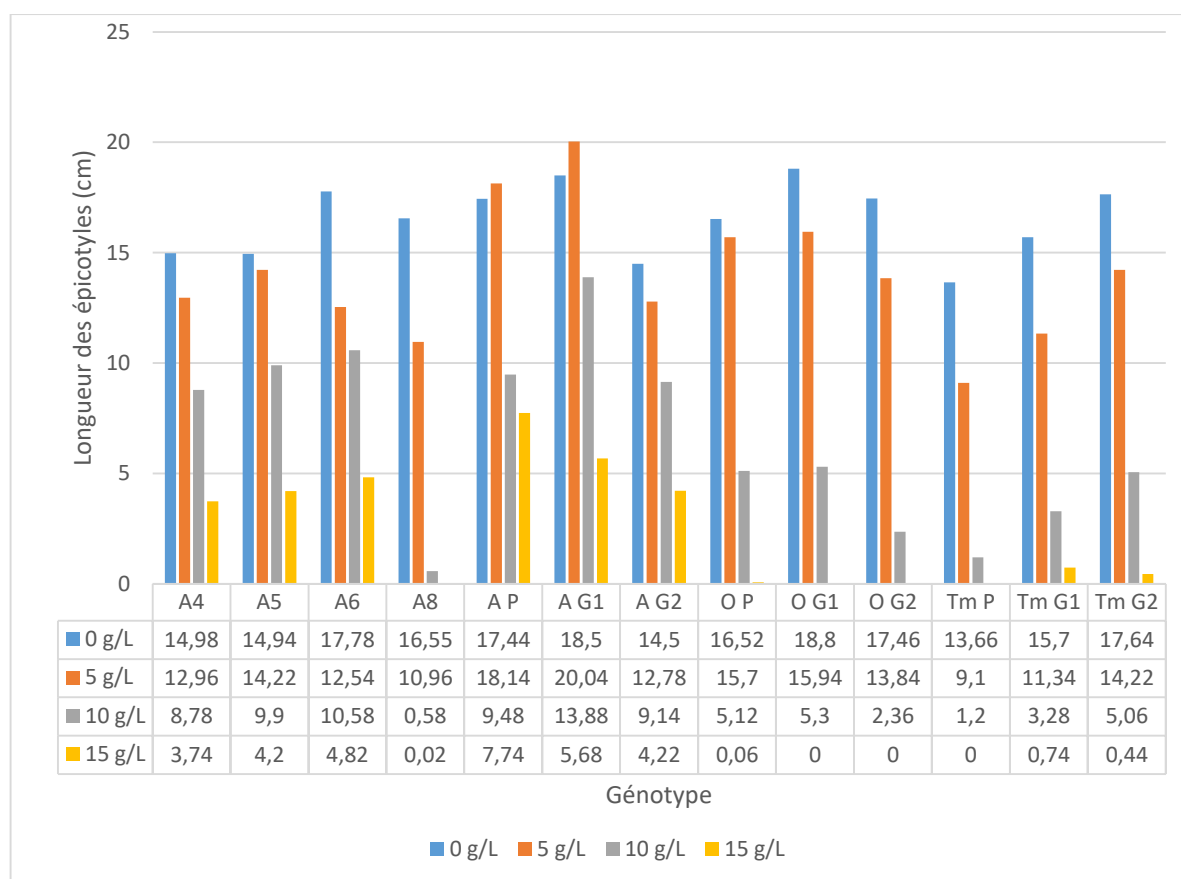


Figure 26: Longueur des épicotyles par génotype en fonction de l'augmentation de la concentration de NaCl.

A4 : Tamelalt HD 4, **A5** : Tamelalt HD 5, **A6** : Tamelalt HD 6, **A8** : Asni HD 8, **A P** : Asni P, **A G1** : Asni G1, **A G2** : Asni G2, **O P** : Arig P, **O G1** : Arig G1, **O G2** : Arig G2, **Tm P** : Tamelalt P, **Tm G1** : Tamelalt G1, **Tm G2** : Tamelalt G2.

La longueur moyenne la plus élevée est enregistrée chez la variété Asni G1 (14,53 cm), suivie par Asni P (13,2 cm) et les génotypes Tamelalt HD (A6 et A5). Dans les deux derniers groupes, on trouve les variétés Tamelalt P (Tm P), Tamelalt G1 (Tm G1) et Arig G2 (O G2) plus le génotype Asni HD (A8) avec les longueurs moyennes les plus faibles de 5,99, 7,77, 8,42 et 7,08cm respectivement (Tableau 12).

Tableau 12: Classification en fonction de la longueur des épicotyles des génotypes d'orge en groupes homogènes, selon le test Duncan.

Génotype	Groupes homogènes				Moyenne de la longueur des épicotyles (cm)
Tm P	A				5,99
A8	A	B			7,08
Tm G1	A	B			7,77
O G2	A	B			8,42
Tm G2	A	B	C		9,34
O P	A	B	C		9,35
O G1	A	B	C	D	10,01
A4	A	B	C	D	10,12
A G2	A	B	C	D	10,16
A5		B	C	D	10,82
A6		B	C	D	11,43
A P			C	D	13,2
A G1				D	14,53
Signification	0,079	0,069	0,102	0,051	

A4 : Tamelalt HD 4, **A5** : Tamelalt HD 5, **A6** : Tamelalt HD 6, **A8** : Asni HD 8, **A P** : Asni P, **A G1** : Asni G1, **A G2** : Asni G2, **O P** : Arig P, **O G1** : Arig G1, **O G2** : Arig G2, **Tm P** : Tamelalt P, **Tm G1** : Tamelalt G1, **Tm G2** : Tamelalt G2.

4. La taille de la plante

La taille de la plante pour chaque génotype et à chaque concentration de sel a été mesurée et les résultats sont montrés sur la figure 27. Ici, les deux générations G1 et G2 de la variété Arig (O G1 et O G2) ont montré les plus hautes tailles par rapport aux autres. Cependant, des valeurs de 34,84 et 33,46 cm ont été enregistrées pour le témoin sans sel (0 g.L⁻¹). En comparaison avec le témoin, la taille des plantes a été réduite en augmentant la concentration du sel. La diminution de la taille est variable selon les génotypes. Il est remarquable que cette réduction soit importante pour les variétés Arig (O P, O G1 et O G2), Tamelalt (Tm P, Tm G1 et Tm G2) et le génotype Asni HD (A8) à partir de la concentration 10 g.L⁻¹. Par contre, pour les autres génotypes l'effet du sel ne se manifeste qu'à la concentration maximale de 15 g.L⁻¹.

La réduction de la taille de la plante la plus importante était de 97,47 %, 97,39 %, respectivement pour Tm P et A8.

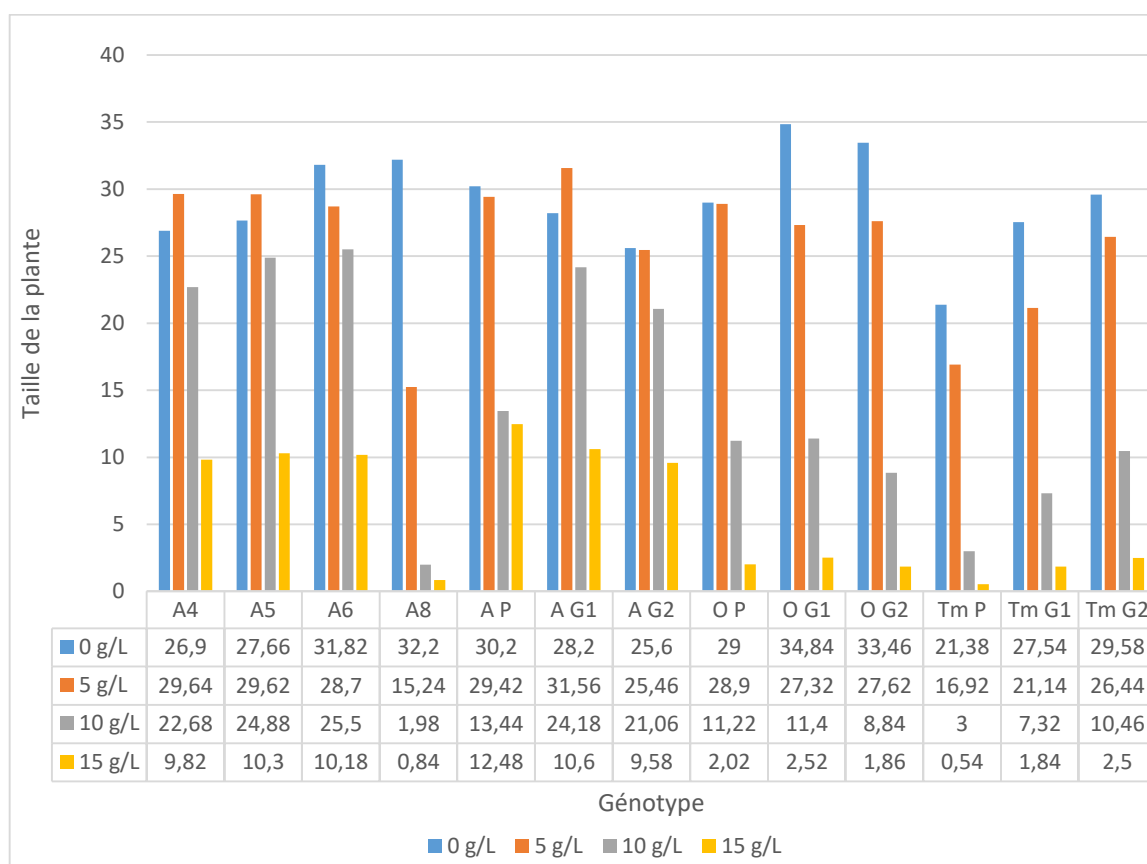


Figure 27 : La taille de la plante par génotype en fonction du stress salin.

A4 : Tamelalt HD 4, **A5 :** Tamelalt HD 5, **A6 :** Tamelalt HD 6, **A8 :** Asni HD 8, **A P :** Asni P, **A G1 :** Asni G1, **A G2 :** Asni G2, **O P :** Arig P, **O G1 :** Arig G1, **O G2 :** Arig G2, **Tm P :** Tamelalt P, **Tm G1 :** Tamelalt G1, **Tm G2 :** Tamelalt G2.

L'analyse de la variance montre que les génotypes Tamelalt HD (A4, A5 et A6) enregistrent les tailles les plus élevées (24,05, 23,11 et 22,26 cm) ainsi la variété Asni G1 a enregistré une taille moyenne de 23,63 cm. Alors que la variété Tamelalt P (Tm P) a été marquée en tant que la plus petite plante avec une taille de 10,46 cm (Tableau 13).

Tableau 13: Classification en fonction de la taille des plantules des génotypes d'orge en groupes homogènes, selon le test Duncan.

Génotype	Groupes homogènes				Moyenne de la taille des plantules (cm)
Tm P	A				10,46
A8	A	B			12,57
Tm G1	A	B	C		14,46
Tm G2	A	B	C	D	17,25
O P		B	C	D	17,79
O G2		B	C	D	17,95
O G1		B	C	D	19,02
A G2			C	D	20,43
A P			C	D	21,39
A4				D	22,26
A5				D	23,12
A G1				D	23,64
A6				D	24,05
Signification	0,062	0,091	0,073	0,088	

A4 : Tamelalt HD 4, **A5** : Tamelalt HD 5, **A6**: Tamelalt HD 6, **A8** : Asni HD 8, **A P** : Asni P, **A G1** : Asni G1, **A G2** : Asni G2, **O P** : Arig P, **O G1** : Arig G1, **O G2** : Arig G2, **Tm P** : Tamelalt P, **Tm G1** : Tamelalt G1, **Tm G2** : Tamelalt G2.

5. Le nombre de racines

L'augmentation de la concentration en NaCl affecte légèrement la rhizogenèse chez la majorité des génotypes. Les résultats montrent que la variété Asni P n'était pas affectée par le stress salin, elle a enregistré le nombre de racine le plus élevé (7,8) à la concentration 5g.L⁻¹ et même en augmentant la concentration de sel jusqu'à 15g.L⁻¹, le nombre de racine reste élevé (7,2). En revanche les individus androgénétiques se sont révélés résistants à la salinité à

l'exception du génotype Asni HD 8 (A8). En effet, le nombre de racines de ce dernier a diminué de 7,4 à 5g.L⁻¹ jusqu'à 3,2 à la concentration maximale de 15 g.L⁻¹. En ce qui concerne les autres variétés d'autofécondation Tamelalt P (Tm P) et Arig G1 (O G1), ils semblent être les plus sensibles vue leur faible rhizogenèse qui ne dépasse pas 2,6 et 3,6 respectivement dans la concentration maximale de 15 g.L⁻¹ (Figure 28).

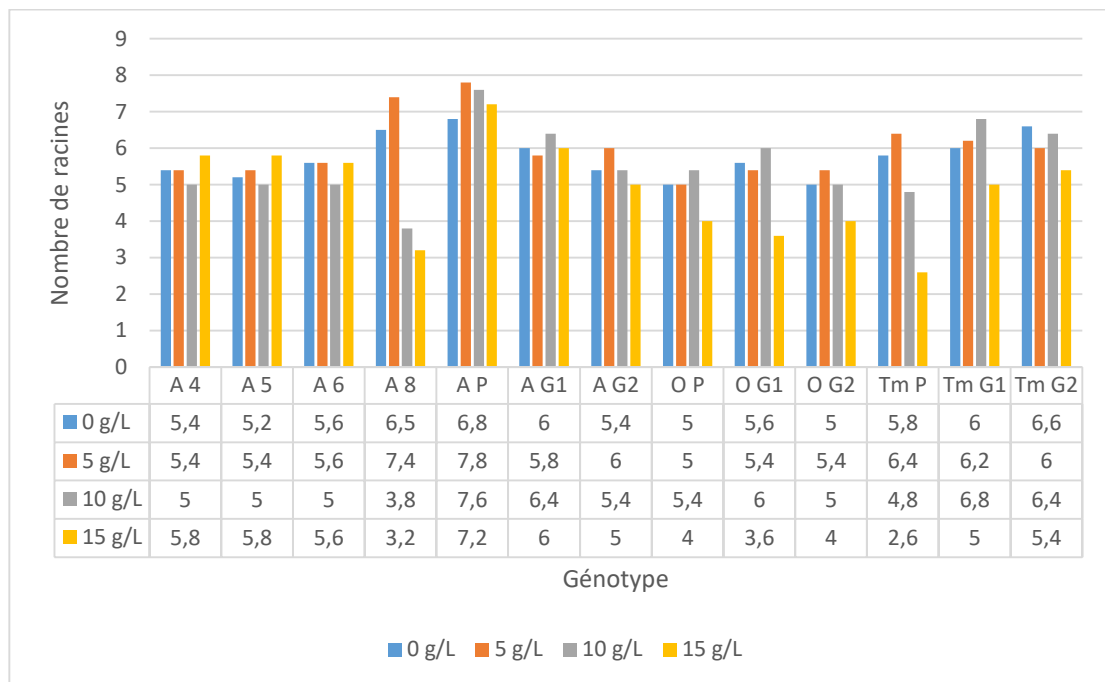


Figure 28 : Nombre de racines par génotype en fonction de la concentration en NaCl.

A4 : Tamelalt HD 4, **A5** : Tamelalt HD 5, **A6** : Tamelalt HD 6, **A8** : Asni HD 8, **AP** : Asni P, **AG1** : Asni G1, **AG2** : Asni G2, **OP** : Arig P, **OG1** : Arig G1, **OG2** : Arig G2, **Tm P** : Tamelalt P, **Tm G1** : Tamelalt G1, **Tm G2** : Tamelalt G2.

D'après les résultats du test Duncan, il existe cinq groupes homogènes, le premier regroupe les trois générations P, G1 et G2 de la variété Arig ayant le nombre de racine le plus faible (4,85 et 5,15) et la variété Tm P (4,90). Les génotypes HD (A4, A5, A6 et A8) se retrouvent dans le deuxième groupe, alors qu'Asni P connue comme modérément sensible, se classe seule dans le dernier groupe avec le nombre de racine le plus élevé (7,35).

Tableau 14: Classification en fonction de nombre de racines des variétés d'orge en groupes homogènes, selon le test Duncan.

Génotype	Groupes homogènes				Moyenne du nombre de racines
O P	A				4,85
O G2	A				4,85
Tm P	A				4,90
O G1	A				5,15
A8	A	B			5,25
A5	A	B			5,35
A4	A	B			5,40
A6	A	B			5,45
A G2	A	B			5,45
Tm G1		B	C		6,00
A G1		B	C		6,05
Tm G2			C		6,10
A P				E	7,35
Signification	0,073	0,073	0,283	1,000	

A4 : Tamelalt HD 4, **A5** : Tamelalt HD 5, **A6** : Tamelalt HD 6, **A8** : Asni HD 8, **A P** : Asni P, **A G1** : Asni G1, **A G2** : Asni G2, **O P** : Arig P, **O G1** : Arig G1, **O G2** : Arig G2, **Tm P** : Tamelalt P, **Tm G1** : Tamelalt G1, **Tm G2** : Tamelalt G2.

6. La réversibilité de l'action du sel

Le test de la réversibilité de l'action du NaCl a été étudié à la concentration 15g.L^{-1} NaCl. Nous avons montré que le sel exerce, à fortes doses (15g.L^{-1}), un effet dépressif sur la germination des grains d'orge sauf pour la descendance androgénétique dont le taux de germination atteint 100 % pour Tamelalt HD 6 (A6), 86,7 pour les deux génotypes Tamelalt HD 4 (A4) et Asni HD 8 (A8) et 73,3 pour le génotype Tamelalt HD 5 (A5). Cette inhibition peut être osmotique ou toxique, alors que les résultats de notre étude montrent que le transfert des grains dans l'eau distillée sans sel est suivi d'une reprise de la germination surtout pour la variété Asni G1 (A G1) dont le taux de germination passe de 0 % à 86,7 % suivie d'Asni P avec des taux de 6,7 % et 92,9 %. Cette reprise est très rapide chez tous ces génotypes alors qu'elle

est faible chez la variété Tamelalt G1. Cette différence de réponse montre que la réversibilité de germination sous stress salin varie selon les génotypes d'orge (Figure 29).

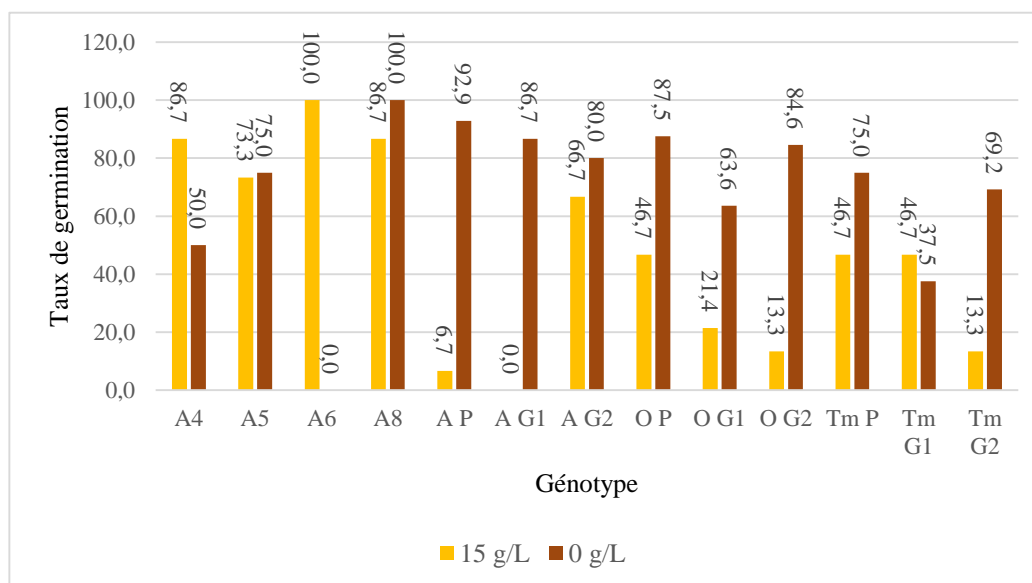


Figure 29 : Réversibilité de l'effet du NaCl à la concentration de 15 g.L⁻¹.

A4 : Tamelalt HD 4, **A5 :** Tamelalt HD 5, **A6 :** Tamelalt HD 6, **A8 :** Asni HD 8, **A P :** Asni P, **A G1 :** Asni G1, **A G2 :** Asni G2, **O P :** Arig P, **O G1 :** Arig G1, **O G2 :** Arig G2, **Tm P :** Tamelalt P, **Tm G1 :** Tamelalt G1, **Tm G2 :** Tamelalt G2.

La réversibilité de l'action du sel la plus importante est enregistrée chez le génotype haploïde doublé Asni (A 8), suivie par Asni d'autofécondation (A P et A G2) et le génotype A5. Alors que le pourcentage de réversibilité le plus faible est enregistré chez la variété Tm G1 (Tableau 15).

Tableau 15: Classification des géotypes d’orge en groupes homogènes, selon le test de Duncan pour la réversibilité de l’action de NaCl.

Géotype	Groupes homogènes			Moyenne de la réversibilité de l’action de NaCl (%)
A8	A			100
A P	A			94,38
A G2	A	B		83,33
A5	A	B		83,33
O G2	A	B	C	75,62
O G1	A	B	C	75,42
O P	A	B	C	70,83
A G1	A	B	C	67,41
A4	A	B	C	66,67
Tm G2	A	B	C	58,96
Tm P		B	C	45,83
Tm G1			C	37,50
Signification	0,084	0,135	0,097	

A4 : Tamelalt HD 4, **A5** : Tamelalt HD 5, **A6** : Tamelalt HD 6, **A8** : Asni HD 8, **A P**: Asni P, **A G1**: Asni G1, **A G2** : Asni G2, **O P** : Arig P, **O G1** : Arig G1, **O G2** : Arig G2, **Tm P** : Tamelalt P, **Tm G1** : Tamelalt G1, **Tm G2** : Tamelalt G2.

7. La teneur relative en eau (TRE)

L’effet de NaCl sur la germination chez les plantes d’orge se traduit par une diminution de la teneur relative en eau en augmentant la concentration en NaCl. La salinité à différentes concentrations a affecté négativement la teneur relative en eau. Quelle que soit la concentration de NaCl, le géotype A4 enregistre la teneur relative en eau la plus élevée. Pour les deux concentrations 0 g.L⁻¹ et 5 g.L⁻¹, la variété O P s’est montré la plus sensible à la salinité en ayant les valeurs minimales de la TRE. Les plus faibles, à 10 et 15g.L⁻¹ de NaCl, ont été obtenus pour la variété Tm P. (Figure 30).

