



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie et Ecologie Végétale

قسم : البيولوجيا و علم البيئة النباتية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : *Biotechnologie et Génomique Végétale*

**Intitulé :**

---

**Aptitude à la callogénèse de dix lignées haploïdes  
doublées de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) à deux rangs.**

---

Présenté et soutenu par : *SENANE Ghada*

Le : 18/07/2019

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** *Mr. BENBELKACEM A.* (Directeur de recherche INRAA Constantine).

**Encadrant :** *Mr. KELLOU K.* (MAA- UFM Constantine 1).

**Examinatrice :** *Mlle. MOUELLEF A.* (MAA- UFM Constantine 1).

*Année universitaire  
2018 - 2019*

## *Remerciements*

*Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères et mon profond respect à Monsieur KELLOUK MAA à l'Université Constantine 1 pour ses orientations, ses conseils et son suivi permanent.*

*J'exprime ma gratitude et ma profonde reconnaissance à Monsieur Benbelkacem A directeur de recherche INRAA Constantine pour sa disponibilité, son aide, ses conseils judicieux et qui me fait l'honneur de présider le jury.*

*Mes sincères remerciements vont à Mlle MOUELLEF. A MAA à l'Université Constantine 1, pour sa sympathie et d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je remercie également Monsieur Belbekri N et Madame chafika ingénieurs de laboratoires de biotechnologie végétale pour leur accueil, disponibilité, et aide ainsi que le reste d'équipe de laboratoire.*

*Enfin mes remerciements vont également à toutes les personnes qui ayant collaboré, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail à mes chères parents RAMDANE et EMBARKA et je l'ai remercié de m'avoir toujours inspiré et accompagné avec amour.*

*Au mémoire de mon ange, ma petite Nabîha tu resteras toujours dans mon cœur*

*A mes frères Anis et Abd'Eraouf ainsi qu'au mes cousines Razane , Rafeh et tout ma famille.*

*A mes adorables amies : Zah, Maïss, Fulla ,Rayu Yussi ,Sabi et Azuri.*

*Aux membres d'association El imen pour les enfants cancéreux vous êtes les Meilleurs !*

*Ainsi qu'au PEUPLE ALGERIEN ...*

## Résumé

300 embryons matures issus de 10 lignées haploïdes doublées d'orge (*Hordeum vulgare* L.) ont été cultivées sur le milieu MS additionné de 2.4-D afin d'induire la callogénèse. Ceux-ci appartiennent à deux groupes, cinq sont à deux rangs avec barbes ordinaires «groupe1» et cinq sont à deux rangs avec barbes hooded (encapuchonnées) «groupe2». La majorité des embryons cultivés présentent une réponse positive à la callogénèse.

Pour comparer la réponse des dix génotypes à la callogénèse différents paramètres sont pris en considération : la durée de gonflement des embryons où on a trouvé que le premier groupe avait une réponse plus rapide (24 h à 48 h) que celle du deuxième groupe (48 h à 72 h), ainsi pour l'initialisation d'induction de callogénèse (4 jours sont enregistrés pour le G1 et 5 jours pour le G2).

Le taux d'induction de cals est supérieur chez le groupe 2 par rapport au premier groupe, soit un taux respectif de 39,3 % et 32,59 %, avec une forte induction de cals chez la lignée 35 à 70%. En revanche la lignée 19 du groupe 1 avait le plus faible pourcentage avec 13.33%.

Contrairement au taux d'induction des cals les moyennes de surface et du poids frais des cals ont montré des résultats similaire par rapport au comportement des cals on a trouvé que le groupe 1 a une moyenne de surface de 26.50 mm<sup>2</sup> et de poids frais de cals à 0.26 g supérieure a ceux du deuxième groupe avec une surface de 24.48 mm<sup>2</sup> et un poids de 0.21 g.

Les cals de la lignée 35 ont les meilleurs résultats vis-à-vis les paramètres testés, l'inverse est constaté chez la lignée 135 qui a répondu négativement à l'induction de la callogénèse qui dépend peut être à l'effet du génotype.

**Mots clés :** Orge, *Hordeum vulgare* L., callogénèse, culture *in vitro* et embryons matures.

## **Abstract**

300 Mature embryos from two groups of doubled barley haploid lines: five are two rows with ordinary beard group 1 and five are two rows with hooded beards group 2 were grown on MS medium supplemented with 2,4-D to induction of callogenesis. The majority of cultured embryos have a positive response to callogenesis.

To compare the response of the ten genotypes to the callogenesis different parameters are taken into consideration: the duration of swelling of the embryos where we found that the first group had a faster response (24h-48h) compared to the second group (48h-72h) and for the beginning of callogenesis induction (4 days for G1 and 5jr for G2).

The rate of callus induction was higher in group 2 than in the first group, i.e. a respective rate of 39.3% and 32.59%, with a strong induction of callus in the line 35 with 70%. In contrast, line 19 of group 1 had the lowest percentage 13.33%.

In contrast to the callus induction rate, the surface and fresh weight of the callus showed similar results with respect to callus behavior. Group 1 was found to have a mean surface area and fresh callus weight respectively. 26.50 mm<sup>2</sup> and 0.26g which was higher than that of the second group with 24.48mm<sup>2</sup> and 0.21g.

The callus of the line 35 have the best results according to the tested parameters, the reverse is found in line 135 which responded negatively to the induction of callogenesis that can be explained by the variance of genotypes.