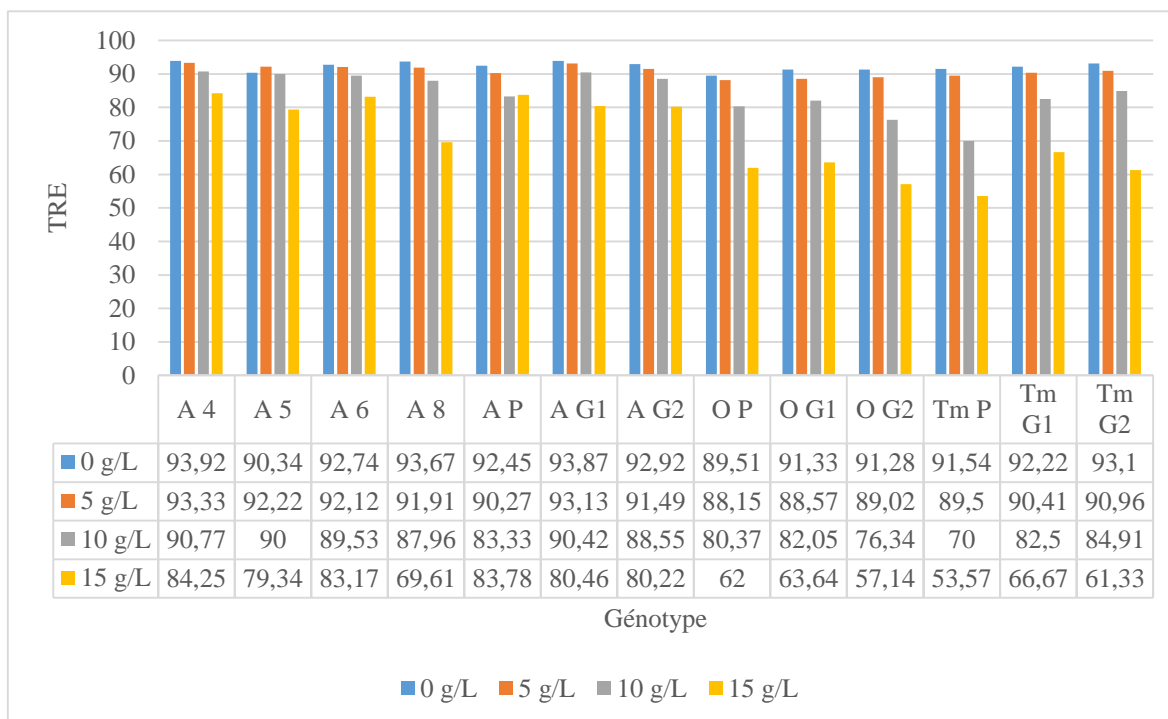


Figure 30 : L'effet du sel sur la teneur relative en eau.

A4 : Tamelalt HD 4, **A5** : Tamelalt HD 5, **A6** : Tamelalt HD 6, **A8** : Asni HD 8, **AP** : Asni P, **AG1** : Asni G1, **AG2** : Asni G2, **OP** : Arig P, **OG1** : Arig G1, **OG2** : Arig G2, **TmP** : Tamelalt P, **TmG1** : Tamelalt G1, **TmG2** : Tamelalt G2.

La teneur relative en eau moyenne la plus élevée a été enregistrée par le génotype A4 suivi de la variété AG1 et le génotype A6 et la valeur la plus faible est celle de Tm P. Selon le test de Duncan les génotypes étudiés sont classés en huit groupes homogènes (Tableau 16).

Tableau 16: Classification des géotypes d'orge en groupes homogènes, selon le test de Duncan pour la teneur relative en eau.

Géotype	Groupes homogènes					Moyenne de la teneur relative en eau (%)
Tm P	A					76,15
O G2	A					78,45
O P	A	B				80,00
O G1	A	B	C			81,39
Tm G2	A	B	C	D		82,58
Tm G1	A	B	C	D		82,95
A8		B	C	D		85,75
A P			C	D		87,38
A5			C	D		88,06
A G2			C	D		88,28
A6				D		89,40
A G1				D		89,47
A4					E	90,57
Signification	0,052	0,084	0,055	0,050	0,182	

A4 : Tamelalt HD 4, **A5** : Tamelalt HD 5, **A6**: Tamelalt HD 6, **A8**: Asni HD 8, **A P**: Asni P, **A G1**: Asni G1, **A G2** : Asni G2, **O P**: Arig P, **O G1**: Arig G1, **O G2** : Arig G2, **Tm P** : Tamelalt P, **Tm G1** : Tamelalt G1, **Tm G2** : Tamelalt G2.

8. Classification ascendante hiérarchique (CAH) des géotypes

La CAH nous a permis de produire une arborescence qui met en évidence les liens hiérarchiques entre les géotypes. Cette classification a permis de répartir les géotypes en 2 groupes dont un est subdivisé en deux sous-groupes. Sur le dendrogramme (Figure 31) le premier groupe regroupe les géotypes tolérants à la salinité (A4, A6, A G2) plus le géotype A8. Le deuxième groupe est subdivisé en deux sous-groupes, dont le premier contient les Variétés O G2 et Tm G2 qui sont plus proches et les variétés O P, O G1, A P et la descendance androgénétique, A5, de la variété Tamelalt. Le deuxième sous-groupe contient les variétés Tm P, Tm G1 et A G1.

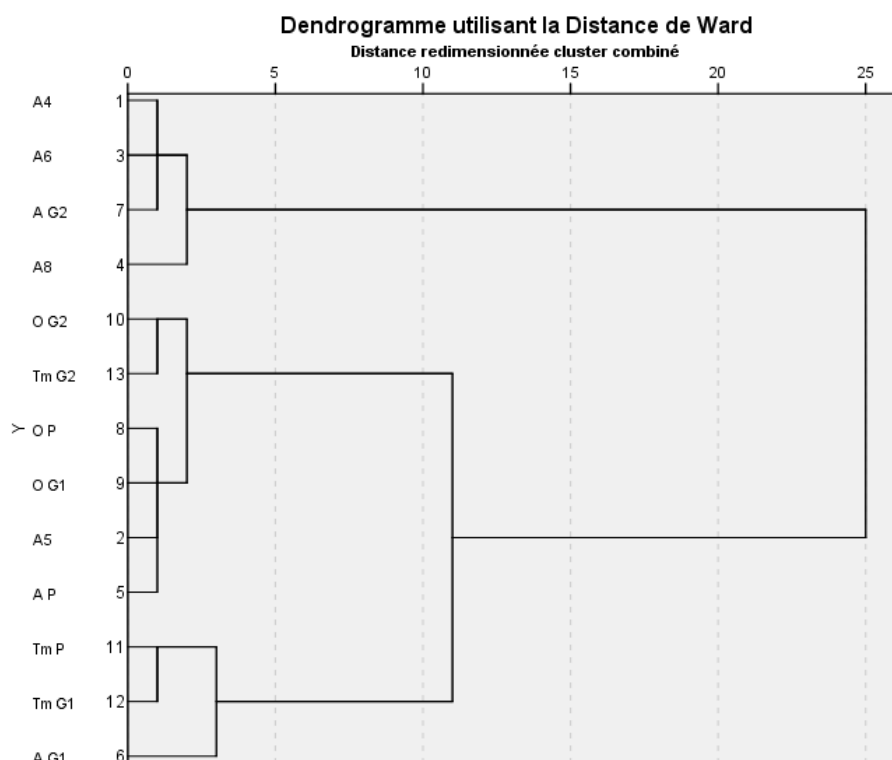


Figure 31 : Classification ascendante hiérarchique (CAH) des génotypes.

A4 : Tamelalt HD 4, **A5** : Tamelalt HD 5, **A6** : Tamelalt HD 6, **A8** : Asni HD 8, **A P** : Asni P, **A G1** : Asni G1, **A G2** : Asni G2, **O P** : Arig P, **O G1** : Arig G1, **O G2** : Arig G2, **Tm P** : Tamelalt P, **Tm G1** : Tamelalt G1, **Tm G2** : Tamelalt G2.

IV. Discussion et conclusion

Le test de germination *in situ* des grains d'orge met en évidence l'effet dépressif du stress salin sur les différents paramètres étudiés. Notre étude montre que l'augmentation de la concentration du chlorure de sodium entraîne une diminution du taux de germination final, ce qui a été rapporté par Djerah et Oudjehih (2015) et El-Goumi et al. (2014) chez l'orge, Bennaceur et al. (2001); Mrani Alaoui et al. (2013) et Hmouni et al. (2017) chez le blé tendre, Benidire et al. (2015) chez la fève, Yildirim et Güvenç (1994) chez le piment et Hajlaoui et al. (2007) chez le pois chiche. Khajeh-Hosseini et al. (2003) ont suggéré que la réduction de germination peut être due à un potentiel osmotique externe qui empêche l'absorption d'eau ou à des effets toxiques des ions Na^+ et Cl^- sur les grains en germination.

Les résultats obtenus ont permis de montrer un effet variétal vis-à-vis de la concentration du sel, cet effet a été également démontré chez le blé tendre par Hmouni et al. (2017). Lorsque le stress est modéré (5 g.L^{-1}), les génotypes androgénétiques A4, A6, A8 et la variété O G1 se révèlent résistantes et montrent un taux de germination de 100 %, tandis que le génotype A5 et

les variétés A P, A G2, O P et O G2 se montrent moyennement tolérantes au sel. Quant aux trois générations (P, G1 et G2) de la variété Tamelalt ainsi que la variété A G1, elles se sont affichées les plus sensibles avec un taux de germination ne dépassant pas 73,33 %. Les mêmes observations ont été rapportées par Bennaceur et al. (2001) en travaillant sur des variétés marocaines, algériennes et tunisiennes de blé. Les variétés marocaines Nesma et Achtar et la variété tunisienne Oum Rabia se sont montrées plus résistantes, suivies des variétés algérienne Mohamed Ben Bechir et tunisienne Khiar et en dernier la variété tunisienne Razzak. En outre Askri et al. (2007) ont signalé que le stress salin retarde la germination des variétés de pastèque.

Masmoudi et al. (2014) ont étudié l'effet de la salinité en utilisant les sels suivant : NaCl, KCl, MgSO₄ et Na₂SO₄ avec les doses 6, 12 et 18 g.L⁻¹ combinées avec des doses 0, 0,5 et 1 g.L⁻¹ d'un amendement calcique représenté par CaCl₂ et CaSO₄ sur le taux de germination, et la production de la biomasse qui comporte la partie aérienne et la partie racinaire. Les résultats de cette étude ont montré que l'augmentation de la salinité est néfaste sur tous les paramètres analysés. Ils ont aussi rapporté que l'amendement calcique a un effet remarquable sur le végétal par rapport aux traitements non amendés en allégeant l'effet inhibiteur des sels. De plus le NaCl s'est dévoilé plus nocif que les sels : KCl, MgSO₄ et Na₂SO₄.

De même, la longueur des racines et des épicotyles et la taille de la plante ont été affectées par l'augmentation de la concentration de sel. Cet effet a été montré par Kadri et al. (2009), Mrani Alaoui et al. (2013), Benidire et al. (2015) et Djerah et Oudjehih (2015). D'après Munns (2002) la réduction initiale de la croissance des pousses est probablement due aux signaux hormonaux générés par les racines. Nos résultats sont en concordance avec ceux rapportés par Benidire et al. (2015) qui ont montré aussi que la salinité exerce un effet inhibiteur sur la croissance des plantes de *V. faba* qui se traduit par diminution de la longueur de la tige en fonction de l'augmentation de la salinité dans le milieu.

La salinité n'avait pas un effet assez remarquable sur la rhizogenèse sur tous les génotypes étudiés à la concentration 5 g.L⁻¹ en comparaison avec le témoin. A partir de la concentration 10 g.L⁻¹ l'effet dépressif du sel commence à être considérable et le nombre de racine a été aussi réduit chez le génotype A8 et la variété Tm P. Dans le même contexte, Nibau et al. (2008), Adjel et al. (2013) et Djerah et Oudjehih (2015) ont pu mettre en évidence que le stress salin provoque une diminution du nombre de racines. D'ailleurs, BenNaceur et al. (2001) ont montré que les variétés tolérantes peuvent développer un système racinaire pour pouvoir résister à la salinité. Munns et al. (2006) ont montré que les racines ont une capacité remarquable à contrôler leurs concentrations en Na⁺ et de Cl⁻ ; ils semblent plutôt se stabiliser à environ 50 mM (2,9 g.L⁻¹) de NaCl.

Cependant Munns (2002) considère que les plantes tolérantes au sel diffèrent des plantes sensibles par leur faible taux de transport Na^+ et Cl^- vers les feuilles et par leur capacité à compartimenter ces ions dans les vacuoles pour empêcher leur accumulation dans le cytoplasme ou les parois cellulaires et éviter ainsi la toxicité saline.

Les expériences d'El-Tayeb (2005) ont montré que l'augmentation du taux de NaCl a réduit le pourcentage de germination, les paramètres de croissance (poids frais et sec), la teneur en potassium, calcium, phosphore et sucres insolubles dans les pousses et les racines des semis âgés de 15 jours. Cet effet peut être dû au ralentissement de l'absorption de l'eau à cause de la pression osmotique des solutions salines utilisées pour la germination.

La réversibilité de l'action du NaCl est un paramètre permettant d'étudier l'origine de l'inhibition des paramètres étudiés précédemment, osmotique ou toxique, ce paramètre a été étudié à la concentration de 15 g.L^{-1} . Nous avons montré qu'il y a une reprise de germination après transfert des grains non germés dans de l'eau distillée ce qui signifie que le NaCl exerce un effet osmotique. La réversibilité de l'effet du sel a été démontrée dans plusieurs études et chez plusieurs espèces. Elle a été aussi observée chez le pois chiche (Hajlaoui, Denden, Bouslama 2007), la fève (Benidire et al. 2015), les légumineuses (Tsoata. E 1995), les agrumes (Zekri 1993), l'orge (Bliss et al. 1986) et chez le blé (Mrani Alaoui et al. 2013). D'après nos résultats et les résultats obtenus par ces auteurs, toutes les céréales répondent de la même façon vis-à-vis du stress salin.

Quant à la teneur relative en eau, les génotypes utilisés répondent différemment vis-à-vis du stress salin. Elle a été réduite significativement à partir de la concentration 10 g.L^{-1} chez les variétés Arig et Tamelalt. Par contre la variété Asni (P, G1 et G2) et les autres génotypes androgénétiques (A4, A5 et A6) ont enregistré des pourcentages de teneur relative en eau plus élevées même à la concentration maximale de 15 g.L^{-1} . Des résultats similaires ont été rapportés par El-Goumi (2015). Munns (2002) et Munns et al. (2006) ont aussi montré que la salinité réduit la capacité des plantes à absorber de l'eau, ce qui entraîne rapidement une réduction du taux de croissance, ainsi qu'une série de changements métaboliques. Cependant El-Tayeb (2005) a signalé que l'augmentation de la concentration en NaCl diminue non seulement la teneur en eau relative des feuilles mais également les pigments photosynthétiques (Chl a, b et caroténoïdes).

La réponse au stress salin varie en fonction du génotype, de la concentration en NaCl et du paramètre étudié. Le stress salin a marqué une diminution de tous les paramètres étudiés à partir de la concentration de 10 g.L^{-1} et cette diminution varie selon les génotypes. Les

résultats montrent que les génotypes androgénétiques A4, A5 et A6 sont plus tolérants à la salinité en comparaison avec leur parent d'origine (Tamelalt) et dont le sel a affecté leur réponse de façon remarquable. Le NaCl a révélé un effet osmotique en raison de la réversibilité de son action dans tous les génotypes.

Les résultats rapportés dans cette étude suggèrent que l'orge est plus ou moins tolérante à la salinité au stade de germination. Cette étude devrait être complétée par des expériences de terrain similaires pour confirmer la tolérance des génotypes d'orge étudiées.

Chapitre IV : Analyse de la diversité génétique des plantes haploïdes doublées et leurs parents d'autofécondation

I. Introduction

L'orge est une céréale qui se caractérise par sa tolérance à la sécheresse et à la salinité et se cultive ainsi dans de nombreux pays caractérisés par un déficit hydrique extrême pendant la saison sèche (Rao et al. 2004). L'identification des gènes responsables de la tolérance à la sécheresse chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.) facilitera la compréhension des mécanismes moléculaires de la tolérance à la sécheresse et permettra en outre l'amélioration génétique de l'orge par la sélection assistée par marqueurs moléculaires ou la transformation génétique (Guo et al. 2009).

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire. La qualité et la pureté des acides nucléiques comptent parmi les facteurs les plus critiques pour l'analyse PCR.

Afin d'obtenir des acides nucléiques hautement purifiés exempts de toute contamination visible, des méthodes d'extraction adéquates devraient être appliquées.

La technique CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) a été élaborée pour la première fois par Murray et Thompson (1980), le protocole du test au CTAB a été publié ultérieurement, et plus précisément par Wagner et al. (1987).

La technique CTAB convient pour l'extraction et la purification d'ADN végétal. Le principe de cette technique consiste à lyser les cellules végétales par le détergent ionique CTAB, qui forme un complexe insoluble avec les acides nucléiques dans une concentration saline (NaCl) spécifique. Comme la composition des lipides et celle du détergent sont semblables, le composant CTAB du tampon d'extraction a pour fonction de piéger les lipides qui constituent la cellule et la membrane nucléaire autorisant ainsi la libération de l'ADN génomique. L'EDTA est un composant de chélation de magnésium (Mg) qui est un cofacteur pour la DNase. En liant le Mg à l'EDTA, l'activité de la DNase présente est diminuée. La combinaison Tris/HCl donne à la solution une capacité d'atténuation du pH (un pH faible ou un pH élevé endommage l'ADN). Les polysaccharides, les protéines, les composés phénoliques et les autres contaminants restent dans le surnageant. Pour leur élimination, du phénol et du chloroforme sont ajoutés à la solution du surnageant sous forme de mélange phénol, chloroforme, alcool iso-amylque (25, 24, 1) (v, v) et chloroforme, alcool iso-amylque (24,1). L'ADN reste en solution

dans la phase aqueuse qui est récupérée par centrifugation et précipitée par l'éthanol pur ou l'isopropanol. L'ADN sous forme de pelote et lavé ensuite par l'éthanol 70 % après centrifugation, séché est redissous dans le tampon TE et gardé à 4 °C.

Les gènes du groupe LEA (Late Embryogenesis Abundant) ont un potentiel considérable d'utilisation en tant qu'outils moléculaires pour l'amélioration des cultures génétiques en vue d'une éventuelle tolérance au stress.

Le but de la présente étude est de montrer la présence et la transmission de gène *HVA1*, appartenant au groupe LEA, dans les plantes d'orge HD obtenues par pression sélective *in vitro* et leurs parents d'autofécondation : Arig, Asni et Tamelalt. Ce gène corrélé à la tolérance à la salinité est mis en évidence à l'aide des marqueurs moléculaires. L'analyse de la transmission du gène *HVA1* a été faite dans un premier temps par la technique PCR puis par l'étude de sa séquence en utilisant la technique de séquençage pour montrer si la pression sélective *in vitro* est source de variabilité et de malléabilité du génome.

II. Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Le matériel végétal que nous avons utilisé consistait en trois générations, Parent (P), première génération (G1) et deuxième génération (G2) de trois variétés d'orge de printemps, comprenant deux variétés à deux rangs, Asni et Tamelalt, et une variété à six rangs, Arig. Aussi, la descendance Haploïde Doublé (HD) issus de la culture *in vitro* d'anthère obtenue dans notre laboratoire par Dr El Goumi Younes en 2015 a été étudiée. Il s'agit de HD Tamelalt obtenu par pression sélective à 5 g.L⁻¹ NaCl et HD Asni sans stress.

2. Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique, support de l'information génétique a été extrait suivant la technique de CTAB à partir de 100 mg de feuilles fraîches d'orge selon la méthode CTAB. Le matériel végétal a été broyé dans 1 ml du tampon d'extraction (2 % (p/v) CTAB, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) et 20 mM EDTA). Le mélange additionné de 10 µl de la protéinase K par échantillon est transvasé dans des tubes eppendorfs de 1.5 ml. L'ensemble a été placé au bain marie à 62 °C en agitant chaque 10 min pendant 30 min. Pour compléter la lyse, 10 µl de RNase sont ajoutés et les tubes sont placés à 37 °C pendant 30 min.

Environ 1 ml de surnageant récupéré après une centrifugation à 11000 rpm pendant 10 min, mélangé avec 500 µl du mélange phénol, chloroforme, alcool-iso-amylique (25, 24, 1) et agité

par inversement durant 30 s. Le surnageant récupéré après une centrifugation à 13000 rpm pendant 10 min a été mélangé avec 500 µl de chloroforme, alcool-iso-amylique (24, 1) afin d'éliminer les restes de phénol, protéines et lipides.

La phase aqueuse contenant les acides nucléiques est récupérée après une nouvelle centrifugation à 13000 rpm pendant 10 min. Elle est mélangé avec un volume double de l'isopropanol glacial, et placé à -20 °C pendant 30 min afin de précipiter l'ADN. L'ADN est récupéré, sous forme de culot au fond des tubes après centrifugation à 15000 rpm durant 10 min. Le culot est lavé avec 600 µl d'éthanol à 70 % et 2 µl d'acétate d'ammonium (3 M) et séché à l'étuve réglée à 25 °C toute la nuit, puis redissous dans 100 µL du tampon TE (pH 7,4) et conservé à 4 °C.

3. Contrôle de la qualité et la quantité d'ADN extrait

La qualité et la pureté des acides nucléiques comptent parmi les facteurs les plus critiques pour l'analyse PCR. Après extraction, une évaluation qualitative et quantitative d'ADN a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoDrop One, Thermo SCIENTIFIC). Cet appareil permet de mesurer l'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm, maximum d'absorption de la molécule d'ADN dans un volume de 1 µL d'échantillon seulement. Le rapport des absorbances à 260 nm et 280 nm permet d'évaluer la présence des traces de protéines ou d'ARN. Si ce rapport est compris entre 1,8 et 2, L'ADN est considéré de bonne qualité. Un rapport inférieur à 1,80 indique une contamination protéique et s'il est supérieur à 2 alors il reste encore des ARN. La concentration d'ADN est calculée automatiquement en µg/µl (Annexe 3).

Par ailleurs, l'intégrité de l'ADN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 %. C'est une technique très utilisée pour la séparation des molécules. Les molécules d'ADN sont chargées négativement à pH neutre. Sous un champ, électrique, elles migrent vers l'anode. Leur vitesse de migration dépend de la taille des fragments à séparer et de la concentration du gel. La visualisation de l'ADN nécessite l'addition du tampon de charge qui permet également d'augmenter la densité de la solution d'ADN, l'entraînant vers le fond des puits pour éviter la contamination des autres. Le BET (10 mg/ml) incorporé lors de la préparation du gel s'intercale entre les paires de bases induisant la révélation des bandes d'ADN fluorescentes sous UV.

Ainsi, le gel est préparé avec une solution de tampon TBE 1X, additionnée de 2 µl de BET (10 mg/ml). 7 µl d'ADN à charger sur gel d'agarose a tout d'abord été mélangé au tampon de charge Orange G 1X (13 mM Tris-HCl (pH 8.0 à 25 °C), 40 mM EDTA, 0.32 % (v/v) SDS, 250 µM Ficoll 400, 0.4 µM Orange G (Keebler, Facik 2008). Par la suite, la migration est

effectuée dans le même tampon sous un voltage constant de 110 V et une amplitude de 80 mA durant 30 min.

Une seule bande de migration lente est visualisée sous UV contrairement à l'ADN dégradé qui apparaît sous forme d'une traînée.

4. Amplification d'ADN par PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une amplification enzymatique de l'ADN génomique à partir d'un couple d'amorces spécifiques encadrant la séquence cible à amplifier. La PCR a été initialement mise au point par Saiki et al. (1985). L'ADN est synthétisé à partir de deux amorces (sens et anti-sens) qui s'hybrident à l'acide nucléique cible en présence de désoxyribonucleotides triphosphates (dNTP) et de la polymérase de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* (Taq polymérase).

La PCR repose sur un processus cyclique de 3 étapes :

Dénaturation thermique de l'ADN : cette étape consiste à dénaturer à température élevée (90 °C à 96 °C) l'ADN bicaténaire en deux brins monocaténares qui serviront de matrice.

Hybridation des amorces : les amorces, en large excès, s'hybrident aux extrémités de la séquence cible à une température qui dépend de la longueur des amorces et de leur composition en oligonucléotides (45 °C à 65 °C).

Élongation (ou extension) des amorces : l'ADN polymérase (Taq polymérase) synthétise le brin complémentaire de l'ADN matrice à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel, la synthèse se fait dans le sens 5'→3'. Cette étape se déroule généralement à la température optimale à l'action de la polymérase soit 72 °C.

Dans notre protocole d'étude, le but d'utilisation de PCR est d'amplifier à l'aide des SSR HVB23D, HVGLUEND, MGB318, HVA1, LEA et Bmag210 des régions chromosomique différentes du génome d'orge (Chaabane et al. 2009; Shehadi et al. 2014) et d'étudier la présence et la transmission du gène (*HVA1*) chez les variétés parentales analysées et leur descendance haploïdes doublés (Tableau 24, annexe4).

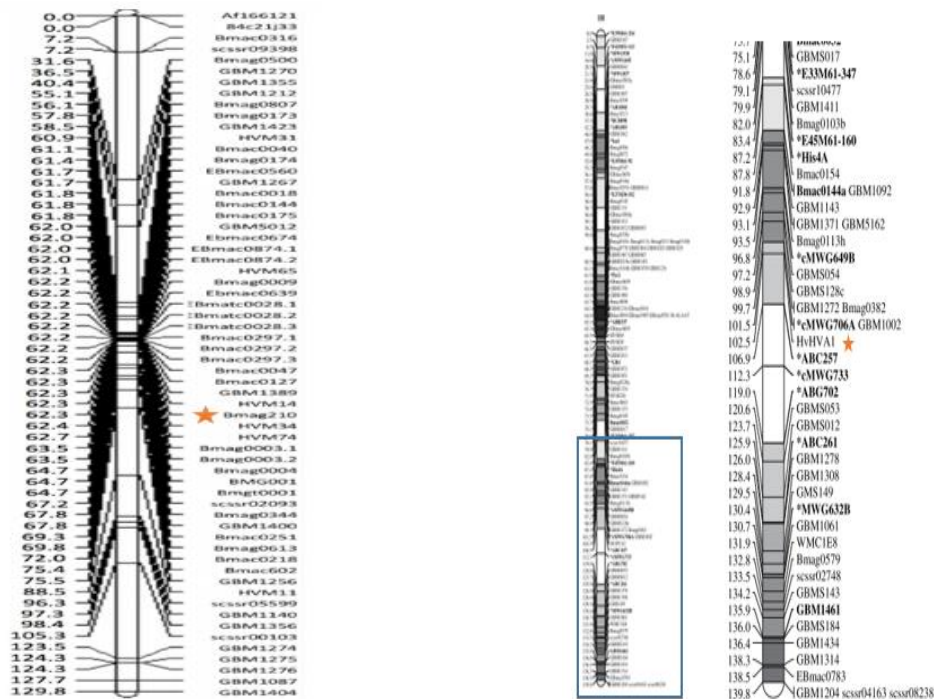


Figure 32 : Localisation de l'amorce Bmag210 sur le chromosome 6H (Rustgi et al. 2014) et de l'amorce HVA1 sur le chromosome 1H (R. K. Varshney et al. 2007).

L'amplification PCR a été réalisée dans un volume total de 25 μ L selon le protocole décrit dans le Tableau 17 pour les marqueurs de type SSR et dans le tableau 18 pour les RAPD. Pour les RAPD 1 et 2 la concentration d'ADN est de 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ et 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$ respectivement. Une normalisation de la concentration d'ADN extrait à 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ est nécessaire pour réaliser la PCR.

Tableau 17 : Composition du milieu réactionnel pour l'amplification par les SSR (volume final/ 25 μl).

	Concentration initiale	Concentration Finale	Volume/réaction (μL)
H2O			13,5
Tampon de Taq (Kit bioline)	10 X	1 X	5
Amorce sens	20 μM	0,4 μM	0,5
Amorce anti-sens	20 μM	0,4 μM	0,5
Taq polymérase (Kit Bioline)	5 U/ μL	0,1 U	0,5
DNA	10 $\text{ng}/\mu\text{L}$	2 $\text{ng}/\mu\text{L}$	5

Tableau 18 : Composition du milieu réactionnel pour l'amplification par les RAPD 3, 4, 5 et 6 (volume final/ 25 µl).

	Concentration initiale	Concentration finale	Volume/réaction (µL)
H2O			qsp 25µL
Tampon de Taq (Kit « bioline)	10 X	1 X	5
Amorce	20 µM	0,4 µM	0,5
Taq polymérase (Kit Bioline)	5 U/µL	0,1 U	0,5
DNA	10 ng/µL	0,6 ng/µL	1,5

L'amplification s'est déroulée dans un thermocycleur automatique (TECHNE Endurance TC-312) selon le programme décrit dans le tableau 19. Une étape de dénaturation initiale de 94 °C de 3 min pour les SSR et de 5 min pour les RAPD et une étape d'élongation finale de 72 °C pendant 10 min sont nécessaires pour toutes les amorces utilisées.

Tableau 19: Cycles réactionnels des amorces et programme PCR.

Amorce	Nombre de cycles	Dénaturation	Hybridation (Ta)	Elongation
HVB23D	40	94 °C, 1 min	55 °C, 1 min	72 °C, 2 min
HVGLUEND	40	94 °C, 30 s	59 °C, 45 s	72 °C, 1 min
Bmag210				
MGB318				
HVA1, LEA	35	94 °C, 30 s	57 °C, 30 s	72 °C, 1 min
RAPD (1, 2, 3, 4, 5 et 6)	40	94 °C, 1 min	38 °C, 1 min	72 °C, 2 min

5. Analyse des produits PCR

Après une amplification de l'ADN extrait, les produits PCR sont analysés sur un gel d'agarose à 1,2 % avec 2 µl de BET. La migration est effectuée dans le tampon TBE 1X dans

une cuve horizontale à électrophorèse sous un voltage constant de 110 V pendant 1h 20min. 7 µL du produit PCR est mélangé avec 3 µL du tampon de charge orange G 1X. Pour indiquer la taille des amplicons au niveau du gel, le marqueur de taille Hyper Ladder™ 1 Kb (BIOLINE) a été utilisé. Les résultats d'amplification ont été visualisés par Bio-Rad Gel doc. Les images du gel ont été soumises à une analyse densitométrique à l'aide du logiciel Image Lab 6.0.

6. Analyse par dendrogramme

Les fragments amplifiés ont été classés comme présents (représentés par 1) ou absents (représentés par 0). Une matrice de similarité par paire (distance euclidienne) (Tableau 25 Annexe 6) entre les quatre génotypes d'orge issus de l'androgenèse et les trois variétés d'autofécondation selon la méthode de Ward (1963) a été calculé par le logiciel SPSS. Un dendrogramme a ensuite été construit sur la base des données de la matrice de similitude à l'aide de l'analyse de cluster hiérarchique par le logiciel SPSS.

7. Indice de polymorphisme (PIC) ou indice de diversité de Nei (H)

La matrice de données a été utilisée pour calculer la diversité de chaque marqueur SSR et RAPD. Cela équivaut à l'indice de polymorphisme (PIC) ou indice de diversité de Nei de chaque amorce, comme décrit dans l'équation de Varshney et al. (2007a) qui mesure le polymorphisme pour un gène en fonction des fréquences de chaque allèle dans une population. Il est calculé pour chaque marqueur à l'aide de la formule suivante :

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

Où p_i est la fréquence de l'allèle i au locus considéré, le PIC est équivalent à l'hétérozygotie théorique ou l'hypothèse de Hardy-weinberg (Kremer.A 1994)

8. Nombre efficace d'allèle

Le nombre efficace d'allèle correspond au nombre d'allèle en tenant compte de leurs différences en fréquence (Kremer.A 1994). Il est calculé par les deux formules suivantes :

$$Ae = 1 / \sum_{i=1}^n P_i^2 \text{ (De Daniel Prat, Patricia Faivre Rampant 2006) } = 1 / (1 - H) \text{ (Kremer.A 1994)}$$

9. Séquençage

Les produits PCR, amplifiés par l'amorce *HVA1*, des variétés Asni, Tamelalt et Arig et des génotypes HD, Tamelalt HD4 (A4) et Asni HD8 (A8) ont été soumis à un séquençage, après purification pour éliminer l'excès d'amorces, dNTP et Taq polymérase. Le séquençage a été effectué dans le laboratoire de biologie de la division Unités d'Appui Technique à la Recherche Scientifique (UATRS) du Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST) de Rabat afin d'étudier d'éventuelles variabilités des séquences d'ADN de différents échantillons. Les alignements et la correction de séquences ont été réalisés à l'aide du logiciel DNA Baser Assembler v5.

III. Résultats

1. PCR

La caractérisation et l'évaluation des génotypes d'orge seraient importantes pour détecter la diversité génétique et la différenciation entre les génotypes étudiés. Dans une phase préliminaire de cette recherche, une PCR a été réalisée en utilisant l'ADN extrait à partir des génotypes d'orge. Après séparation des produits PCR sur gel d'agarose, la taille des fragments amplifiés par 6 paires d'amorces SSR (*HVA1*, *LEA*, *HVB23D*, *HVGLUEND*, *Bmag210* et *MGB318*) et 6 amorces RAPD (*RAPD1*, *RAPD2*, *RAPD3*, *RAPD4*, *RAPD5*, et *RAPD6*) a été évaluée dans l'objectif d'explorer le niveau de polymorphisme des 13 accessions d'orge étudiées (quatre issus de l'androgenèse et trois variétés d'autofécondation avec les trois générations de chacune). Le contrôle des ampliâts obtenus par PCR est réalisé pour s'assurer de l'amplification de l'ADN, de la qualité des bandes et d'absence ou de présence d'une contamination par un ADN étranger. Les produits PCR sont contrôlés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 1,2 % (Photo 9).

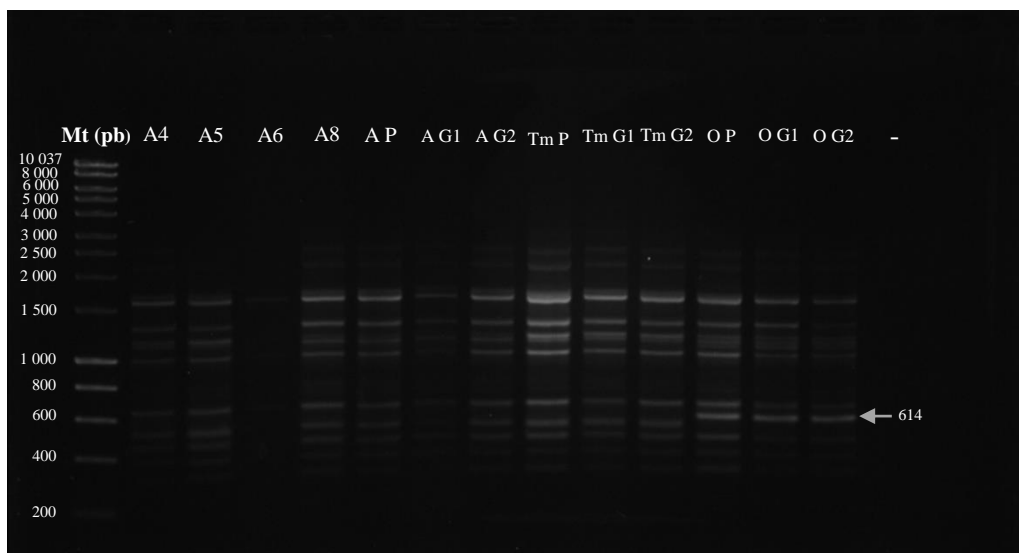


Photo 9: Analyse des produits PCR sur gel d'agarose à 1,2 % (amplification par l'amorce RAPD3).

A4 : Tamelalt HD 4, **A5** : Tamelalt HD 5, **A6**: Tamelalt HD 6, **A8**: Asni HD 8, **AP**: Asni P, **AG1**: Asni G1, **AG2**, Asni G2, **OP**: Arig P, **OG1**: Arig G1, **OG2**, Arig G2, **TmP** : Tamelalt P, **TmG1** : Tamelalt G1, **TmG2** : Tamelalt G2, - : contrôle négatif.

Ces amorces SSR et RAPD ont révélé un total de 103 allèles allant de 1 à 21 allèles par locus (tableau 20) avec une moyenne de 2 à 3 allèles par locus pour les SSR. Pour tous les génotypes, l'indice de polymorphisme et le nombre efficace d'allèle les plus élevés ont été enregistrés par HVGLUEND et MGB318. Les résultats de l'amplification par PCR en utilisant les deux amorces HVA1 et LEA montrent que toutes les variétés et toutes les plantes HD possèdent le gène de la résistance à la salinité.

Treize marqueurs SSR ont été produits à la suite de la prise d'empreintes génétiques des treize génotypes analysés. Le nombre de marqueurs produit par chaque amorce variait d'une bande pour HVA1 (860 pb), LEA (944 pb) et HVB23D (148 pb), deux pour Bmag 210 (119 et 70 pb), trois pour MGB318 (860, 500 et 170 pb) et cinq pour HVGLUEND (1177, 951, 659, 400 et 320 pb). Les marqueurs 499 pb de l'amorce MGB318 et 659 pb de l'amorce HVGLUEND font la différence entre les variétés à six rangs et à deux rangs car ils ont été trouvés uniquement chez la variété Arig P et sa descendance d'autofécondation G1 et G2.

Tableau 20 : Nombre et poids moléculaire de marqueurs SSR et RAPD résultant après amplification par les amorces.

L'amorce	Nombre d'allèles amplifiés	Poids moléculaire des amplifiât (pb)	PIC	Ae
HVGLUEND	5	1177, 951, 659, 400, 320	0,66	2,93
Bmag210	2	119, 70	0,00	1,00
HVB23D	1	148	0,00	1,00
MGB318	3	860, 499, 170	0,62	2,61
HVA1	1	860	0,00	1,00
LEA	1	944	0,00	1,00
RAPD1	14	260 - 1078	0,40	1,67
RAPD2	21	311 - 3236	0,35	1,54
RAPD3	19	535 - 1261	0,45	1,82
RAPD4	6	202 - 1609	0,41	1,69
RAPD5	17	285 – 1071	0,56	2,27
RAPD6	13	385 - 1800	0,88	8,29
Moyenne			0,36	2,24

PIC : indice de polymorphisme, **Ae** : nombre efficace d'allèles

L'analyse du polymorphisme chez les génotypes étudiés par les 6 amorces oligonucléotidiques de type RAPD a montré que le nombre de bandes produites par amorce variait de 21 pour RAPD2, 19 pour RAPD3, 17 pour RAPD5, 14 pour RAPD1, 13 pour RAPD6 et 6 pour RAPD4. Les amorces RAPD2, RAPD3 et RAPD6 ont enregistré l'existence de six marqueurs uniques. Pour la RAPD2, les marqueurs enregistrés sont de 1800 et 1058 pb pour Asni HD8 (A8) et de 1604 pb pour le génotype Tamelalt HD5 (A5). Pour la RAPD3, les marqueurs uniques enregistrés sont respectivement pour Tamelalt G1 et Tamelalt G2 de 908 pb et 2370 pb et de 584 pb chez le génotype Tamelalt HD4 (A4) pour l'amorce RAPD6. Comme pour les SSR, des marqueurs RAPD ont révélé la différence entre les variétés à six rangs et à deux rangs. Nous avons noté l'existence des allèles 614 pb de RAPD3, 975 pb de RAPD4 et 385 pb de RAPD2 seulement chez la variété Arig P et sa descendance d'autofécondation G1 et G2.

2. Les relations phylogénétiques entre les génotypes d'orge étudiés basées sur l'analyse des données SSR et RAPD

Toutes les données SSR et RAPD ont été analysées en utilisant le logiciel SPSS pour aborder la relation génétique entre les génotypes étudiés comme le montre la figure 33. Dans cette étude, les génotypes d'orge ont été divisés en deux groupes. Le premier groupe est composé des variétés d'orge à six rang, il contient les trois générations (P, G1 et G2) de la variété Arig (sensibles à la salinité). Le deuxième groupe rassemble les variétés à deux rangs, il est divisé en deux sous-groupes : le premier sous-groupe contient les deux régénérants HD de la variété Tamelalt (A4 et A5) et le deuxième sous-groupe est encore subdivisé en deux sous-groupes. Le premier regroupe les variétés tolérantes à la salinité et composées des trois générations (P, G1 et G2) de la variété Tamelalt et le deuxième est composé des variétés modérément sensible à la salinité à l'exception du génotype A6 qui est une plante androgénétique de la variété Tamelalt (résistante à la salinité). Ce dernier groupe est composé des trois générations d'autofécondation de la variété Asni (A P, A G1 et A G2) et du génotype A8 régénérant androgénétique de la variété Asni. Ces résultats montrent la stabilité génétique après deux générations d'autofécondation et chez la descendance HD.

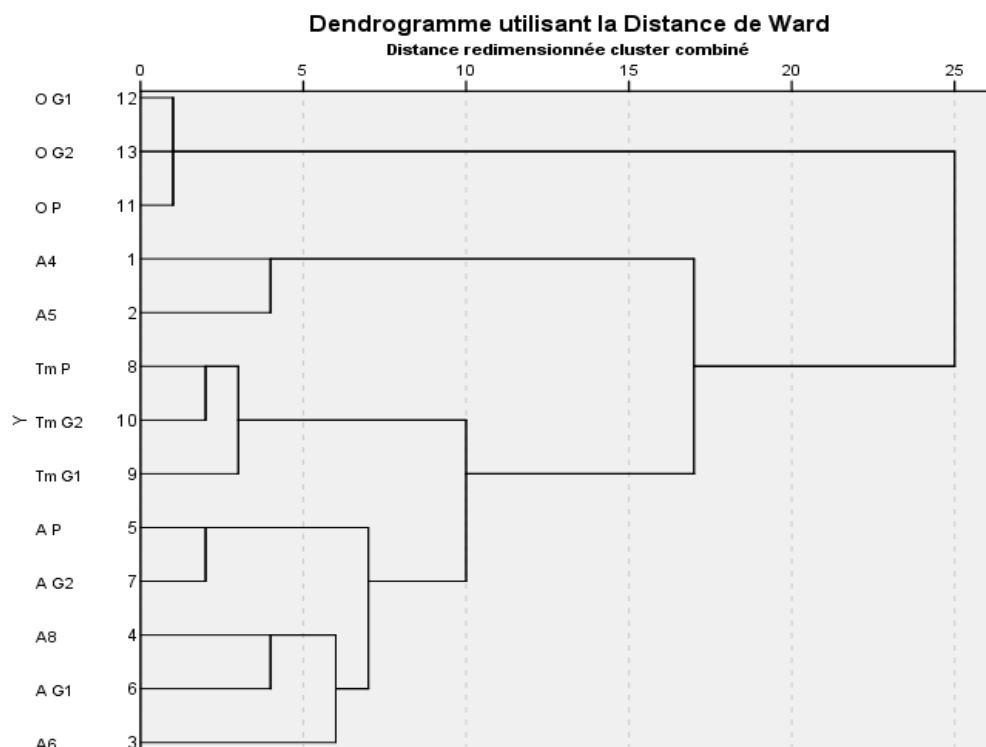


Figure 33 : Analyse de la distance génétique basée sur les données SSR et RAPD en utilisant le logiciel SPSS et en se basant sur les résultats du tableau 25 annexe 6.

A4: Tamelalt HD 4, **A5:** Tamelalt HD 5, **A6:** Tamelalt HD 6, **A8:** Asni HD 8, **A P:** Asni P, **A G1:** Asni G1, **A G2:** Asni G2, **O P:** Arig P, **O G1:** Arig G1, **O G2:** Arig G2, **Tm P:** Tamelalt P, **Tm G1:** Tamelalt G1, **Tm G2:** Tamelalt G2.

3. Séquençage

Le séquençage des produits PCR des trois variétés parentales d'autofécondation Arig, Asni et Tamelalt et des deux plantes HD, Asni HD (A8) et Tamelalt HD (A4) réalisé à l'UATRS du CNRST (figure 34) suivi des alignements et la correction des séquences (Figure 35) nous a permis d'étudier la variabilité des séquences d'ADN de différents échantillons.

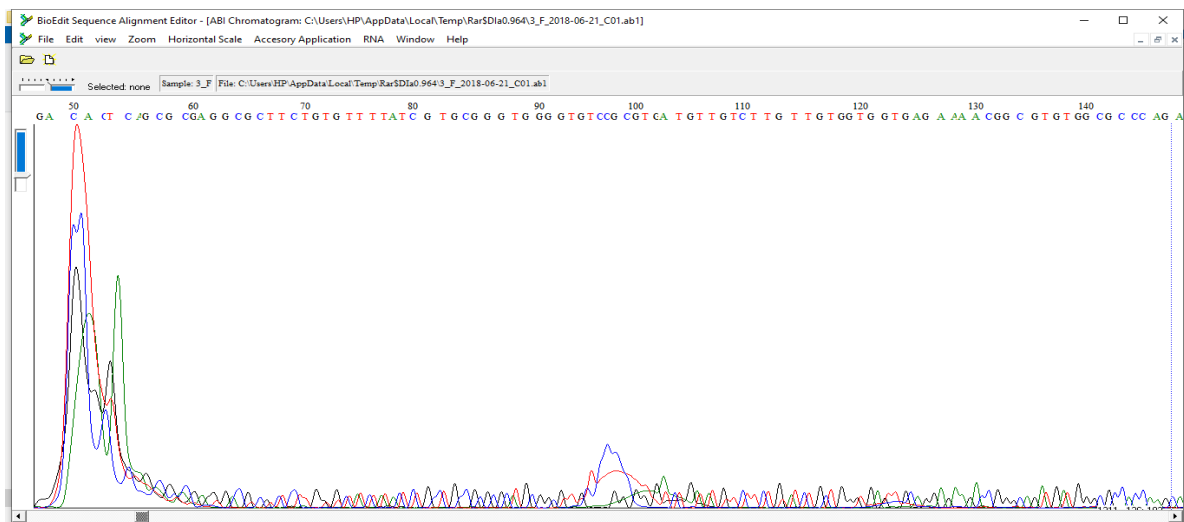


Figure 34 : Chromatogramme de séquence d'un produit PCR amplifié par l'amorce HVA1 illustrée par le logiciel BioEdit.



Figure 35 : Alignement des séquences du gène *HVA1* par le logiciel DNA Baser Assembler v5.

Le séquençage de l'acide nucléique des produits PCR a confirmé l'amplification spécifique de la région attendue sur les matrices. La séquence obtenue a été comparée avec la séquence de référence du gène *HVA1* recherchée sur NCBI BLAST Network Service (NCBI, National

Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) publiée dans GenBank (nombre d'accèsion X78205) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X78205.1>).

Lors de la visualisation de chromatogramme de la séquence de produit PCR, aucune ambiguïté n'est apparue sur la séquence d'ADN. En effet, avant de passer à l'alignement, on doit s'assurer que tous les sites ambigus sont correctement appelés, et pour cela il faut corriger manuellement toutes les ambiguïtés « N » figurants dans la séquence si elles existent.

L'outil d'alignement utilisé (DNA Baser Assembler v5), qui est un logiciel permettant de mettre en évidence les mutations en comparant les séquences générées à des séquences de référence a montré donc une homologie complète avec la séquence de référence de NCBI avec des modifications mineures. Les résultats montrent que la séquence du génotype Asni HD8 (A8) a une similarité absolue (100 %) avec la séquence de référence (Annexe 7). Soulignons que le programme mis en œuvre dans la machine de séquençage ne permet pas toujours de déterminer le nucléotide approprié et donc une lettre autre que A, T, C et G est enregistré, le plus souvent N (site ambigu).

Pour les autres séquences, les résultats ont montré des similitudes de 99 % par rapport à la séquence de référence. Pour la séquence du génotype Tamelalt HD4, une mutation du nucléotide C en A à la position 36, une délétion de C à la position 70 et une insertion de A à la position 14 et 31 et de C à la position 22 ont été détectées. Quant à la variété Tamelalt parentale, la séquence nucléotidique montre une mutation de la séquence GGC en AAA à la position 254 avec l'insertion de quatre nucléotide A plus un C et un G. La variété Arig parentale a aussi présenté une mutation de trois nucléotides (T en A à la position 15 et 45 et de T en C à la position 141) plus l'insertion de six nucléotides. Au niveau de la séquence de la variété Asni parentale, l'alignement a détecté l'insertion des deux nucléotides G et C à la position 30 et 148 (Annexe 7). Ces résultats montrent que la séquence du gène *HVA1* de la variété Asni a été le plus conservé par rapport aux autres avec seulement deux nucléotides de plus.

La différence de taille entre les séquences obtenues est due aux erreurs de séquençage qui ont été supprimées pendant l'alignement et la correction. Les séquences obtenues ont été soumises dans la base de données NCBI.

Tableau 21 : Résultats de l'alignement des séquences d'ADN par rapport à la séquence de référence (GenBank: X78205.1).

Echantillon	% de similitude avec la séquence X78205	Taille de la séquence	Nombre de mutation	Nombre de délétion	Nombre de d'insertion
Tamelalt HD4	99	554	1	1	3
Asni HD8	100	668	0	0	0
Tamelalt	99	682	1	0	6
Asni	99	677	0	0	2
Arig	99	710	3	0	6

IV. Discussion et conclusion

Dans la présente étude, les amorces SSR et RAPD ont été utilisées pour étudier la diversité génétique des génotypes d'orge afin de comparer les marqueurs moléculaires conférant la tolérance à la salinité. L'analyse des données SSR et RAPD en utilisant le logiciel SPSS a divisé les génotypes étudiés en deux groupes. La variété à six rangs sensible à la salinité Arig P (O P) et sa descendance d'autofécondation Arig G1 (O G1) et Arig G2 (O G2) ont été regroupés seules dans un groupe éloigné de tous les autres génotypes. Les autres génotypes tolérants à la salinité (Tamelalt : Tm P, Tm G1 et Tm G2, A4, A5, et A6) et modérément sensible à la salinité (Asni : A P, A G1, A G2 et A8) ont été regroupés dans l'autre groupe. Une classification a également été identifiée en classant Arig et Asni dans le groupe des variétés sensibles et modérément sensibles et Tamelalt et sa descendance HD dans un deuxième groupe des plantes tolérantes à la salinité (El-Goumi 2015).

Trois amorces SSR ont généré une seule bande chez tous les génotypes (HVB23D :148 pb, HVA1 : 860 pb, LEA : 944 pb). Nos résultats concordent avec les travaux d'El-Goumi (2015) qui a aussi montré l'existence de l'amplicon 860 de l'amorce HVA1 chez tous les génotypes d'orge. Pour les autres SSR la diversité génétique a été révélée juste par les deux autres amorces HVGLUEND et MGB318 avec des PIC respectivement de 0,66 et 0,62. Ces deux amorces se sont montrées plus reproductibles par rapport aux autres. Certains auteurs ont aussi rapporté que ces deux amorces sont reproductibles et permettent de différencier les génotypes d'orge les uns aux autres (Chaabane et al. 2009; Haddad A. El Rabey 2012; Shehadi et al. 2014; El-Goumi 2015).

Les marqueurs RAPD étaient plus informatifs que les SSR, ils ont permis la discrimination entre la variété Tamelalt et les autres. Les amorces RAPD3 et RAPD6 ont généré des bandes spécifiques chez les génotypes A4, Tm G1 et Tm G2, les bandes enregistrées sont respectivement pour A4, Tm G1 et Tm G2 de 584 pb, par RAPD6, 908 pb et 2370 pb par RAPD3. Les marqueurs RAPD ont montré le plus haut niveau de polymorphisme avec une valeur moyenne du PIC de 0,51 par rapport aux marqueurs SSR ayant une moyenne de 0,21, ceci est en accord avec les travaux de Carvalho et al. (2004).

Les marqueurs 499 pb de l'amorce MGB318 localisée sur le chromosome 5H, 659 pb de HVGLUEND localisée sur le chromosome 4H, 385 pb de RAPD2, 614 pb de RAPD3 et 975 pb de RAPD4 ont marqué la différence entre les variétés à six rangs et à deux rangs par l'existence de ces allèles seulement chez les trois générations d'autofécondation (P, G1 et G2) de la variété Arig sensible à la salinité. En outre, Forster et al. (1990) ont montré que les gènes ayant des effets positifs pour la tolérance au sel ont été localisés sur les chromosomes 4H et 5H de l'orge *Hordeum vulgare*.

Certains auteurs ont suggéré que la variabilité observée dans la séquence et l'expression du gène *HVA1* pourrait être liée aux divers génotypes tolérants à la sécheresse (Qian et al. 2007).

La quantité de diversité génétique observée dans les études moléculaires dépend du nombre et des types d'amorces utilisées et de la quantité de diversité parmi les accessions utilisées dans l'enquête (Mliki et al. 2001).

Ce travail nous a permis de sélectionner les amorces SSR les plus reproductibles et qui permettent de distinguer les génotypes étudiés. En plus, les RAPD ont présentés plus de marqueurs alléliques (90) permettant ainsi de mieux analyser le polymorphisme. Ce dernier nous a rendu possible la distinction entre les génotypes à deux rangs et ceux à six rangs et de différencier les plantes tolérantes des sensibles à la salinité.

Le gène de tolérance à la salinité *HVA1* (LEA) et les marqueurs trouvés dans cette étude devraient fournir des informations utiles pour comprendre comment les différents génotypes d'orge réagissent à la pression sélective *in vitro*.

Les résultats du séquençage du gène *HVA1*, bien que préliminaire, ont dévoilé quelques mutations au niveau des séquences d'ADN alignées et prouvent que la culture *in vitro* pourrait être un facteur de malléabilité de génome nucléaire.

Conclusion générale et perspectives

Lorsque cette recherche a été entreprise au laboratoire dès 2009, la régénération de plantes par la technique d'androgénèse sous pression sélective chez l'orge était bien établie. Nous avons ainsi été amenés à poursuivre ces études et à vérifier, par analyse moléculaire d'ADN, d'éventuelles perturbations qui pourraient être dues à la culture *in vitro*.

L'application de stress salin pendant la phase de régénération *in vitro*, a été envisagée, dans un premier temps, pour obtenir des individus régénérés présentant la résistance choisie chez les trois variétés, Asni, Tamelalt, et Arig. Ensuite, nous avons évalué la tolérance à la salinité par germination *in situ* des grains androgénétiques HD obtenus en condition de stress ou sans condition stressante et de leurs parents d'autofécondation sur lesquels, nous avons aussi effectué l'analyse de la diversité génétique.

Régénérer des individus HD résistants à la salinité pour améliorer le rendement des plantes cultivées en climat sec et intégrer cette méthode de production de vitroplants à valeur ajoutée ciblée, dans les schémas de création variétale, tels sont les objectifs que nous nous sommes fixés. Examinons donc, dans quelles mesures, l'ensemble des recherches menées ont atteint ce but.

1- Nous avons poursuivi en androgénèse les travaux antérieurs sur le même matériel végétal et tenté d'étudier l'effet du prétraitement au froid sur l'induction de cals et l'effet du stress salin sur la régénération de plante. Nous avons montré que le prétraitement au froid a un effet positif sur la production de cals et/ou embryons issus de la variété Arig G1 et G2 et sur la régénération de plantes obtenues à partir de Tm G2, A P, O P et O G2. Quant à la création d'un matériel résistant à la salinité, il ressort que l'adjonction progressive dans le milieu de culture de concentrations croissantes en NaCl allant de 0 g.L⁻¹ (Témoin) à 13 g.L⁻¹ au fur et à mesure de repiquage successifs, ait provoqué une intensification de stress. La variété Asni, déterminée comme modérément sensible, a pu être maintenue, à mesure des repiquages, jusqu'à la dose de 12 g.L⁻¹. Ces cals, issus de générations G1 et G2, ont donné en condition de stress deux types de plantes : chlorophylliennes et albinos. Deux plantes vertes à la dose de 5 g.L⁻¹ et une albinos à 12 g.L⁻¹.

2- Pour tenter de comprendre si les potentialités de tolérance au cours du processus de germination diffèrent entre les plantes HD et parentales, un test de germination *in situ* a été

effectué. Il ressort de cette étude que le stress salin varie en fonction de la variété, de la concentration en NaCl et du paramètre étudié. Tous les paramètres de germination examinés chez les variétés d'orge et leur descendance haploïde doublée ont baissé à partir de la concentration de 10 g.L⁻¹. Le NaCl a révélé un effet plus osmotique que toxique vue la réversibilité de son action chez la totalité des génotypes.

Par ailleurs, les androgénétiques A4, A5 et A6 semblent plus tolérants à la salinité par rapport à leur parent d'origine (Tamelalt) ce qui rend possible leur insertion dans des schémas de création variétale.

3- Dans le dernier chapitre, l'étude moléculaire réalisée à l'aide des marqueurs SSR et RAPD, a montré que les RAPD sont susceptibles de détecter la diversité génétique liée au polymorphisme permettant d'avoir des marqueurs uniques qui ont fait la différence entre les génotypes. Les SSR, par contre, nous ont permis de différencier entre les variétés à deux rangs et celles à six rangs. Le dendrogramme construit a séparé les génotypes selon leur tolérance à la salinité, en deux groupes. Les plantes HD et la descendance d'autofécondation de leurs parents appartiennent au même groupe, ce qui révèle la transmission héréditaire au moyen de ces marqueurs. Le séquençage du produit PCR du gène *HVA1*, nous a permis de comparer les séquences des variétés d'origine et de leur descendance HD issue de la culture *in vitro* d'anthères. A l'exception du génotype Asni HD8 (A8) qui a présenté une similarité de 100 % avec la séquence de référence de la base de données NCBI, les autres ont montré quelques modifications par mutations, insertions, ou délétions.

A ce propos, nous pensons que plusieurs études pourraient se révéler intéressantes particulièrement :

- Evaluation de la réponse androgénétique des HD par rapport à leur parent d'origine ;
- Introduction *in vitro* des doses sublétales croissantes de sel à mesure des repiquages successifs de cals provenant des plantes HD ;
- Tests de tolérance chez les descendances HD et analyse des facteurs biologiques associés aux potentialités de résistance ;
- Caractérisation agronomiques des plantes HD et leurs parents d'autofécondation ;
- L'utilisation d'autres techniques de biologie moléculaire pour améliorer la connaissance des mécanismes pouvant être impliqués dans la vitrovariation chez la descendance HD en comparaison avec les parents (étude de l'expression du gène *HVA1* par RT-PCR).

Références bibliographiques

- Abdi, Najoua, Salma Wasti, Amor Slama, Moncef Ben Salem, Mouldi E Faleh, and Elhem Mallek-Maalej. 2016. "Comparative Study of Salinity Effect on Some Tunisian Barley Cultivars at Germination and Early Seedling Growth Stages." *Journal of Plant Physiology & Pathology* 4 (3). <https://doi.org/10.4172/2329-955X.1000151>.
- Adjel, F., H. Bouzerzour, and A. Benmahammed. 2013. "Salt Stress Effects on Seed Germination and Seedling Growth of Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Genotypes." *Journal of Agriculture and Sustainability* 3 (2): 223–37.
- AgriMaroc. 2016a. "Céréales Au Maroc: Hausse de 35% de La Production Moyenne." 2016. <http://www.agrimaroc.ma/cereales-au-maroc-hausse-de-35-de-la-production-moyenne/>.
- . 2016b. "Le Secteur Agricole Au Maroc." AgriMaroc.Ma. 2016. <http://www.agrimaroc.ma/secteur-agricole-au-maroc/>.
- Ahmim, Mamar, and Joachim Vieth. 1986. "Production de Plantes Haploïdes de *Gerbera Jamesonii* Par Culture *in Vitro* d'ovules." *Canadian Journal of Botany* 64 (10): 2355–57. <https://doi.org/10.1139/b86-309>.
- Ajmone Marsan, P., P. Castiglioni, F. Fusari, M. Kuiper, and M. Motto. 1998. "Genetic Diversity and Its Relationship to Hybrid Performance in Maize as Revealed by RFLP and AFLP Markers." *Theoretical and Applied Genetics* 96 (2): 219–27. <https://doi.org/10.1007/s001220050730>.
- "Archive Larousse : Larousse Agricole - Orge." 2002. LAROUSSE. 2002. <https://www.larousse.fr/archives/agricole/page/402>.
- Asakaviciute, R, C Jacquard, and C Clement. 2006. "Study of Chlorophyll a and b in Etiolated and Androgenic Plants of Barley (*Hordeum Vulgare* L.)." *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* 2 (1): 10–15.
- Askri, Hend, Saloua Rejeb, Hager Jebari, Hassen Nahdi, and Mohamed Nejib Rejeb. 2007. "Effet Du Chlorure de Sodium Sur La Germination Des Graines de Trois Variétés de Pastèque (*Citrullus Lanatus* L.)." *Secheresse* 18 (1): 51–55. <https://doi.org/10.1684/sec.2007.0068>.

- Augé, R, G Beauchesne, J Boccon, L Gibod, B Decourtye, R Digat, R Jalouzof, et al. 1992. *La Culture in Vitro et Ses Applications Horticoles*. Technique. Paris.
- Babu, R. Chandra, Jingxian Zhang, A. Blum, T. H. David Ho, R. Wu, and H. T. Nguyen. 2004. "HVA1, a LEA Gene from Barley Confers Dehydration Tolerance in Transgenic Rice (*Oryza Sativa* L.) via Cell Membrane Protection." *Plant Science* 166 (4): 855–62. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.023>.
- Baker, Neil R. 1991. "A Possible Role for Photosystem II in Environmental Perturbations of Photosynthesis." *Physiologia Plantarum* 81 (4): 563–70. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb05101.x>.
- Barbara, Boucho. 2006. "Identification et Caractérisation de La Famille de Facteurs de Transcription AP2/IEREBP Chez Le Blé." Université de Québec, Montréal.
- Barrett, B. A., and K. K. Kidwell. 1998. "AFLP-Based Genetic Diversity Assessment among Wheat Cultivars from the Pacific Northwest." *Crop Science* 38 (5): 1261–71. <https://doi.org/10.2135/cropsci1998.0011183X003800050025x>.
- Barrett, B. A., K. K. Kidwell, and P. N. Fox. 1998. "Comparison of AFLP and Pedigree-Based Genetic Diversity Assessment Methods Using Wheat Cultivars from the Pacific Northwest." *Crop Science* 38 (5): 1271–78. <https://doi.org/10.2135/cropsci1998.0011183X003800050026x>.
- Bartels, Dorothea, and Ramanjulu Sunkar. 2005. "Drought and Salt Tolerance in Plants." *Critical Reviews in Plant Sciences* 24 (1): 23–58. <https://doi.org/10.1080/07352680590910410>.
- Benderradji L. 2013. "Sélection in Vitro Pour La Tolérance Aux Stress Salin et Thermique Chez Le Blé Tendre (*Triticum Aestivum* L.)." Université Constantine -1- Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
- Benidire, L, K Daoui, Z A Fatemi, W Achouak, L Bouarab, and K Oufdou. 2015. "Effet Du Stress Salin Sur La Germination et Le Développement Des Plantules de *Vicia Faba* L. (Effect of Salt Stress on Germination and Seedling of *Vicia Faba* L.)." *Journal of Materials and Environmental Science* 6 (3): 840–51.
- Bennaceur, M., C. Rahmoune, H. Sdiri, M. Meddahi, and M. Selmi. 2001. "Effet Du Stress Salin Sur La Germination , La Croissance et La Production En Grains de Quelques

- Variétés Maghrébines de Blé.” *Science et Changements Planétaires / Sécheresse* 12 (3): 167–74.
- Bennett, Michael D., and W. Glyn Hughes. 1972. “Additional Mitosis in Wheat Pollen Induced by Ethrel.” *Nature* 240 (5383): 566–68. <https://doi.org/10.1038/240566a0>.
- Benzaghoul S., Lepoivre P. 2001. “Amélioration Des Pourcentages d’induction de Cals Pendant Le Processus d’androgenèse in Vitro Chez Le Blé Dur (Triticum Durum Desf.)” In *Journées Scientifiques Du Réseau AUF : Biotechnologies Végétales : Amélioration Des Plantes et Sécurité Alimentaire, 7.*, , 543–44. Montpellier (FRA): IRD éd. <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010028518>.
- Berthomieu, P, G Conéjéro, A Nublat, W J Brackenbury, C Lambert, C Savio, N Uozumi, et al. 2003. “Functional Analysis of AtHKT1 in Arabidopsis Shows That Na(+) Recirculation by the Phloem Is Crucial for Salt Tolerance.” *The EMBO Journal* 22 (9): 2004–14. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg207>.
- Bertrand, C. Y., J. Collard and David, and Mackill. 2008. “Marker-Assisted Selection : An Approach for Precision Plant Breeding in the Twenty-First Century.” *Phil. Trans. R. Soc. B* 363 (2008): 557–72. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2170>.
- Binzel, Marla L., and Moshe Reuveni. 2010. “Cellular Mechanisms of Salt Tolerance in Plant Cells.” In *Horticultural Reviews*, 16:33–69. Jules Janick. <https://doi.org/10.1002/9780470650561.ch2>.
- Blakeslee, A F, J Belling, M E Farnham, and A D Bergner. 1922. “A HAPLOID MUTANT IN THE JIMSON WEED, "DATURA STRAMONIUM",” *Science (New York, N.Y.)* 55 (1433): 646–47. <https://doi.org/10.1126/science.55.1433.646>.
- Blanc, S. 1990. “Androgenèse Chez l’orge (Hordeum Vulgare) et Vitrovariation.” INPL Nancy.
- Bliss, R. D., K. A. Platt-Aloia, and W. W. Thomson. 1986. “Osmotic Sensitivity in Relation to Salt Sensitivity in Germinating Barley Seeds.” *Plant, Cell and Environment* 9 (9): 721–25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1986.tb02104.x>.
- Bonjean, Alain. 1995. “L’orge Revisitée.” *Biofutur* 1995 (147): 28–32. [https://doi.org/10.1016/0294-3506\(95\)80137-5](https://doi.org/10.1016/0294-3506(95)80137-5).
- Botstein, D, R L White, M Skolnick, and R W Davis. 1980. “Construction of a Genetic

- Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms.” *American Journal of Human Genetics* 32 (3): 314–31.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6247908>.
- Bouharmont, J., A. Dekeyser, V. Van Sint Jan, and Y. S. Dogbe. 2008. “Application of Somaclonal Variation and in Vitro Selection to Rice Improvement.” In , 271–77.
https://doi.org/10.1142/9789812814272_0028.
- Caredda, S., and C. Clément. 1999. “Androgenesis and Albinism in Poaceae: Influence of Genotype and Carbohydrates.” In *Anther and Pollen*, 211–28. Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59985-9_20.
- Caredda, S., C. Doncoeur, P. Devaux, R. S. Sangwan, and C. Clément. 2000. “Plastid Differentiation during Androgenesis in Albino and Non-Albino Producing Cultivars of Barley (*Hordeum Vulgare* L.).” *Sexual Plant Reproduction* 13 (2): 95–104.
- Caredda, S, P Devaux, R S Sangwan, and C Clément. 1999. “Differential Development of Plastids during Microspore Embryogenesis in Barley.” *Protoplasma* 208 (1–4): 248–56.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01279096>.
- Caredda, S, Pierre Devaux, Rajbir S. Sangwan, Isabelle Proult, and Christophe Clément. 2004. “Plastid Ultrastructure and DNA Related to Albinism in Androgenetic Embryos of Various Barley (*Hordeum Vulgare*) Cultivars.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76 (1): 35–43. <https://doi.org/10.1023/A:1025812621775>.
- Carvalho, Luisa, Lufis Goulão, Cristina Oliveira, José Gonçalves, and Sara Amancio. 2004. “RAPD Assessment for Identification of Clonal Identity and Genetic Stability of in Vitro Propagated Chestnut Hybrids.” *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 77 (1): 23–27.
<https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000016482.54896.54>.
- Castillo, A. M., M. P. Vallés, and L. Cistué. 2000. “Comparison of Anther and Isolated Microspore Cultures in Barley. Effects of Culture Density and Regeneration Medium.” *Euphytica* 113 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1023/A:1003937530907>.
- Chaabane, Ramzi, Mouldi el Felah, Hammadi BenSalah, M’Barek BenNaceur, Chedly Abdelly, Ahmad Nada, Dalila Ramla, and Mahmoud Saker. 2009. “Molecular Characterization of Tunisian Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Genotypes Using Microsatellites (SSRs) Markers.” *European Journal of Scientific Research* 36 (1): 6–15.

- Chadli, R, and M Belkhodja. 2007. "Réponses Minérales Chez La Fève (*Vicia Faba L.*) Au Stress Salin." *European Journal of Scientific Research* 18 (4): 645–54.
<https://doi.org/10.3329/jsr.v1i1.1059>.
- Chahredine, Sadek, and Nadia Ykhlef. 2017. "Etude Des Effets Des Régulateurs De Croissance Sur Les Stades De Prolifération Et De Développement De La Pomme De Terre (*Solanum Tuberosum. L*) In Vitro." *European Scientific Journal* 13 (24): 145–55.
<https://doi.org/10.19044/esj.2017.v13n24p145>.
- Checker, Vibha G., Anju K. Chhibbar, and Paramjit Khurana. 2012. "Stress-Inducible Expression of Barley Hva1 Gene in Transgenic Mulberry Displays Enhanced Tolerance against Drought, Salinity and Cold Stress." *Transgenic Research* 21 (5): 939–57.
<https://doi.org/10.1007/s11248-011-9577-8>.
- Cheikh m'hamed, H, R Abdellaoui, K Kadri, M Bennaceur, and S Bel hadj. 2008. "Evaluation De La Tolérance Au Stress Salin De Quelques Accessions D'orge (*Hordium Vulgare L.*) Cultivées En Tunisie: Approche Physiologique." *Sciences & Technologie C*, 30–37. <http://archives.umc.edu.dz/handle/123456789/133973>.
- Chen, Xi Wen, Luís Cistué, María Muñoz-Amatriaín, Miguel Sanz, Ignacio Romagosa, Ana María Castillo, and María Pilar Vallés. 2007. "Genetic Markers for Doubled Haploid Response in Barley." *Euphytica* 158 (3): 287–94. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9310-5>.
- Chlyah H., Cherkaoui S., Saidi N., Lamsaouri O., Mdarhi-Alaoui M., Chlyah O., Benkirane H., Amail O., and Chlyah A.B. 2001. "Production d'haploïdes Chez Le Blé Dur et Sélection En Milieu Salin." In , edited by 2000/07/03-05 Journées Scientifiques du Réseau AUF : Biotechnologies Végétales : Amélioration des Plantes et Sécurité Alimentaire, 7., Montpellier (FRA), 235–54. IRD éd.
- Chlyah, H, and N Saidi. 1991. "Analyse Des Capacités Androgénétiques de Génotypes Marocains de *Triticum Durum*." In *L'amélioration Des Plantes Pour l'adaptation Aux Milieux Arides*, edited by John Libbey, AUPELF-UREF, 135–48. Paris: Eurotext.
[https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=kcNgkQquf-kC&oi=fnd&pg=PA135&dq=Analyse+des+capacités+androgénétiques+de+génotypes+marocains+de+Triticum+durum,+&ots=WelSr2I3uE&sig=_j2aoxy0HXLnlaWu1-vg8qrBe2w#v=onepage&q=Analyse des capa](https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=kcNgkQquf-kC&oi=fnd&pg=PA135&dq=Analyse+des+capacités+androgénétiques+de+génotypes+marocains+de+Triticum+durum,+&ots=WelSr2I3uE&sig=_j2aoxy0HXLnlaWu1-vg8qrBe2w#v=onepage&q=Analyse+des+capa).

- Church, G M, and W Gilbert. 1984. "Genomic Sequencing." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (7): 1991–95.
<https://doi.org/10.1073/pnas.81.7.1991>.
- Cistué, L., M. P. Vallés, B. Echávarri, J. M. Sanz, and A. Castillo. 2003. "Barley Anther Culture." In *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, 29–34. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_5.
- Clapham, D., J. Edwards, and P. Portlock. 1973. "Haploid Hordeum Plants from Anthers in Vitro." *Z Pflanzenzucht* 69: 142–55. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201303242441>.
- Cockram, James, Huw Hones, and Donal M. O’Sullivan. 2011. "Genetic Variation at Flowering Time Loci in Wild and Cultivated Barley." *Plant Genetic Resources* 9 (02): 264–67. <https://doi.org/10.1017/S1479262111000505>.
- Collins, G. B. 1977. "Production and Utilization of Anther-Derived Haploids in Crop Plants1." *Crop Science* 17 (4): 583–86.
<https://doi.org/10.2135/cropsci1977.0011183X001700040025x>.
- Collins, HM, RA Burton, DL Topping, and ML Liao. 2010. "Variability in Fine Structures of Noncellulosic Cell Wall Polysaccharides from Cereal Grains: Potential Importance in Human Health and Nutrition." *Wiley Online Library* 87 (4): 272–82.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1094/CCHEM-87-4-0272>.
- Corazza-Nunes, M.J., M.A. Machado, W.M.C. Nunes, M. Cristofani, and M.L.P.N. Targon. 2002. "Assessment of Genetic Variability in Grapefruits (*Citrus Paradisi* Macf.) and Pummelos (*C. Maxima* (Burm.) Merr.) Using RAPD and SSR Markers." *Euphytica* 126 (2): 169–76. <https://doi.org/10.1023/A:1016332030738>.
- Cossette, F. 1982. "La Production de Lignées D`orge Haploïdes et Diploïdes Homozygotes Par Culture D`anthères."
- Daniel Prat, Patricia Faivre Rampant, Emilce Prado De. 2006. "Analyse Du Génome et Gestion Des Ressources Génétiques Forestières - Daniel Prat, Patricia Faivre Rampant, Emilce Prado - Google Livres." 2006.
https://books.google.co.ma/books?id=nOOV6KN_B3oC&pg=PA56-IA2&lpg=PA56-IA2&dq=indice+de+polymorphisme+PIC&source=bl&ots=PCbNr-aVhz&sig=ACfU3U3vxpKkCWJIQA7pnVUp3dleOsImtA&hl=fr&sa=X&ved=2ahUKE

- widgI69zqPnAhXEuHEKHdcsA88Q6AEwA3oECAoQAQ#v=onepage&q=indice de p.
- De-Jong-van Lier, Q., J.C. van Dam, and K. Metselaar. 2009. "Root Water Extraction under Combined Water and Osmotic Stress." *Soil Science Society of America Journal* 73 (3): 862–75. <https://doi.org/10.2136/sssaj2008.0157>.
- Demarly, Y. 1991. *Plant Biotechnology: State of the Art and Prespects. Options Mediterraneennes. Serie A: Seminaires Mediterraneens (CIHEAM)*. Mediterranean agronomic Institute. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=QC9265109>.
- Demarly, Yves., and Monique. Sibi. 1996. *Amélioration Des Plantes et Biotechnologies*. John Libbey Eurotext.
- Département de l'Agriculture des États-Unis. 2018. "Les Céréales En Chiffres | Passion Céréales." Passion Céréales. 2018. <https://www.passioncereales.fr/dossier-thematique/les-cereales-en-chiffres>.
- Devaux, P. 1992. "Haploidy in Barley and Wheat Improvement." In *Reproductive Biology and Plant Breeding*, 139–51. Springer Berlin Heidelberg.
- . 1998. "Les Plantes Haploïdes Chez l'orge, Avec Extension Au Blé: Méthodes d'obtention et Relations Avec l'organisation de Leur Génome." Diss. Lille 1.
- Devaux, P., and K. J. Kasha. 2009. "Overview of Barley Doubled Haploid Production." In *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 47–63. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_3.
- Devaux, P. 1987. "Comparison of Anther Culture and Hordeum Bulbosum Method for the Production of Doubled Haploid in Winter Barley I. Production of Green Plants." *Plant Breeding* 98 (3): 215–19.
- Devaux, Pierre, and Richard Pickering. 2005. "Haploids in the Improvement of Poaceae." In *Haploids in Crop Improvement II*, 215–42. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/3-540-26889-8_11.
- Dib, Colette, Sabine Fauré, Cécile Fizames, Delphine Samson, Nathalie Drouot, Alain Vignal, Philippe Millasseau, et al. 1996. "A Comprehensive Genetic Map of the Human Genome Based on 5,264 Microsatellites." *Nature* 380 (6570): 152–54. <https://doi.org/10.1038/380152a0>.

- Dita, Miguel A., Nicolas Rispaïl, Elena Prats, Diego Rubiales, and Karam B. Singh. 2006. "Biotechnology Approaches to Overcome Biotic and Abiotic Stress Constraints in Legumes." *Euphytica* 147 (1–2): 1–24. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-6156-9>.
- Djerah, A, and B Oudjehih. 2015. "Effet Du Stress Salin Sur La Germination de Seize Variétés d'orge (*Hordeum Vulgare* L.)." *Courrier Du Savoir* 20: 47–56. <http://revues.univ-biskra.dz/index.php/cds/article/view/1445>.
- Dodds John H., and Roberts Lorin W. 1985. *Experiments in Plant Tissue Culture*. Edited by Cambridge University Press. 2nd ed. Cambridge, UK. https://books.google.co.ma/books/about/Experiments_in_Plant_Tissue_Culture.html?id=2p-VnQEACAAJ&redir_esc=y.
- Doré, Claire, and F. Varoquaux. 2006. *Histoire et Amélioration de Cinquante Plantes Cultivées*. Institut national de la recherche agronomique.
- Douard, Frédéric. 2018. "Les Chiffres Clés Du Climat 2019 En France, En Europe et Dans Le Monde | MAGAZINE ET PORTAIL FRANCOPHONE DES BIOÉNERGIES." Bioénergie International, Magazine & Portail d'information Francophone No 1 Sur Les Bioénergies. 2018. <https://www.bioenergie-promotion.fr/57903/les-chiffres-cles-du-climat-2019-en-france-en-europe-et-dans-le-monde/>.
- Dumas de vaulx, Robert, Daniel Chambonnet, and Edmond Pochard. 1981. "Culture in Vitro d'anthères de Piment (*Capsicum Annuum* L.) : Amélioration Des Taux d'obtention de Plantes Chez Différents Géotypes Par Des Traitements à + 35 °C." *Agronomie* 1 (10): 859–64.
- Duncan, David B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests." *Biometrics* 11 (1): 1–42. <https://doi.org/0.2307/3001478>.
- Dure, Leon, Sally C. Greenway, and Glenn A. Galau. 1981. "Developmental Biochemistry of Cottonseed Embryogenesis and Germination: Changing Messenger Ribonucleic Acid Populations as Shown by in Vitro and in Vivo Protein Synthesis." *Biochemistry* 20 (14): 4162–68. <https://doi.org/10.1021/bi00517a033>.
- Echt, C. S., L. A. Erdahl, and T. J. McCoy. 1992. "Genetic Segregation of Random Amplified Polymorphic DNA in Diploid Cultivated Alfalfa." *Genome* 35 (1): 84–87. <https://doi.org/10.1139/g92-014>.

- El-Goumi, Y., M. Fakiri, M. Benbachir, S. Essayagh, and O. Lamsaouri. 2017. "Effect of Cold Pretreatment, Anthers Orientation, Spikelet Position and Donor Tiller on the Callusing Response in Barley Anther In Vitro Culture." *International Journal of Medical Biotechnology & Genetics* S2 (003): 33–38.
- El-Goumi, Y. 2015. "Androgénèse in Vitro En Conditions d'application Progressive de Stress Salin Chez Trois Cultivars d'orge Marocaine (*Hordeum Vulgare* Ssp. *Vulgare*) Approche Pour La Création de Tolérance à La Salinité." Université Hassan I, Faculté des sciences et techniques, Settat.
- El-Goumi, Y, M Fakiri, O Lamsaouri, and M Benchekroun. 2014. "Salt Stress Effect on Seed Germination and Some Physiological Traits in Three Moroccan Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Cultivars." *Journal of Materials and Environmental Sciences* 5 (2): 625–32. http://www.jmaterenvironsci.com/Document/vol5/vol5_N2/76-JMES-685-2014-Elgoumi.pdf.
- El-Goumi, Y, M Fakiri, O Lamsaouri, M Benchekroun, and M F Hassani. 2014. "Analyse de La Capacité Androgénétique de Trois Cultivars de Blé Dur (*Triticum Durum*) et Trois Cultivars de Blé Tendre (*Triticum Aestivum*)." *Lebanese Science Journal* 15 (1): 85–98.
- El-Haddoury, J, H Chlayah, and E Picard. 1993. *Etude de l'effet de Quelques Facteurs Génotypique et Environnementaux de l'androgénèse in Vitro Chez Des Variétés de Blé Tendre Adaptées Au Maroc*. Le progrès. AUPELF-UREF.
- El-Tayeb, M. A. 2005. "Response of Barley Grains to the Interactive Effect of Salinity and Salicylic Acid." *Plant Growth Regulation* 45 (3): 215–24. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-4928-1>.
- El-Yacoubi, H., A. Rochdi, K. Ayolie, and A. Rachidai. 2004. "Selection and Evaluation of Stable Salt-Tolerant Callus Cell Lines of the Troyer Citrange." *Fruits* 59 (595): 325–37. <https://doi.org/10.1051/fruits:2004031>.
- ELLIS, R. P., B. P. FORSTER, R. WAUGH, N. BONAR, L. L. HANDLEY, D. ROBINSON, D. C. GORDON, and W. POWELL. 1997. "Mapping Physiological Traits in Barley." *New Phytologist* 137 (1): 149–57. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00822.x>.
- Ertossi, Frédérique A Berlenc, Djibril S Ané, U M R Bepc, and Centre De Montpellier. 2006. "Aptitude à La Déshydratation Des Embryons Zygotiques de Palmier à Huile et de Palmier Dattier : Étude de l' Expression de Gènes LEA" 6: 401–13.

- Esteves, P, and F Belzile. 2014. “Improving the Efficiency of Isolated Microspore Culture in Six-Row Spring Barley: I-Optimization of Key Physical Factors.” *Plant Cell Reports* 33 (6): 993–1001. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1583-x>.
- Esteves, Patricio. 2014. “Optimisation de La Culture de Microspores Isolées Chez Les Orges de Printemps à Six Rangs.” Université LAVAL. Québec, Canada.
- Fakiri, M., and ML. Sibi. 1994. *Gynogenèse Chez Des Génotypes Marocains d’orge (Hordeum Vulgare)*. Quel aveni. Paris.
- Fakiri, Malika. 1995. “Obtention Chez l’orge (Hordeum Vulgare) de Regeneration Par Androgenese et Gynogenese in Vitro En Conditions de Stress Salin. Application a Trois Genotypes Marocains.” Vandoeuvre-les-Nancy, INPL.
- FAO. 2017. “FAOSTAT.” FAO. 2017.
http://www.fao.org/faostat/fr/?fbclid=IwAR1GRfl_zlBaJk-ynVyYTrNvE9OZ-15KV1INgADGRptz_nZuGNBZoQv8PTU#data/QC.
- . 2019. “Bulletin de La FAO Sur l’offre et La Demande de Céréales.” Organisation Des Nations Unies Pour l’alimentation et l’agriculture. 2019.
<http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/fr/>.
- Farissi, M, F Aziz, A Bouizgaren, and Ch Ghoulam. 2014. “La Symbiose Légumineuses-Rhizobia Sous Conditions de Salinité : Aspect Agro-Physiologique et Biochimique de La Tolérance [Legume-Rhizobia Symbiosis under Saline Conditions : Agro-Physiological and Biochemical Aspects of Tolerance]” 11 (1): 96–104.
- Forensics, DNA. 2019. “The Discovery of DNA Fingerprinting.” 2019.
<http://www.dnaforensics.com/DNAFingerprinting.aspx>.
- Forest, C. 1988. “Androgenèse et Gynogenèse Chez Hordeum Vulgare.” INPL Nancy.
- Foroughi Wehr, B., and G. Wenzel. 1993. “Andro-and Parthenogenesis.” In *Plant Breeding*, 261–77. Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-011-1524-7_18.
- Forster, B.P. and Thomas, W.T.B. 2005. *Doubled Haploids in Genetics and Plant Breeding*. Edited by Jules Janick. Wiley.
https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=NQinOSRh9f0C&oi=fnd&pg=PA57&dq=Doubled+haploids+in+genetics+and+plant+breeding.&ots=Z53aLt_coV&sig=pMX36fi xwuGt852hiad2ZA4vQJ0#v=onepage&q=Doubled haploids in genetics and plant

breeding.&f=false.

- Forster, B P, M S Phillips, T E Miller, E Baird, and W Powell. 1990. "Chromosome Location of Genes Controlling Tolerance to Salt (NaCl) and Vigour in *Hordeum Vulgare* and *H. Chilense*." *Heredity* 65 (1): 99–107. <https://doi.org/10.1038/hdy.1990.75>.
- Forster, Brian P., Erwin Heberle-Bors, Ken J. Kasha, and Alisher Touraev. 2007. "The Resurgence of Haploids in Higher Plants." *Trends in Plant Science* 12 (8): 368–75. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138507001598>.
- Gabriel, Patrick. 2004. "L'analyse Conventionnaliste Appliquée à La Biotechnologie Végétale." *Revue Française de Gestion* 30 (151): 31–50. <https://doi.org/10.3166/rfg.151.31-50>.
- Gaiotto, F. A., M. Bramucci, and D. Grattapaglia. 1997. "Estimation of Outcrossing Rate in a Breeding Population of *Eucalyptus Urophylla* with Dominant RAPD and AFLP Markers." *Theoretical and Applied Genetics* 95 (5–6): 842–49. <https://doi.org/10.1007/s001220050634>.
- Gallais, A. 1994. "La Sélection Assistée Par Marqueurs." *Quel Avenir Pour l'amélioration Des Plantes ?*, 387–97. [https://doi.org/10.1016/S0294-3506\(00\)88867-5](https://doi.org/10.1016/S0294-3506(00)88867-5).
- Gamborg, O. L. 1986. *Protoplasts and Plant Regeneration in Culture*. Manual of. Washington: American Society for Microbiology.
- Gautheret, R. J., and Robert. Longchamp. 1959. *La Culture Des Tissus Végétaux : Techniques et Réalisations*. Masson. Paris: Masson,.
- George, Edwin F., Michael A. Hall, and Geert-Jan De Klerk. 2008. "Stock Plant Physiological Factors Affecting Growth and Morphogenesis." In *Plant Propagation by Tissue Culture*, 403–22. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_11.
- Germanà, Maria Antonietta. 2011. "Anther Culture for Haploid and Doubled Haploid Production." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 104 (3): 283–300. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9852-z>.
- Gouvernement du Canada. 2016. "L'orge Est Appréciée Pour Ses Bienfaits Cardiovasculaires - Agriculture et Agroalimentaire Canada." 2016. <http://www.agr.gc.ca/fra/nouvelles/realisations-scientifiques-en-agriculture/l-orge-est->

appreciee-pour-ses-bienfaits-cardiovasculaires/?id=1378999685709.

- Guasmi, F, W Elfalleh, N Marzougui, T Triki, and A Ferchichi. 2010. "Création de Variétés Tolérantes Au Stress Abiotique Chez l'orge (*Hordeum Vulgare* L.) Par Culture d'anthères." *Acta Botanica Gallica* 157 (3): 445–50.
<https://doi.org/10.1080/12538078.2010.10516221>.
- Guha, Sipra, and S. C. Maheshwari. 1964. "In Vitro Production of Embryos from Anthers of *Datura*." *Nature* 204 (4957): 497–497. <https://doi.org/10.1038/204497a0>.
- Guiga, W. 2006. "Identification Des Inhibiteurs de La Germination de l'orge et Mise Au Point d'un Procédé de Traitement Des Eaux de Trempe En Malterie En Vue Leur Recyclage." *Http://Www.Theses.Fr*. Vandoeuvre-les-Nancy, INPL.
<http://www.theses.fr/2006INPL077N>.
- Guo, Peiguo, Michael Baum, Stefania Grando, Salvatore Ceccarelli, Guihua Bai, Ronghua Li, Maria von Korff, Rajeev K. Varshney, Andreas Graner, and Jan Valkoun. 2009. "Differentially Expressed Genes between Drought-Tolerant and Drought-Sensitive Barley Genotypes in Response to Drought Stress during the Reproductive Stage." *Journal of Experimental Botany* 60 (12): 3531–44. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp194>.
- Haberlandt, G. 1902. "Kulturversuche Mit Isolierten Pflanzenzellen." *Sitzber. K. Akad. Wiss. Wien, Math.-Naturw. Kl., Abt. 11*: 69–92. <https://doi.org/10.1007/BF01916543>.
- Haddad A. El Rabey. 2012. "Molecular Characterization of Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Genome for Drought Tolerant Cultivars Selection." *African Journal of Biotechnology* 11 (40): 9527–33. <https://doi.org/10.5897/AJB12.856>.
- Hadrami, I. El, M. El Bellaj, A. El Idrissi, F. J' Aiti, S. El Jaafari, and F. Daayf. 1998. *Biotechnologies Végétales et Amélioration Du Palmier Dattier (Phoenix Dactylifera L.), Pivot de l'agriculture Oasienne Marocaine. Caheires Agricultures*. Vol. 7. John Libbey Eurotext. <http://revues.cirad.fr/index.php/cahiers-agricultures/article/view/30125>.
- Hajlaoui, H, M Denden, and M Bouslama. 2007. "Etude de La Variabilité Intraspécifique de Tolérance Au Stress Salin Du Pois Chiche (*Cicer Arietinum* L .) Au Stade Germination." *Tropicultua* 25 (3): 168–73.
- Haouala, F, C Hannachi, and E Zid. 2003. "Exploitation de La Variabilité Somaclonale Pour La Recherche d'oeillet (*Dianthus Caryophyllus* L.) Tolérant à La Salinité." *Tropicultura*

- 21 (1): 16–21. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012049102>.
- Haque, Mozidul, and S. M. Shahinul Islam. 2014. “Application of Cold Pretreatment and Optimisation of Media for Enhancement of Anther Culture Response in Two Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Genotypes Derived from Bangladesh.” *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 22 (1): 127–36.
- Hassani, Tayeb Ameziane El. 1995. “Croissance et Developpement Des Plantes Cultivées.” *Agronomie Moderne* III: 192.
- Haut-Commissariat au Plan. 2011. “Site Institutionnel Du Haut-Commissariat Au Plan Du Royaume Du Maroc.” 2011. <https://www.hcp.ma/>.
- Hentour, S, Y. El-Goumi, M Fakiri, O Lamsaouri, M. Benbachir, and M. Benchekroun. 2016. “Effet de Prétraitement Au Froid et Au Mannitol Sur l’androgenèse et La Gynogenèse Chez Des Variétés d’orge de Printemps (*Hordeum Vulgare* L.)” *Journal of Materials and Environmental Science* 7 (7): 2583–94.
- Hill, M., H. Witsenboer, M. Zabeau, P. Vos, R. Kesseli, and R. Michelmore. 1996. “PCR-Based Fingerprinting Using AFLPs as a Tool for Studying Genetic Relationships in *Lactuca* Spp.” *Theoretical and Applied Genetics* 93 (8): 1202–10. <https://doi.org/10.1007/BF00223451>.
- Hillel, D, A. K. Braimoh, and P. L. G Vlek. 2008. “Soil Degradation under Irrigation.” In *Land Use and Soil Resources*, 101–19. Netherlands, Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6778-5_6.
- Hmouni, Driss, Fatine Mouhssine, Moussa Ouhaddach, Fadoua Laklai, Sara Ech-Cheddadi, Brahim Bourkhiss, Noredine R’him, Houda El Yacoubi, and Atmane Rochdi. 2017. “Amélioration de La Sélection Variétale Chez Le Blé Tendre (*Triticum Aestivum* L) Par Étude de l’effet de La Salinité Sur Certains Paramètres de Germination.” *International Journal of Innovation and Applied Studies* 21 (2): 222–30. <http://www.ijias.issr-journals.org/>.
- Ho, K. M., and G. E. Jones. 1980. “MINGO BARLEY.” *Canadian Journal of Plant Science* 60 (1): 279–80. <https://doi.org/10.4141/cjps80-041>.
- Hoekstra, S, S van Bergen, I.R van Brouwershaven, R.A Schilperoort, and M Wang. 1997. “Androgenesis in *Hordeum Vulgare* L.: Effects of Mannitol, Calcium and Abscisic Acid

- on Anther Pretreatment.” *Plant Science* 126 (2): 211–18. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(97\)00096-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)00096-4).
- Hoekstra, S, I R Hoekstra, R A Hoekstra, and E Hoekstra. 1996. “The Interaction of 2, 4-D Application and Mannitol Pretreatment in Anther and Microspore Culture Of *Hordeum Vulgare* L. Cv. Igri.” *Journal of Plant Physiology* 148 (6): 696–700.
- Hoekstra, S, M H Van Zijderveld, J D Louwerse, F Van Heidekamp, and F Van der Mark. 1992. “Anther and Microspore Culture of *Hordeum Vulgare* L. Cv. Igri.” *Plant Science* 86 (1): 89–96.
- Hong, Bimei, Rivka Barg, and Tuan-hua David Ho. 1992. “Developmental and Organ-Specific Expression of an ABA- and Stress-Induced Protein in Barley.” *Plant Molecular Biology* 18 (4): 663–74. <https://doi.org/10.1007/BF00020009>.
- Hongtrakul, Vipa, Gordon M. Huestis, and S. J. Knapp. 1997. “Amplified Fragment Length Polymorphisms as a Tool for DNA Fingerprinting Sunflower Germplasm: Genetic Diversity among Oilseed Inbred Lines.” *Theoretical and Applied Genetics* 95 (3): 400–407. <https://doi.org/10.1007/s001220050576>.
- Hooghvorst, Isidre, Eduardo Ramos-Fuentes, Camilo López-Cristofannini, Mirari Ortega, Raimon Vidal, Xavier Serrat, and Salvador Nogués. 2018. “Antimitotic and Hormone Effects on Green Double Haploid Plant Production through Anther Culture of Mediterranean Japonica Rice.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 134 (2): 205–15. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1413-x>.
- Horsley, R.D., J.D. Franckowiak, and P.B. Schwarz. 2009. “Barley.” In *Cereals*, 227–50. New York, NY: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72297-9_7.
- Hu, T. C., A. Ziauddin, E. Simion, and K. J. Kasha. 1995. “Isolated Microspore Culture of Wheat (*Triticum Aestivum* L.) in a Defined Media I. Effects of Pretreatment, Isolation Methods, and Hormones.” *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 31 (2): 79–83. <https://doi.org/10.1007/BF02632241>.
- Hu, Tianci, and Ken J Kasha. 1999. “A Cytological Study of Pretreatments Used to Improve Isolated Microspore Cultures of Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Cv. Chris.” *Genome* 42 (3): 432–41. <https://doi.org/10.1139/g99-002>.
- Hunter, C. 1985. “The Effect of Anther Orientation on the Production of Microspore-Derived

- Embryoids and Plants of *Hordeum Vulgare* Cv. Sabarlis.” *Plant Cell Reports* 4 (5): 267–68. <https://doi.org/10.1007/BF00269374>.
- Hunter, C P. 1988. “Plant Regeneration from Microspores of Barley *Hordeum Vulgare* L.” University of London. Wye College, Ashford, Kent.
- Jacquard, C., G. Wojnarowicz, and C. Clément. 2003. “Anther Culture in Barley.” In *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, 21–27. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_4.
- Jacquard, Cédric, Frédérique Nolin, Carine Hécart, Dace Grauda, Isaak Rashal, Sandrine Dhondt-Cordelier, Rajbir S. Sangwan, Pierre Devaux, Florence Mazeyrat-Gourbeyre, and Christophe Clément. 2009. “Microspore Embryogenesis and Programmed Cell Death in Barley: Effects of Copper on Albinism in Recalcitrant Cultivars.” *Plant Cell Reports* 28 (9): 1329–39. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0733-z>.
- Jähne, A, and H Lörz. 1995. “Cereal Microspore Culture.” *Plant Science* 109 (1): 1–12. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04149-O](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04149-O).
- Jennie, Brand-Miller, Susan Hayne, Petocz Peter, and Colagiuri Stephen. 2003. “Low–Glycemic Index Diets in TheManagement of Diabetes.” *Diabetes Care* 26 (8): 2261–67.
- Jones, Elizabeth S, Natalia L Mahoney, Michael D Hayward, Ian P Armstead, J Gilbert Jones, Mervyn O Humphreys, Ian P King, et al. 2002. “An Enhanced Molecular Marker Based Genetic Map of Perennial Ryegrass (*Lolium Perenne*) Reveals Comparative Relationships with Other Poaceae Genomes.” *Genome* 45 (2): 282–95. <https://doi.org/10.1139/g01-144>.
- Kadri, K, S Maalam, M. H. Cheikh, A Benadbellah, C Rahmoune, and M Bennaceur. 2009. “Effet Du Stress Salin Sur La Germination, La Croissance et La Production En Grains de Quelques Accessions Tunisiennes d’orge (*Hordeum Vulgare* L.)” *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, no. 29 (June): 72–79. <http://revue.umc.edu.dz/index.php/c/article/view/359>.
- Kahrizi, D., and R. Mohammadi. 2009. “Study of Androgenesis and Spontaneous Chromosome Doubling in Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Genotypes Using Isolated Microspore Culture.” *Acta Agronomica Hungarica* 57 (2): 155–64. <https://doi.org/10.1556/AAgr.57.2009.2.7>.

- Kahrizi, D, S Mahmoodi, G B Khaniki, M Mirzaei, and D Kahrizi. 2011. "Effect of Genotype on Androgenesis in Barley (*Hordeum Vulgare* L.)." *Biharean Biologist* 5 (2): 132–34.
- Kalaji M.H., Pietkiewicz S. 1993. "Salinity Effects on Plant Growth and Other Physiological Processes." *Acta Physiologiae Plantarum* 15 (2): 89–124.
<http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.agro-article-a7c3666c-4175-46f4-b350-d91cfd7d0568>.
- Kandil, Mostafa. 1990. "Hérédité Épigénique de Vitro-Variants Obtenus Par Haplodiploïdisation Chez l'Orge (*Hordeum Vulgare*): Analyse Des Croisements Diallèles et de Leurs Descendances Par Autofécondation." Vandoeuvre-lès-Nancy, INPL.
- Karan, R, and P K. Subudhi. 2012. "Approaches to Increasing Salt Tolerance in Crop Plants." In *Abiotic Stress Responses in Plants*, 63–88. New York, NY: Springer New York.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0634-1_4.
- Karimzadeh, Ghasem, Géza Kovács, and Beáta Barnabás. 1995. "Effects of Cold Treatment and Different Culture Media on the Androgenic Capacity of Two Winter Wheat Genotypes." *Cereal Research Communications* 23 (3): 223–27.
- Karsai, I., P. Szűcs, K. Mészáros, K. Puskás, Z. Bedő, and O. Veisz. 2007. "Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Marker Linkage Map: A Case Study of Various Marker Types and of Mapping Population Structure." *Cereal Research Communications* 35 (4): 1551–62.
<https://doi.org/10.1556/CRC.35.2007.4.2>.
- Kasha, K. J., and K. N. Kao. 1970. "High Frequency Haploid Production in Barley (*Hordeum Vulgare* L.)." *Nature* 225 (5235): 874–76. <https://doi.org/10.1038/225874a0>.
- Kasha, K. J., and M. Maluszynski. 2003. "Production of Doubled Haploids in Crop Plants. An Introduction." In *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, 1–4. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_1.
- Kasha, K.J. 1974. "International Symposium on Haploids in Higher Plants: Advances and Potential, 1; Guelph, Ontario; 10-14 Jun 1974. Proceedings." In *^C1974*. Canada.
<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=CIMMYT.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=008683>.

- Kasha, K J, T C Hu, R Oro, E Simion, and Y S Shim. 2001. "Nuclear Fusion Leads to Chromosome Doubling during Mannitol Pretreatment of Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Microspores." *Journal of Experimental Botany* 52 (359): 1227–38.
- Kawasaki, Shinji, Chris Borchert, Michael Deyholos, Hong Wang, Susan Brazille, Kiyoshi Kawai, David Galbraith, and Hans J Bohnert. 2001. "Gene Expression Profiles during the Initial Phase of Salt Stress in Rice." *THE PLANT CELL ONLINE* 13 (4): 889–905. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.4.889>.
- Keebler, Catherine M., and Michael Facik. 2008. "Cytopreparatory Techniques." *Comprehensive Cytopathology*, January, 977–1003. <https://doi.org/10.1016/B978-141604208-2.10031-4>.
- Keller, W. A., and K. C. Armstrong. 1979. "Stimulation of Embryogenesis and Haploid Production in Brassica Campestris Anther Cultures by Elevated Temperature Treatments." *Theoretical and Applied Genetics* 55 (2): 65–67. <https://doi.org/10.1007/BF00285191>.
- Khajeh-Hosseini, M., A.A. Powell, and I.J. Bingham. 2003. "The Interaction between Salinity Stress and Seed Vigour during Germination of Soyabean Seeds." *Seed Science and Technology* 31 (3): 715–25. <https://doi.org/10.15258/sst.2003.31.3.20>.
- Kihara, M., K. Fukuda, H. Funatsuki, I. Kishinami, and Y. Aida. 1994. "Plant Regeneration Through Anther Culture of Three Wild Species of Hordeum (*H. Murinum*, *H. Marinum* and *H. Bulbosum*)." *Plant Breeding* 112 (3): 244–47. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1994.tb00678.x>.
- Kleinhofs, A., A. Kilian, M. A. Saghai Maroof, R. M. Biyashev, P. Hayes, F. Q. Chen, N. Lapitan, et al. 1993. "A Molecular, Isozyme and Morphological Map of the Barley (*Hordeum Vulgare*) Genome." *Theoretical and Applied Genetics* 86 (6): 705–12. <https://doi.org/10.1007/BF00222660>.
- Kobaissi, Ahmad. 2001. "Gynogenèse En Conditions de Stress Salin, Source de Vitrovariation Orientée, Pour La Création de Tolérance à La Salinité Chez l'orge (*Hordeum Vulgare*) et Le Blé Dur (*Triticum Durum*)." Institut National Polytechnique de Lorraine. <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750321>.
- Koerniati, Sri, and Hani Widhianata. 2012. "Construction and Transformation of HVA1 Gene Expression Vector into Indonesian Elite Rice Varieties." *AgroBiogen* 8(2):54-61 8 (2):

54-61 Construction.

- Kremer, A. 1994. "Diversité Génétique et Variabilité Des Caractères Phénotypiques Chez Les Arbres Forestiers." *Genetics Selection Evolution* 26: 105–23.
- Kruczkowska, H, H Pawłowska, and B Skucińska. 2002. "Influence of Anther Pretreatment on the Efficiency of Androgenesis in Barley." *Journal of Applied Genetics* 43 (3): 287–96.
- Labbani, Z., J. De Buyser, and E. Picard. 2007. "Effect of Mannitol Pretreatment to Improve Green Plant Regeneration on Isolated Microspore Culture in Triticum Turgidum Ssp. Durum Cv. 'Jennah Khetifa.'" *Plant Breeding* 126 (6): 565–68.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01399.x>.
- Labbani, Z. 2007. "Réorientation Androgénétique Des Microspores de Triticum Turgidum Subsp. Durum (Desf) Husn. L'albinisme Peut-Il Être Partiellement Maîtrisé ?" Université Mentouri Constantine.
- Labidi, A. 2017. "La Salinisation Des Sols: Une Vraie Menace." AgriMaroc.Ma. 2017.
<http://www.agrimaroc.ma/salinisation-sols-vraie-menace/>.
- Lamsaouri, Ouafa. 1991. "Culture d'anthères et Androgénèse Chez Eucalyptus Camaldulensis : Etude Physiologique et Cytologique." Université Mohammed V- Agdal, Faculté des Sciences, Rabat. <https://toubkal.imist.ma/handle/123456789/843>.
- Lander, Eric S., Lauren M. Linton, Bruce Birren, Chad Nusbaum, Michael C. Zody, Jennifer Baldwin, Keri Devon, et al. 2001. "Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome." *Nature* 409 (6822): 860–921. <https://doi.org/10.1038/35057062>.
- Lantos, Csaba, Lajos Bóna, Éva Nagy, Ferenc Békés, and János Pauk. 2018. "Induction of in Vitro Androgenesis in Anther and Isolated Microspore Culture of Different Spelt Wheat (Triticum Spelta L.) Genotypes." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 133 (3): 385–93.
<https://doi.org/10.1007/s11240-018-1391-z>.
- Laroche, Liette. 1998. "Influence de La Concentration Des Composantes Du Milieu Au Début de La Phase d'induction En Culture in Vitro d'anthères d'orge."
- Larsen, E. T., I. K.D. Tuvevsson, and S. B. Andersen. 1991. "Nuclear Genes Affecting Percentage of Green Plants in Barley (Hordeum Vulgare L.) Anther Culture." *Theoretical and Applied Genetics* 82 (4): 417–20. <https://doi.org/10.1007/BF00588593>.

- Lazar, M. D., G. W. Schaeffer, and P. S. Baenziger. 1990. "The Effects of Interactions of Culture Environment with Genotype on Wheat (*Triticum Aestivum*) Anther Culture Response." *Plant Cell Reports* 8 (9): 525–29. <https://doi.org/10.1007/BF00820201>.
- Lazaridou, T. B., A. S. Lithourgidis, S. T. Kotzamanidis, and D. G. Roupakias. 2005. "Anther Culture Response of Barley Genotypes to Cold Pretreatments and Culture Media." *Russian Journal of Plant Physiology* 52 (5): 696–99. <https://doi.org/10.1007/s11183-005-0104-8>.
- Levitt, J. 1980. *Responses of Plants to Environmental Stresses (Physiological Ecology): Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses. Responses of Plants to Environmental Stress, 2nd Edition, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses*. 2nd ed. Vol. 1. USA: Academic Press.
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19802605739>.
- Lu, J., M. R. Knox, M. J. Ambrose, J. K. M. Brown, and T. H. N. Ellis. 1996. "Comparative Analysis of Genetic Diversity in Pea Assessed by RFLP- and PCR-Based Methods." *Theoretical and Applied Genetics* 93 (7): 1103–11. <https://doi.org/10.1007/BF00230132>.
- Mackill, D J., and Ni. Junjian. 2008. "Molecular Mapping and Marker-Assisted Selection for Major-Gene Traits in Rice." In *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 137–51. https://doi.org/10.1142/9789812814296_0009.
- Madesis, Panagiotis, Ioannis Ganopoulos, and Athanasios Tsaftaris. 2013. "Microsatellites: Evolution and Contribution." In *Microsatellites*, edited by Springer Protocols, 1–13. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-389-3_1.
- Maglione, Rémi. 2018. "Étude de l'intégrité Du Génome Chloroplastique de l'orge (*Hordeum Vulgare*) En Culture de Microspores Isolées." <https://corpus.ulaval.ca/jspui/handle/20.500.11794/26919>.
- Makowska, Katarzyna, and Sylwia Oleszczuk. 2014. "Albinism in Barley Androgenesis." *Plant Cell Reports*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1543-x>.
- Maluszynski, M., K.J. Kasha, B.P. Forster, and I Szarejko. 2003. *Doubled Haploid Production in Crop Plants : A Manual*. Edited by 1st. Springer s.
https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=FrTyCAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR7&dq=Doubled+Haploid+Production+in+crop+plants&ots=_ZVLviaBYh&sig=uc9pJxkyzRDXJ7YWz6K9JBfXQ44#v=onepage&q=Doubled Haploid Production in crop

plants&f=false.

- Mansouri, S, A Kobaissi, H Nziengui, M Fakiri, A Shekafandeh, and M Sibi. 2005. "Gynogenèse in Vitro Chez Quelques Variétés de Blé Dur Du Maghreb et Du Moyen Orient (*Triticum Durum* L.) Pour l'obtention de Régénérants Chlorophylliens, En Conditions de Stress Salins." *Geo-Eco-Trop* 29: 77–88.
- Mantri, Nitin, Vikas Patade, Suprasanna Penna, Rebecca Ford, and Edwin Pang. 2012. "Abiotic Stress Responses in Plants: Present and Future." In *Abiotic Stress Responses in Plants*, 1–19. New York, NY: Springer . https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0634-1_1.
- Masmoudi, A, A Hemeir, and M Benaissa. 2014. "Impact de La Concentration et Du Type de Sel Sur Le Potentiel Germinatif et La Production de Biomasse Chez l'orge (*Hordeum Vulgare*)." *Courrier Du Savoir* 18: 95–101.
- Matheka, J.M., E. Magiri, A.O. Rasha, and J. Machuka. 2008. "In Vitro Selection and Characterization of Drought Tolerant Somaclones of Tropical Maize (*Zea Mays* L.)." *Biotechnology(Faisalabad)* 7 (4): 641–50. <https://doi.org/10.3923/biotech.2008.641.650>.
- Mayer, Klaus F.X., Robbie Waugh, Peter Langridge, Timothy J. Close, Roger P. Wise, Andreas Graner, Takashi Matsumoto, et al. 2012. "A Physical, Genetic and Functional Sequence Assembly of the Barley Genome." *Nature* 491 (7426): 711–16. <https://doi.org/10.1038/nature11543>.
- Mdarhri-Alaoui, Mériem, Najia Saldi, Averil Chlyah, and Hassan Chlyah. 1998. "Obtention Par Gynogenèse in Vitro de Plantes Haploïdes Chlorophylliennes Chez Le Blé Dur." *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences - Series III - Sciences de La Vie* 321 (1): 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0764-4469\(97\)89622-9](https://doi.org/10.1016/S0764-4469(97)89622-9).
- Mejza, StephenJ., Vincent Morgant, DeniseE. DiBona, and JamesR. Wong. 1993. "Plant Regeneration from Isolated Microspores of *Triticum Aestivum*." *Plant Cell Reports* 12 (3): 149–53. <https://doi.org/10.1007/BF00239096>.
- Mercy, S. T., and F. J. Zapata. 1987. "Position of Anthers at Plating and Its Influence on Anther Callusing in Rice." *Plant Cell Reports* 6 (4): 318–19. <https://doi.org/10.1007/BF00272008>.
- Meyer, Crezelda. 2013. "Barley Anther Culture : Determining the Optimal Pre-Treatment for Green Plant Regeneration ." University of the Western Cape.

- Michel, Koninckxloo. 2014. "Influence de La Composition Du Milieu et Des Conditions de Culture Sur La Prolifération in Vitro de l'Hybride de Bananier FHIA- 01 (AAAB) [Influence of the Substratum Composition and Culture Conditions on the in Vitro Proliferation of Banana Hybrid F" 5 (3): 280–93.
- Ministère d'Agriculture et de Pêche Maritime. 2016. "Campagne Agricole 2015-2016 Au Maroc." 2016. <https://www.agrimaroc.ma/bilan-d-une-campagne-agricole-2015-2016-caracterisee-par-de-rudes-conditions-climatiques/>.
- Ministère de l'Agriculture, de la Pêche Maritime, du Développement Rural et des Eaux et Forêts Maroc. 2017. "L'Agriculture En Chiffres 2016," 20–21. <http://www.agri-mag.com/2017/06/lagriculture-marocaine-en-chiffres-2016/>.
- Ministère de l'agriculture et de la pêche maritime. 2014. "L'agriculture Marocaine En Chiffres." http://www.agriculture.gov.ma/sites/default/files/agriculture_en_chiffres_2014-vf.pdf.
- Mliki, Ahmed, Jack E. Staub, Sun Zhangyong, and Abdelwahed Ghorbel. 2001. "Genetic Diversity in Melon (*Cucumis Melo L.*): An Evaluation of African Germplasm." *Genetic Resources and Crop Evolution* 48 (6): 587–97. <https://doi.org/10.1023/A:1013840517032>.
- Mohan, Madan, Suresh Nair, A. Bhagwat, T. G. Krishna, Masahiro Yano, C.R. Bhatia, and Takuji Sasaki. 1997. "Genome Mapping, Molecular Markers and Marker-Assisted Selection in Crop Plants." *Molecular Breeding* 3 (2): 87–103. <https://doi.org/10.1023/A:1009651919792>.
- Monneveux, Philippe, and Mahdi Nemmar. 1986. "Contribution à l'étude de La Résistance à La Sécheresse Chez Le Blé Tendre (*Triticum Aestivum L.*) et Chez Le Blé Dur (*Triticum Durum Desf.*) : Étude de l'accumulation de La Proline Au Cours Du Cycle de Développement ." *Agronomie* 6 (6): 583–90. <https://doi.org/10.1051/agro:19860611>.
- Motomura, Kazuyoshi, Hideo Tateishi, Isamu Nishisho, Makoto Okazaki, Tetsuro Miki, Akira Tonomura, Shin-ichiro Takai, Takesada Mori, and Alec J. Jeffreys. 1987. "The Zygosity Determination of Japanese Twins Using a Minisatellite Core Probe." *The Japanese Journal of Human Genetics* 32 (1): 9–14. <https://doi.org/10.1007/BF01876522>.
- Mouhaya, H. 2008. "Caractérisation Physiologique et Moléculaire de La Tolérance Au Stress Salin Chez Les Porte-Greffe Tetraploïdes d'agrumes." __ UNIVERSITE DE CORSE –

PASCAL PAOLI.

- Moule, Camille. 1980. *Cereals [Soft Wheat, Hard Wheat, Barley, Oats, Rye, Buck Wheat, Maize, Grain Sorghum, Rice; Botany, Ecology, Varieties, Cultivation Techniques; France]*. La Maison rustique. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XE8136484>.
- Mrani Alaoui, M, L El Jourmi, A Ouarzane, S Lazar, S El Antri, M Zahouily, and A Hmyene. 2013. "Effet Du Stress Salin Sur La Germination et La Croissance de Six Variétés Marocaines de Blé (Effect of Salt Stress on Germination and Growth of Six Moroccan Wheat Varieties)." *Environ. Sci. Mrani Alaoui et Al* 4 (6): 997–1004. http://www.jmaterenvirosci.com/Document/vol4/vol4_N6/135-JMES-524-2013-MraniAlaoui.pdf.
- Munns, R. 2002. "Comparative Physiology of Salt and Water Stress." *Plant, Cell and Environment* 25 (2): 239–50. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>.
- Munns, Rana, Richard A. James, and André Läuchli. 2006. "Approaches to Increasing the Salt Tolerance of Wheat and Other Cereals." *Journal of Experimental Botany* 57 (5): 1025–43. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj100>.
- Muñoz-Amatriaín, M., J. T. Svensson, A. M. Castillo, L. Cistué, T. J. Close, and M. P. Vallés. 2009. "Expression Profiles in Barley Microspore Embryogenesis." In *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 127–34. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_9.
- Murray, M.G., and W.F. Thompson. 1980. "Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA." *Nucleic Acids Research* 8 (19): 4321–26. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>.
- Nguyen, Thang Xuan, and Mariam Sticklen. 2013. "Barley HVA1 Gene Confers Drought and Salt Tolerance in Transgenic Maize" 1 (1): 1–8. <https://doi.org/10.4172/acst.1000105>.
- Nibau, C., D. J. Gibbs, and J. C. Coates. 2008. "Branching out in New Directions: The Control of Root Architecture by Lateral Root Formation." *New Phytologist* 179 (3): 595–614. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02472.x>.
- Nitch, C., and B Norreel. 1973. "Effet d'un Choc Thermique Sur Le Pouvoir Embryogénèse Du Pollen de Datura Innoxia Cultivé Dans l'anthère Ou Isolé." *CR Acad*, 303–6.
- Ogawa, Taiichi, Hiroyuki Fukuoka, and Yasunobu Ohkawa. 1994. "Induction of Cell

- Division of Isolated Pollen Grains by Sugar Starvation in Rice.” *Ikushugaku Zasshi* 44 (1): 75–77. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.44.75>.
- Oleszczuk, S., S. Sowa, and J. Zimny. 2006. “Androgenic Response to Preculture Stress in Microspore Cultures of Barley.” *Protoplasma* 228 (1–3): 95–100. <https://doi.org/10.1007/s00709-006-0179-x>.
- Olmedilla, A. 2010. “Microspore Embryogenesis.” In *Plant Developmental Biology*, 2:27–44. Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-04670-4_2.
- Olsen, F. Lok. 1992. “Isolation and Cultivation of Embryogenic Microspores from Barley (*Hordeum Vulgare* L.)” *Hereditas* 115 (3): 255–66. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1992.tb00568.x>.
- Oraby, Hesham F., Callista B. Ransom, Alexandra N. Kravchenko, and Mariam B. Sticklen. 2005. “Barley Gene Confers Salt Tolerance in R3 Transgenic Oat.” *Crop Science* 45 (6): 2218. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004-0605>.
- Ouhaddach, M, H Elyacoubi, A Douaik, D Hmouni, and A Rochdi. 2016. “Physiological and Biochemical Responses to Salt Stress in Wheat (*Triticum Aestivum* L.) at the Elongation Stage.” *Environ. Sci* 7 (9): 3084–99.
- Panaud, Olivier, Xiuli Chen, and Susan R. McCouch. 1995. “Frequency of Microsatellite Sequences in Rice (*Oryza Sativa* L.)” *Genome* 38 (6): 1170–76. <https://doi.org/10.1139/g95-155>.
- Pandey, Kamla K. 1973. “Theory and Practice of Induced Androgenesis.” *New Phytologist* 72 (5): 1129–40. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1973.tb02090.x>.
- Picard, E. 1975. “Nouveaux Resultats Concernant La Culture d’antheres in Vitro de Ble Tendre (*Triticum Aestivum* L.). Effets d’un Choc Thermique et de La Position de l’anthere Dans l’epi.” *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances. Serie D. Sciences Naturelles*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302775070>.
- Picard E, and De Buyser J. 1975. “New Results about Anther Culture in Vitro of Wheat (*Triticum Aestivum* L.): Effects of Thermic Treatment and Anther Set in Spike.” *Comptes-Rendus Hebdomadaires Des Seances de l’Academie Des Sciences. Serie D (France)* 281 (2–3): 127–30.
- Pickering RA, and P. Devaux. 1992. “Haploid Production: Approaches and Use in Plant

- Breeding.” *Genetics, Molecular Biology and Biotechnology.*, 511–39.
<https://ci.nii.ac.jp/naid/10003229704/#cit>.
- Powell, W. 1988. “The Influence of Genotype and Temperature Pre-Treatment on Anther Culture Response in Barley (*Hordeum Vulgare* L.)” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 12 (3): 291–97. <https://doi.org/10.1007/BF00034371>.
- Qian, Gang, Zhaoxue Han, Tao Zhao, Guangbing Deng, Zhifen Pan, and Maoqun Yu. 2007. “Genotypic Variability in Sequence and Expression of HVA1 Gene in Tibetan Hulless Barley, *Hordeum Vulgare* Ssp. *Vulgare*, Associated with Resistance to Water Deficit.” *Australian Journal of Agricultural Research* 58 (5): 425.
<https://doi.org/10.1071/AR06300>.
- Ramla, D, and H Khelafi. 2000. “Essai d’obtention d’haploïdes Doublés de *Triticum Turgidum* L. Var. *Durum* Par Croisements Intergénériques Avec *Zea Mays* et *Hordeum Bulbosum*” 165: 163–65.
- Rao, Srinivas C., John Ryan, Salvatore Ceccarelli, Stefania Grando, Michael Baum, and Sripada M. Udupa. 2004. “Breeding for Drought Resistance in a Changing Climate.” In *Challenges and Strategies of Dryland Agriculture*, cssaspecialpubl:167–90. Crop Science Society of America and American Society of Agronomy.
<https://doi.org/10.2135/cssaspecpub32.c11>.
- Rasmusson, D. C., and C. W. Schaller. 1959. “The Inheritance of Resistance in Barley to the Yellow-Dwarf Virus1.” *Agronomy Journal* 51 (11): 661.
<https://doi.org/10.2134/agronj1959.00021962005100110009x>.
- Reiter, R S, J G Williams, K A Feldmann, J A Rafalski, S V Tingey, and P A Scolnik. 1992. “Global and Local Genome Mapping in *Arabidopsis Thaliana* by Using Recombinant Inbred Lines and Random Amplified Polymorphic DNAs.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (4): 1477–81.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.89.4.1477>.
- Rieseberg, L. H. 1996. “Homology among RAPD Fragments in Interspecific Comparisons.” *Molecular Ecology* 5 (1): 99–105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1996.tb00295.x>.
- Roberts-Oehlschlager, Sarah L., and James M. Dunwell. 1990. “Barley Anther Culture: Pretreatment on Mannitol Stimulates Production of Microspore-Derived Embryos.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20 (3): 235–40.

<https://doi.org/10.1007/bf00041887>.

- Rohila, Jai S., Rajinder K. Jain, and Ray Wu. 2002. "Genetic Improvement of Basmati Rice for Salt and Drought Tolerance by Regulated Expression of a Barley Hva1 CDNA." *Plant Science* 163 (3): 525–32. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00155-3).
- Rustgi, Sachin, Janet Matanguihan, Jaime H. Mejías, Richa Gemini, Rhoda A. T. Brew-Appiah, Nuan Wen, Claudia Osorio, Nii Ankrah, Kevin M. Murphy, and Diter von Wettstein. 2014. "Assessment of Genetic Diversity among Barley Cultivars and Breeding Lines Adapted to the US Pacific Northwest, and Its Implications in Breeding Barley for Imidazolinone-Resistance." Edited by Tianzhen Zhang. *PLoS ONE* 9 (6): e100998. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100998>.
- Saghai-Marouf, M A, K M Soliman, R A Jorgensen, and R W Allard. 1984. "Ribosomal DNA Spacer-Length Polymorphisms in Barley: Mendelian Inheritance, Chromosomal Location, and Population Dynamics." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (24): 8014–18. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.24.8014>.
- Saiki, R K, S Scharf, F Faloona, K B Mullis, G T Horn, H A Erlich, and N Arnheim. 1985. "Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia." *Science (New York, N.Y.)* 230 (4732): 1350–54. <https://doi.org/10.1126/science.2999980>.
- Saliba-Colombani, Vera, Mathilde Causse, Laurent Gervais, and Jacqueline Philouze. 2000. "Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP Markers for the Construction of an Intraspecific Map of the Tomato Genome." *Genome* 43 (1): 29–40. <https://doi.org/10.1139/g99-096>.
- San Noeum .L. 1976. "Haploides d, Hordeum Vulgare L. Par Culture in Vitro Non Fecondes." *Ann. Amelior Plantes* 26: 751–54. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10006097254/>.
- Sanchez, A.C., D.S. Brar, N. Huang, Z. Li, and G.S. Khush. 2000. "Sequence Tagged Site Marker-Assisted Selection for Three Bacterial Blight Resistance Genes in Rice." *Crop Science* 40 (3): 792–97. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.403792x>.
- Sangaré, Mahamadou. 2018. "Optimisation de La Culture d’anthères Chez l’orge de Printemps à Six Rangs (Hordeum Vulgare)." Université Laval.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. "DNA Sequencing with Chain-Terminating

- Inhibitors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12): 5463–67. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
- Santoni. S, Faivre-Rampant. P, Prado. E, Prat. D. 2000. “Marqueurs Moléculaires Pour l’analyse Des Ressources Génétiques et l’amélioration Des Plantes.” *Cahier Agriculture* 9 (4). <http://revues.cirad.fr/index.php/cahiers-agricultures/article/view/30253>.
- Saulnier, Luc. 2012. “Les Grains de Céréales: Diversité et Compositions Nutritionnelles.” *Cahiers de Nutrition et de Dietetique* 47 (1 SUPPL. 1): S4–15. [https://doi.org/10.1016/S0007-9960\(12\)70292-4](https://doi.org/10.1016/S0007-9960(12)70292-4).
- Schut, J. W., X. Qi, and P. Stam. 1997. “Association between Relationship Measures Based on AFLP Markers, Pedigree Data and Morphological Traits in Barley.” *Theoretical and Applied Genetics* 95 (7): 1161–68. <https://doi.org/10.1007/s001220050677>.
- Scotti. C, Pupilli. F, Businelli. S, and Rotili. P Damiani. F, Arcioni. S. 1994. *Utilisation Des Marqueurs RFLP Pour l’évaluation Des Niveaux d’hétérozygotie Chez Medicago Sativa*. Edited by Quel avenir pour l’amélioration des plantes. AUPELF-URE. ohn Libbey.
- Seguí-Simarro, José M. 2010. “Androgenesis Revisited.” *The Botanical Review* 76 (3): 377–404. <https://doi.org/10.1007/s12229-010-9056-6>.
- Seguí-Simarro, José M., and Fernando Nuez. 2007. “Embryogenesis Induction, Callogenesis, and Plant Regeneration by in Vitro Culture of Tomato Isolated Microspores and Whole Anthers.” *Journal of Experimental Botany* 58 (5): 1119–32. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl271>.
- Shahinul, Islam. S. M., and Tuteja Narendra. 2012. “Enhancement of Androgenesis by Abiotic Stress and Other Pretreatments in Major Crop Species.” *Plant Science* 182 (1): 134–44. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.10.001>.
- Shan, X., T. K. Blake, and L. E. Talbert. 1999. “Conversion of AFLP Markers to Sequence-Specific PCR Markers in Barley and Wheat.” *Theoretical and Applied Genetics* 98 (6–7): 1072–78. <https://doi.org/10.1007/s001220051169>.
- Shannon, P. R. Mark, Anne E. Nicholson, Jim M. Dunwell, and D. Roy Davies. 1985. “Effect of Anther Orientation on Microspore-Callus Production in Barley (*Hordeum Vulgare* L.)” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 4 (3): 271–80. <https://doi.org/10.1007/BF00040201>.

- Shariatpanahi, Mehran E., Ugur Bal, Erwin Heberle-Bors, and Alisher Touraev. 2006. “Stresses Applied for the Re-Programming of Plant Microspores towards in Vitro Embryogenesis.” *Physiologia Plantarum* 127 (4): 519–34.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00675.x>.
- Sharp, P. J., S. Johnston, G. Brown, R. A. McIntosh, M. Pallotta, M. Carter, H. S. Bariana, et al. 2001. “Validation of Molecular Markers for Wheat Breeding.” *Australian Journal of Agricultural Research* 52 (12): 1357. <https://doi.org/10.1071/AR01052>.
- Shehadi, Mostafa, Ghayas Lakkis, Kassem Hamze, Hussein Abou Hamdan, and Ahmad Kobaissi. 2014. “Molecular And Physiological Characterization Of Local Lebanese Barley (*Hordeum Vulgare* L .) Genotypes” 3 (4).
- Si Bennasseur Alaoui. 2005. *Référentiel Pour La Conduite Technique de La Culture d’orge (Hordeum Vulgare)*. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II.
- Sibi, Monique., and Malika Fakiri. 2000. “Androgenèse et Gynogenèse, Sources de Vitrovariation et de Tolérance à La Salinité Chez l’orge *Hordeum Vulgare*?” *Science et Changements Planétaires/Sécheresse* 11 (2): 125–32.
- Sitch, L. A., J. W. Snape, and S. J. Firman. 1985. “Intrachromosomal Mapping of Crossability Genes in Wheat (*Triticum Aestivum*).” *Theoretical and Applied Genetics* 70 (3): 309–14. <https://doi.org/10.1007/BF00304917>.
- Sivamani, Elumalai, Ahmed Bahieldin, Jon M Wraith, Thamir Al-Niemi, William E Dyer, Tuan-Hua David Ho, and Rongda Qu. 2000. “Improved Biomass Productivity and Water Use Efficiency under Water Deficit Conditions in Transgenic Wheat Constitutively Expressing the Barley HVA1 Gene.” *Plant Science* 155 (1): 1–9.
[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00247-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00247-2).
- Slama-Ayed, Olfa, and Hajer Slim-Amara. 2007. “Production of Doubled Haploids in Durum Wheat (*Triticum Durum* Desf.) through Culture of Unpollinated Ovaries.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 91 (2): 125–33.
- Soleimani, V D, B R Baum, and D A Johnson. 2006. “Quantification of the Retrotransposon BARE-1 Reveals the Dynamic Nature of the Barley Genome.” *Genome* 49 (4): 389–96.
<https://doi.org/10.1139/g05-119>.
- Souilah, N. 2009. “Diversité de 13 Génotypes d’orge (*Hordeum Vulgare* L.) et de 13

- Génotypes de Blé Tendre (*Triticum Aestivum* L.): Étude Des Caractères de Production et d'adaptation." Université Mentouri Constantine1. Faculté de Sciences, de la Nature et de la Vie.
- Souza, Thiago Lívio P. O., Vilmar A. Ragagnin, Suelen N. Dessaune, Demerson A. Sanglard, José Eustáquio S. Carneiro, Maurilio A. Moreira, and Everaldo G. Barros. 2014. "DNA Marker-Assisted Selection to Pyramid Rust Resistance Genes in 'Carioca' Seeded Common Bean Lines." *Euphytica* 199 (3): 303–16. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1126-0>.
- Spollen, G. W. 1993. "Regulation of Cell Expansion in Roots and Shoots at Low Water Potentials." *Water Deficits : Plant Responses from Cell to Community*, 37–52. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10027328947/>.
- Sriskandarajah, Sridevy, Mohammad Sameri, Estelle Lerceteau-Köhler, and Anna Westerbergh. 2015. "Increased Recovery of Green Doubled Haploid Plants from Barley Anther Culture." *Crop Science* 55 (6). <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.04.0245>.
- Srivastava, Priyanka, and Rakhi Chaturvedi. 2008. "In Vitro Androgenesis in Tree Species: An Update and Prospect for Further Research." *Biotechnology Advances* 26 (5): 482–91. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2008.05.006>.
- Statista. 2019. "Production d'orge En Volume Au Niveau Mondiala de 2008/2019 à 2018/2019 (En Mollions de Tonnes)." Statista. 2019. <https://fr.statista.com/statistiques/570924/production-d-orge-dans-le-monde-2008-2009/>.
- Sunderland, N., and L. J. Evans. 1980. "Multicellular Pollen Formation in Cultured Barley Anthers." *Journal of Experimental Botany* 31 (2): 501–14. <https://doi.org/10.1093/jxb/31.2.501>.
- Szarejko, I. 2003. "Anther Culture for Doubled Haploid Production in Barley (*Hordeum Vulgare* L.)." In *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, 35–42. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_6.
- Tanksley, Steven D. 1983. "Molecular Markers in Plant Breeding." *Plant Molecular Biology Reporter* 1 (1): 3–8. <https://doi.org/10.1007/BF02680255>.
- Thompson, K F. 1972. "Cytoplasmic Male-Sterility in Oil-Seed Rape." *Heredity* 29 (October): 253. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/hdy.1972.89>.

- Tilbrook, Joanne, Rhiannon K. Schilling, Bettina Berger, Alexandre F. Garcia, Christine Trittermann, Stewart Coventry, Huwaida Rabie, et al. 2017. "Variation in Shoot Tolerance Mechanisms Not Related to Ion Toxicity in Barley." *Functional Plant Biology* 44 (12): 1194. <https://doi.org/10.1071/FP17049>.
- Toumi Larbi. 2008. "La Nouvelle Stratégie Agricole Au Maroc (Plan Vert) : Les Clés de La Réussite." <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/mor145892.pdf>.
- Touraev, Alisher, Martin Pfosser, and Erwin Heberle-Bors. 2001. "The Microspore: A Haploid Multipurpose Cell." *Advances in Botanical Research* 35 (January): 53–109. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(01\)35004-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(01)35004-8).
- Tsoata. E. 1995. "Effet Du Sel (NaCl) Sur La Germination de Graines de Légumineuses." *Cahiers Agricultures* 4 (3): 207–9. <http://revues.cirad.fr/index.php/cahiers-agricultures/article/view/29886>.
- VanToai, Tara T., Jiqing Peng, and Steven K. St. Martin. 1997. "Using AFLP Markers to Determine the Genomic Contribution of Parents to Populations." *Crop Science* 37 (4): 1370–73. <https://doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700040056x>.
- Varshney, R. K., T. C. Marcel, L. Ramsay, J. Russell, M. S. Röder, N. Stein, R. Waugh, P. Langridge, R. E. Niks, and A. Graner. 2007. "A High Density Barley Microsatellite Consensus Map with 775 SSR Loci." *Theoretical and Applied Genetics* 114 (6): 1091–1103. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0503-7>.
- Varshney, Rajeev K., Kamel Chabane, Prasad S. Hendre, Ramesh K. Aggarwal, and Andreas Graner. 2007. "Comparative Assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP Markers for Evaluation of Genetic Diversity and Conservation of Genetic Resources Using Wild, Cultivated and Elite Barleys." *Plant Science* 173 (6): 638–49. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.08.010>.
- Vierling, Richard A., and Henry T. Nguyen. 1992. "Use of RAPD Markers to Determine the Genetic Diversity of Diploid, Wheat Genotypes." *Theoretical and Applied Genetics* 84–84 (7–8): 835–38. <https://doi.org/10.1007/BF00227393>.
- Vilarinhos, A D. 2004. "Cartographie Génétique et Cytogénétique Chez Le Bananier : Caractérisation Des Translocations." Ecole nationale supérieure agronomique de Montpellier. <http://agritrop.cirad.fr/519248/>.

- Vos, Pieter, Rene Hogers, Marjo Bleeker, Martin Reijans, Theo van de Lee, Miranda Hornes, Adrie Friters, et al. 1995. "AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting." *Nucleic Acids Research* 23 (21): 4407–14. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>.
- Wagner, D B, G R Furnier, M A Saghai-Marooof, S M Williams, B P Dancik, and R W Allard. 1987. "Chloroplast DNA Polymorphisms in Lodgepole and Jack Pines and Their Hybrids." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (7): 2097–2100. <https://doi.org/10.1073/PNAS.84.7.2097>.
- Ward, Joe H. 1963. "Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function." *Journal of the American Statistical Association* 58 (301): 236–44. <https://doi.org/10.1080/01621459.1963.10500845>.
- Wędzony, M., B. P. Forster, I. Żur, E. Golemic, M. Szechyńska-Hebda, E. Dubas, G. Gotębiowska, and M. Wędzony(✉). 2009. "Progress in Doubled Haploid Technology in Higher Plants." In *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 1–33. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_1.
- Wernicke, W., and H.W. Kohlenbach. 1976. "Investigations on Liquid Culture Medium as a Means of Anther Culture in Nicotiana." *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie* 79 (3): 189–98. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(76\)80058-X](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(76)80058-X).
- Wiethölter, Paula, Maria Irene Baggio de Moraes Fernandes, Sandra Patussi Brammer, Euclides Minella, and Edson Jair Iorkzeski. 2008. "Genotypic Differences in Proembryoid Development and Green Plantlets Regeneration through Androgenesis in Barley Varieties." *Ciência Rural* 38 (1): 240–42. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000100039>.
- Williams, John G.K., Michael K. Hanafey, J. Antoni Rafalski, and Scott V. Tingey. 1993. "Genetic Analysis Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers." *Methods in Enzymology* 218 (January): 704–40. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)18053-F](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)18053-F).
- Williams, John G.K., Anne R. Kubelik, Kenneth J. Livak, J. Antoni Rafalski, and Scott V. Tingey. 1990. "DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic Markers." *Nucleic Acids Research* 18 (22): 6531–35. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>.
- Yeo, A. R., and T. J. Flowers. 1983. "Varietal Differences in the Toxicity of Sodium Ions in

Rice Leaves.” *Physiologia Plantarum* 59 (2): 189–95. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1983.tb00756.x>.

Yildirim, Ertan, and İsmail Güvenç. 1994. “Salt Tolerance of Pepper Cultivars during Germination and Seedling Growth.” *TURKISH JOURNAL OF AGRICULTURE AND FORESTRY* 30 (5): 347–53.

<https://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/abstract.htm?id=8508>.

Zekri, M. 1993. “Osmotic and Toxic Ion Effects on Seedling Emergence and Nutrition of Citrus Rootstocks.” *Journal of Plant Nutrition* 16 (10): 2013–28.

<https://doi.org/10.1080/01904169309364671>.

Ziauddin, A, E Simion, and K J Kasha. 1990. “Improved Plant Regeneration from Shed Microspore Culture in Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Cv. Igri.” *Plant Cell Reports* 9 (2): 69–72.

Zid, E, and Grignon, C. 1991. “Les Tests de Sélection Précoce Pour La Résistance Des Plantes Aux Stress. Cas Des Stress Salin et Hydrique.” In *L’amélioration Des Plantes Pour l’adaptation Aux Milieux Arides, Deuxièmes Journées Scientifiques Du Réseau Biotechnologies Végétales*, edited by Noureddine Chalbi Yves Demarly, AUPELF-URE, 91–108.

Annexe 1 : Variétés (Seddik *et al.* 2005)

Orge Asni

Année d'inscription : 1984

Origine : **Matériel originaire de CIMMYT**

Type : **deux rangs**

Rendement maximum réalisé : **72qx/ha**

Précocité à l'épiaison : **moyennement précoce**

Hauteur de la plante: **moyenne à courte**

Réactions aux maladies :

- rayure réticulée : **sensible**
- Oidium : **résistante**
- Rhynchosporiose : **moyennement sensible**
- Rouille brune : **sensible**
- Rouille jaune : **sensible**
- BYDV : **sensible**

Verse : **résistante**

Sécheresse : **sensible**

Salinité : **sensible**

Zones de culture préconisées : **Zones favo-**



Poids de mille grains : **41 g**

Poids à l'hectolitre : **moyen**

Rendement à l'extraction : **86.9%**

Taux en farine : **67%**

Taux de protéines : **12%**

β -glucone : **2.8%**



Orge Arig 8

Année d'inscription : **1982**

Origine : **Matériel originaire d'Italie**

Type : **six rangs**

Rendement potentiel : **65qx/ha**

Précocité à l'épiaison : **moyennement tardive**

Hauteur de la plante : **haute**

Réactions aux maladies :

- **rayure réticulée : sensible**
- **Oidium : sensible**
- **Rhynchosporiose : moyennement sensible**
- **Rouille brune : sensible**
- **Rouille jaune : sensible**
- **BYDV : sensible**

Verse : **moyennement sensible**

Sécheresse : **moyennement tolérante**

Salinité : **moyennement sensible**

Zones de culture préconisées : **Zones semi arides et arides**



Poids de mille grains : **45 g**

Poids à l'hectolitre : **élevé**

Rendement à l'extraction : **78.9%**

Taux en farine : **61.2%**

Taux de protéines : **12.6%**



Orge Tamelalt

Année d'inscription : **1984**

Origine : **Matériel d'origine européenne**

Type : **deux rangs**

Rendement maximum réalisé : **65qx/ha**

Précocité à l'épiaison : **moyennement précoce**

Hauteur de la plante: **courte**

Réactions aux maladies :

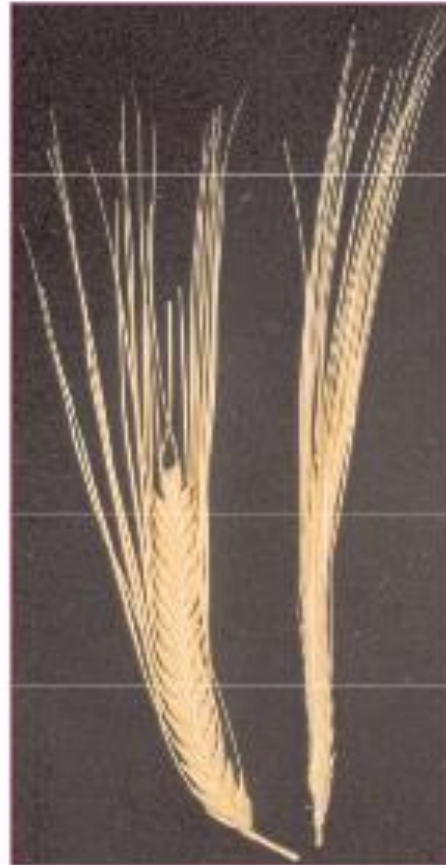
- **royure réticulée : sensible**
- **Oïdium : moyennement résistante**
- **Rhynchosporiose : sensible**
- **Rouille brune : moyennement résistante**
- **Rouille jaune : moyennement résistante**
- **BYDV : sensible**

Verse : **moyennement sensible**

Sécheresse : **moyennement sensible**

Salinité : **tolérante**

Zones de culture préconisées : **Zones**



Poids de mille grains : **44 g**

Poids à l'hectolitre: **moyen**

Rendement à l'extraction : **76%**

Taux en farine : **62%**

Taux de protéines : **12%**

Annexe 2 : Milieux de culture

Tableau 22: Composition des milieux de culture

Composants (mg.L⁻¹)	Milieu d'induction	Milieu de régénération	Milieu d'enracinement
Macro-éléments			
KNO ₃	1900	1900	1900
NH ₄ NO ₃	165	165	165
KH ₂ PO ₄	170	170	170
MgSO ₄ , 7H ₂ O	370	370	370
CaCl ₂ , 2H ₂ O	440	440	440
Source de fer			
FeNa ₂ , EDTA	40	40	40
Micro-éléments			
MnSO ₄ , 5H ₂ O	22,3	22,3	22,3
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8,6	8,6	8,6
CoCl ₂ , 7H ₂ O	0,025	0,025	0,025
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
KI	0,83	0,83	0,83
Vitamines			
Myo-Inositol	100	100	100
Thiamine HCL	0,4	0,4	0,4
Régulateurs de croissance			
ANA	2	-	1
BAP	1	0,4	-
Kinétine		-	-
Autres éléments			
Glutamine	750	750	750
Maltose	60.000	-	-
Sucrose	-	35.000	20.000
Saccharose	-	-	-
Agar	8.000	7.000	7.000
pH	5,6	5,8	5,8

Annexe 3 : Analyse qualitative et quantitative d'ADN

Tableau 23: Dosage spectrophotométrique d'ADN purifié

Génotype	Ratio 260/280	Concentration d'ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
A4	1,99	0,858
A5	2,03	0,800
A6	1,92	1,065
A8	1,89	0,654
AP	1,93	0,246
A G1	1,89	1,777
A G2	2	0,296
Tm P	2	0,249
Tm G1	1,95	0,252
Tm G2	2	0,187
O P	1,9	0,44
O G1	1,97	0,705
O G2	2,05	0,272

A4 : Tamelalt HD 4, **A5** : Tamelalt HD 5, **A6**: Tamelalt HD 6, **A8**: Asni HD 8, **A P**: Asni P, **A G1**: Asni G1, **A G2**, Asni G2, **O P**: Arig P, **O G1**: Arig G1, **O G2**, Arig G2, **Tm P** : Tamelalt P, **Tm G1** : Tamelalt G1, **Tm G2** : Tamelalt G2

Annexe 4 : Amorces

Tableau 24 : Liste des amorces utilisées dans la technique PCR

Nom de l'amorce	Séquence (5' -> 3')	Tm °C	Taux de GC %	Localisation	Référence
HVB23D	F : GGTAGCAGACCGATGGATGT R : ACTCTGACACGCACGAACAC	59,4 59,4	55 55	4 (4H)	(El Soda <i>et al.</i> 2010, Haddad A. El Rabey 2012)
HVGLUEND	F : TTCGCCTCCATCCCACAAAG R : GCAGAACGAAAGCGACATGC	59,4 59,4	55 55	5 (1H)	(Haddad A. El Rabey 2012)
Bmag210	F : ACCTACAGTTCAATAGCTAGTACC R : GCACAAAACGATTACATCATA	59,3 52	41,7 33,3	6 (6H)	(Haddad A. El Rabey 2012, Rustgi <i>et al.</i> 2014)
MGB318	F : CGGCTCAAGGTCTCTTCTTC R : TATCTCAGATGCCCTTTCC	59,4 57,3	55 50	7 (5H)	(Haddad A. El Rabey 2012)
HVA1	F : TGGCCTCCAACCAGAACCAG R : ACGACTAAAGGAACGGAAAT	61,4 53,2	60 40	5(1H)	(Varshney <i>et al.</i> 2007b, von Korff <i>et al.</i> 2008)
LEA	F : ATGGCTCGCTGCTCTTACTA R : TCAGTGAGAGGATCGATTGAAG	59,4 58,4	55 45,5		
RAPD1	CTGCGCTGGA	34	70		(Pakniyat H. 2007)
RAPD2	GAGGGCGGGA	36	80		
RAPD3	GAGCTCGCGA	34	70		
RAPD4	GTCCACAGGG	34	70		(Ali <i>et al.</i> 2007)
RAPD5	ACCCGGTCAC	34	70		
RAPD6	CCAGGAGGAC	34	70		

Annexe 5 : Séquence du gène *HVA1 H.vulgare* (Himalaya)

GenBank: X78205.1 (McColl 1978)

LOCUS X78205, 1804 pb

1 tccaccgaga tgccgacgca catggcggcg acgatcgatt ggcgtccatc ccgtgcatgc
61 tccagtccac cgcaccgcca ccaagtgcaa cccctagct agttaaacca gccagagagc
121 cgcacccaac ttgtgctcgc cggcgtacgt gcacacgcgc cacccttta cacttgttta
181 ttattgcagc ttctegccc cttttggctg cttctctcc cgacatgggc tccatgaca
241 tggcggggct tcgcaaggt acggcggggg agcggcaacg cgtgtcctcc ctacgtggcg
301 gccatgtacg agcaccgceg cgcaacgtgt cccggcgact ctcccgtccg tcccgcctat
361 aaaggccacc cgcgccaate tctctccac aagcagtcga tccattcaa gtgagctaag
421 caacagccta aagcgagtcc gagtgggat tccagttcgt gtttgttga gctagatcgt
481 gagacgaaga tggcctcaa ccagaaccag gggagctacc acgccggcga gaccaaggcc
541 cgcaccgagg tgaccgtcgt ctcttggtg tctatctata ctctgectgc cgcgcgcatg
601 cggcgttct cggcgggtga tctgatatgt tcttctgtat ctgctgggtg agttgcagga
661 gaagaccggg cagatgatgg gcgccaccaa gcagaaggcg gggcagacca ccgaggccac
721 caagcagaag gccggcgaga cggccgaggc caccaagcag aagaccggcg agacggccga
781 ggccgccaag cagaaggccg ccgaggccaa ggacaagacg gcgcagacgg cgcaggcggc
841 caaggacaag acgtacgaga cggcgcaggc ggccaaggag cgcgccgcc agggcaagga
901 ccagaccggc agcgcctcgc gcgagaagac ggaggcggcc aagcagaagg ccgccgagac
961 gacggaggcg gccaaagcaga aggccgccga ggcaaccgag gcggccaagc agaaggcgtc
1021 cgacacggcg cagtacacca aggagtccc ggtggccggc aaggacaaga ccggcagcgt
1081 cctccagcag gccggcgaga cgggtggtgaa cgccgtggtg ggcgccaagg acgccgtggc
1141 aaacacgctg ggcatgggag gggacaacac cagcgcacc aaggacgcca ccaccggcgc
1201 caccgtcaag gacaccacca ccaccaccag gaatcactag acgcatcgt tcgcgttaa
1261 tttccgtcc tttagctgt tttggtcgt cgaggcctt ctacatatt catatttga
1321 tgtttccact cttcatgat tccgctcat ttagtgaag tttgctccg atttgatga
1381 ctgctctg gttctgtaat gagttataat ccatgggctt tgggtgaaat ggataacgag
1441 gacactcgaa ggcggcaata aagttgatg tgategaatt tctgtattt ggtagtgca
1501 atgaaaacat atattgtgt tcatagatag tgtggcctt aaaatatgca aatagtctga
1561 ccctaaaat atgcaaatta gctactgact tcgagacatt gtacatgact taagatgtac
1621 actgactga gacattgtac atgacttaa gatgtacact gaagacatgg tacatgacgc
1681 aaaccaacc attattctc gatacgttt caaggaagac attttttac gatgaatgat
1741 atgttgatag aggtatcata tgttcgtaga tacgttttc tacgattctt agcaggcatg
1801 gtac

Annexe 6 : diversité génétique

Tableau 25: Matrice de distance génétique (distance euclidienne) entre les quatre génotypes d'orge issus de l'androgénèse et les trois variétés d'autofécondation selon la méthode de Ward (1963).

	A4	A5	A6	A8	A P	A G1	A G2	Tm P	Tm G1	Tm G2	O P	O G1	O G2
A4	,000												
A5	4,000	,000											
A6	5,000	4,796	,000										
A8	5,385	4,796	4,472	,000									
A P	5,000	5,196	4,690	4,243	,000								
A G1	5,099	5,099	4,359	3,873	3,873	,000							
A G2	5,196	5,745	4,690	4,243	3,162	3,873	,000						
Tm P	5,099	5,831	4,359	4,359	4,123	4,000	3,873	,000					
TmG1	5,385	5,916	4,899	4,000	4,899	4,123	4,472	3,317	,000				
Tm G2	5,657	5,831	4,796	4,359	4,359	4,000	4,123	3,162	3,606	,000			
O P	6,083	5,385	5,292	5,292	4,899	5,196	5,657	5,196	4,899	4,583	,000		
O G1	5,916	5,385	5,477	5,099	5,292	5,196	5,292	5,385	4,690	5,000	2,828	,000	
O G2	5,568	5,196	5,099	5,657	5,292	5,196	5,657	5,196	5,099	5,000	2,828	2,828	,000

A4 : Tamelalt HD 4, **A5** : Tamelalt HD 5, **A6**: Tamelalt HD 6, **A8**: Asni HD 8, **A P**: Asni P, **A G1**: Asni G1, **A G2**, Asni G2, **O P**: Arig P, **O G1**: Arig G1, **O G2**, Arig G2, **Tm P** : Tamelalt P, **Tm G1** : Tamelalt G1, **Tm G2** : Tamelalt G2

Annexe 7: Séquences alignées du gène *HVA1* des plantes HD et leurs parents d'autofécondation

Asni HD 8 (A8)

Score	Identities	Gaps
1234 bits(668)	668/668(100 %)	0/668(0 %)
Query 1	CGTCGTCTCCTTGGTGTCTATCTATACTCTGCCTGCCGCGCGCATGCGGCGTTGCTCCGG	
60		
Sbjct 555	CGTCGTCTCCTTGGTGTCTATCTATACTCTGCCTGCCGCGCGCATGCGGCGTTGCTCCGG	
614		
Query 61	CGGTGATCTGATATGTTCTTCTGTATCTGCTGGGTGAGTTGCAGGAGAAGACCGGGCAGA	
120		
Sbjct 615	CGGTGATCTGATATGTTCTTCTGTATCTGCTGGGTGAGTTGCAGGAGAAGACCGGGCAGA	
674		
Query 121	TGATGGGCGCCACCAAGCAGAAGGCGGGGCGAGACCACCGAGGCCACCAAGCAGAAGGCCG	
180		
Sbjct 675	TGATGGGCGCCACCAAGCAGAAGGCGGGGCGAGACCACCGAGGCCACCAAGCAGAAGGCCG	
734		
Query 181	GCGAGACGGCCGAGGCCACCAAGCAGAAGACCGGCGAGACGGCCGAGGCCGCCAAGCAGA	
240		
Sbjct 735	GCGAGACGGCCGAGGCCACCAAGCAGAAGACCGGCGAGACGGCCGAGGCCGCCAAGCAGA	
794		
Query 241	AGGCCGCCGAGGCCAAGGACAAGACGGCGCAGACGGCGCAGGCCGCCAAGGACAAGACGT	
300		
Sbjct 795	AGGCCGCCGAGGCCAAGGACAAGACGGCGCAGACGGCGCAGGCCGCCAAGGACAAGACGT	
854		
Query 301	ACGAGACGGCGCAGGCCGCCAAGGAGCGCGCCGCCAGGGCAAGGACCAGACCGGCAGCG	
360		
Sbjct 855	ACGAGACGGCGCAGGCCGCCAAGGAGCGCGCCGCCAGGGCAAGGACCAGACCGGCAGCG	
914		
Query 361	CCCTCGGCGAGAAGACGGAGGCGGCCAAGCAGAAGGCCGCCGAGACGACGGAGGCGGCCA	
420		
Sbjct 915	CCCTCGGCGAGAAGACGGAGGCGGCCAAGCAGAAGGCCGCCGAGACGACGGAGGCGGCCA	
974		
Query 421	AGCAGAAGGCCGCCGAGGCCAACCGAGGCGGCCAAGCAGAAGGCGTCCGACACGGCGCAGT	
480		
Sbjct 975	AGCAGAAGGCCGCCGAGGCCAACCGAGGCGGCCAAGCAGAAGGCGTCCGACACGGCGCAGT	
1034		

```

Query 481 ACACCAAGGAGTCCGCGGTGGCCGGCAAGGACAAGACCGGCAGCGTCCTCCAGCAGGCCG
540
Sbjct 1035 ACACCAAGGAGTCCGCGGTGGCCGGCAAGGACAAGACCGGCAGCGTCCTCCAGCAGGCCG
1094

Query 541 GCGAGACGGTGGTGAACGCCGTGGTGGGCGCCAAGGACGCCGTGGCAAACACGCTGGGCA
600
Sbjct 1095 GCGAGACGGTGGTGAACGCCGTGGTGGGCGCCAAGGACGCCGTGGCAAACACGCTGGGCA
1154

Query 601 TGGGAGGGGACAACACCAGCGCCACCAAGGACGCCACCACCGGCGCCACCGTCAAGGACA
660
Sbjct 1155 TGGGAGGGGACAACACCAGCGCCACCAAGGACGCCACCACCGGCGCCACCGTCAAGGACA
1214

Query 661 CCACCACC 668
Sbjct 1215 CCACCACC 1222

```

Asni P

	Score	Expect	Identities	Gaps
	1238 bits(670)	0.0	675/677(99 %)	2/677(0 %)
Query 1	CGCACCGAGGTGACCGTCGTCTCCTTGGTGGTCTATCTATACTCTGCCTGCCGCGCGCAT	60		
Sbjct 541	CGCACCGAGGTGACCGTCGTCTCCTTGGT-GTCTATCTATACTCTGCCTGCCGCGCGCAT	599		
Query 61	GCGGCGTTGCTCCGGCGGTGATCTGATATGTTCTTCTGTATCTGCTGGGTGAGTTGCAGG	120		
Sbjct 600	GCGGCGTTGCTCCGGCGGTGATCTGATATGTTCTTCTGTATCTGCTGGGTGAGTTGCAGG	659		
Query 121	AGAAGACCGGGCAGATGATGGGCGCCACCCAAGCAGAAGGCGGGGCAGACCACCGAGGCC	180		
Sbjct 660	AGAAGACCGGGCAGATGATGGGCGCCA-CGAAGCAGAAGGCGGGGCAGACCACCGAGGCC	718		
Query 181	ACCAAGCAGAAGGCCGGCGAGACGGCCGAGGCCACCAAGCAGAAGACCGGCGAGACGGCC	240		
Sbjct 719	ACCAAGCAGAAGGCCGGCGAGACGGCCGAGGCCACCAAGCAGAAGACCGGCGAGACGGCC	778		
Query 241	GAGGCCGCCAAGCAGAAGGCCCGGAGGCCAAGGACAAGACGGCGCAGACGGCGCAGGCC	300		
Sbjct 779	GAGGCCGCCAAGCAGAAGGCCCGGAGGCCAAGGACAAGACGGCGCAGACGGCGCAGGCC	838		
Query 301	GCCAAGGACAAGACGTACGAGACGGCGCAGGCCGCGCCAAGGAGCGCGCCGCCAGGGCAAG	360		


```

Query 180  GGACAAGACGTACGAGACGGCGCAGGCGGCCAAGGAGCGCGCCGCCAGGGCAAGGACCA
239
Sbjct 844  GGACAAGACGTACGAGACGGCGCAGGCGGCCAAGGAGCGCGCCGCCAGGGCAAGGACCA
903

Query 240  GACCGGCAGCGCCCTCGGCGAGAAGACGGAGGCGGCCAAGCAGAAGGCCGCCGAGACGAC
299
Sbjct 904  GACCGGCAGCGCCCTCGGCGAGAAGACGGAGGCGGCCAAGCAGAAGGCCGCCGAGACGAC
963

Query 300  GGAGGCGGCCAAGCAGAAGGCCGCCGAGGCAACCGAGGCGGCCAAGCAGAAGGCGTCCGA
359
Sbjct 964  GGAGGCGGCCAAGCAGAAGGCCGCCGAGGCAACCGAGGCGGCCAAGCAGAAGGCGTCCGA
1023

Query 360  CACGGCGCAGTACACCAAGGAGTCCGCGGTGGCCGGCAAGGACAAGACCGGCAGCGTCCT
419
Sbjct 1024  CACGGCGCAGTACACCAAGGAGTCCGCGGTGGCCGGCAAGGACAAGACCGGCAGCGTCCT
1083

Query 420  CCAGCAGGCCGGCGAGACGGTGGTGAACGCCGTGGTGGGCGCCAAGGACGCCGTGGCAAA
479
Sbjct 1084  CCAGCAGGCCGGCGAGACGGTGGTGAACGCCGTGGTGGGCGCCAAGGACGCCGTGGCAAA
1143

Query 480  CACGCTGGGCATGGGAGGGGACAACACCAGCGCCACCAAGGACGCCACCACCGGCGCCAC
539
Sbjct 1144  CACGCTGGGCATGGGAGGGGACAACACCAGCGCCACCAAGGACGCCACCACCGGCGCCAC
1203

Query 540  CGTCAAGGACACCAC 554
Sbjct 1204  CGTCAAGGACACCAC 1218

```

Tamelalt P

	Score	Expect	Identities	Gaps
	1205 bits(652)	0.0	673/682(99 %)	6/682(0 %)
Query	1		CGAGACCAAAGGCCCGCACCAGGAGGTGACCGTTCCTTGGTGTCTATCTATACTCTG	
	60			
Sbjct	528		CGAGACC-AAGGCCCGCACCAGGAGGTGACCGTTCCTTGGTGTCTATCTATACTCTG	
	585			
Query	61		CCTGCCGCGCGCATGCGGGCGTTGCTCCGGCGGTGATCATGATATGTTCTTCTGTATCTG	
	120			
Sbjct	586		CCTGCCGCGCGCATGC-GGCGTTGCTCCGGCGGTGATC-TGATATGTTCTTCTGTATCTG	
	643			
Query	121		CTGGGTGAGTTGCAGGAGAAGACCGGGCAGATGATGGGCGCCACCAAGCAGAAGGCGGGA	
	180			


```

Sbjct 1044 AGTCCGCGGTGGCCGGCAAGGACAAGACCGGCAGCGTCCTCCAGCAGGCCGGCGAGACGG
1103

Query 601 TGGTGAACGCCGTGGTGGGCGCCAAGGACGCCGTGGCAAACACGCTGGGCATGGGAGGGG
660
Sbjct 1104 TGGTGAACGCCGTGGTGGGCGCCAAGGACGCCGTGGCAAACACGCTGGGCATGGGAGGGG
1163
Query 661 ACAACACCAGCGCCACCAAGGACGCCACCACCGGCGCCACCGTCAAGGAC 710
Sbjct 1164 ACAACACCAGCGCCACCAAGGACGCCACCACCGGCGCCACCGTCAAGGAC 1213

```