**Key words:** Barley, *Hordeum vulgare L.*, callogenesis, in vitro culture and mature embryos.

## ملخص:

ثلاثمائة من الأجنة الناضجة أخذت من سلالتين فردانية مضاعفة من الشعير: خمسة منهم ذات صفين عادية وخمسة ذات صفين مغطاة (مقنعة) تم زراعتها في وسط غذائي MS مع إضافة هرمون النمو 2.4-D من أجل تحريض نشوء نسيج لين الكنب، أغلب الأجنة المزروعة أظهر استجابة لهذا التحريض.

لمقارنة استجابة الأنماط الوراثة العشرة لهذا التحريض، اخذنا بعين الاعتبار عدة عوامل: مدة انتفاخ الأجنة، حيث وجدنا أن المجموعة الأولى كانت ذات استجابة أسرع (24 ساعة إلى 48 ساعة) مقارنة بالمجموعة الثانية (48 ساعة إلى 72 ساعة) كما كانت أسرع أيضا في بداية الاستجابة للتحريض (الجيل الأول: اربعة ايام والجيل الثاني: خمسة ايام).

معدل تحريض نشوء النسيج اللين الكنب كان أعلى في المجموعة الثانية 39.3 % منه في المجموعة الأولى 32.59 % مع معدل عالي من التحريض للسلالة 35 بحيث سجلنا 70 % .وفي المقابل، كانت السلالة 19 من المجموعة 1 ذات أدنى نسبة 13.33

على عكس معدلات تحريض نشوء النسيج اللين، أظهرت معدلات مساحة السطح والوزن الطازج للنسيج اللين ، حيث نجد أن المجموعة الأولى تظهر معدل مساحة سطح 26.50 مم<sup>2</sup> و وزن قدر ب0.26 والتي كانت أعلى من المجموعة الثانية بـ 24.48 مم<sup>2</sup> و 0.21 غ.

الانسجة اللينة للسلالة 35 تظهر أفضل النتائج في مختلف العوامل التي تم اختبارها على عكس السلالة 135 والتي استجابت سلبا للتحريض وهذا يمكن تفسيره من خلال تباين الأنماط الجينية.

**الكلمات المفتاحية:** الشعير، استنبات الانسجة اللينة، الاستنبات الاصطناعي ، والأجنة الناضجة.

# **LISTE DES ABBREVIATIONS**

**2,4-D** : Acide 2,4 Dichlorophenoxyacétique .

**AIA** : l'acide indolacétique **AIB** : l'acide indole butyrique .

**ANA** : Acide naphtalène acétique .

**Fig** : figure.

**G1** : groupe 1 (orge à 2 rangs avec barbe ordinaire) .

**G2** : groupe 2 (orge à 2 rangs avec hooded ) .

**HD** : Haploïdes doublées.

**MPF** : moyenne du poids frais.

**MS** :Murashige et Skoog., 1962.

**MSC** : Moyenne de la surface des cals.

**MPF** : Moyenne du poids frais des cals .

**pH** : Potentiel Hydrogène.

# LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Carte géographique du Croissant-Fertile (zone en vert) : aire de domestication de l'orge (*Hordeum vulgare* ssp, vulgare). Source : Feuillet et al., (2008) in Usubaliev (2013) **4**
- Figure 2 :** Structure morphologique et histologique d'une graine d'orge. **6**
- Figure 3 :** Schéma représentatif de deux classes d'orge, à gauche : orge à deux rangs et à droite orge à six rangs. **7**
- Figure 4 :** Schéma des différents stades de développement chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.) (Source : OGTR , 2008). **9**
- Figure 5 :** Production d'orge en volume au niveau mondial de 2008/2009 à 2018/2019 (en millions de tonnes) représenté en histogrammes. Source : statista, 2019 **10**
- Figure 6:** planche représente le matériel utilisé dans l'expérience d'induction de la callogénèse **25**
- Figure 7 :** prise de vue des embryons matures cultivés : a) embryons matures cultivés après 3h d'encensement ; b) embryons misent en culture après 2jours d'inoculation **26**
- Figure 8:** taux d'induction de callogénèse chez les dix lignées en pourcentage observé après 30 jours. **27**
- Figure 9 :** prise de vue montre l'absence d'induction des cals chez la lignée 135 après 30 jours. **28**
- Figure 10:** représentation en histogrammes des moyennes des surfaces des cals chez les lignées étudiées en (mm<sup>2</sup> ) mesuré après un moi d'incubation. **29**
- Figure 11 :** a) cals induits après 30 jours de mise en culture montrant la couleur verte au sommet des cals de la lignée 35; b) jaunissement et réductions de tailles après exposition à la lumière pendant une semaine **30**
- Figure 12:** présentation en histogrammes des moyennes de poids frais des cals chez lignées testées en (gramme) mesurées après une exposition à la lumière durant une semaine. **31**
- Figure 13:** prise de vue des cals: a) début de contamination : 1 = larves de vers , 2 = colonie de bactérie ; b) boîte de Pétri contiens des contamination : 3 = moisissures **32**



# SOMMAIRE

Introduction.....	1
-------------------	---

## Chapitre 1 : Revue bibliographique

<b>I. Généralités sur l'orge.....</b>	<b>3</b>
1. Historique et origine géographique .....	3
2. Origine génétique .....	4
3. Description botanique .....	5
3.1 Morphologie et structure du grain.....	5
4. Classification.....	6
5. Le cycle de développement .....	8
6. Importance économique et production de la culture d'orge .....	9
6.1 Production mondiale .....	9
6.2 Culture d'orge en Algérie .....	10
<b>II. Outils biotechnologiques dans l'amélioration génétique et la création variétale chez l'orge.....</b>	<b>11</b>
1. Technologie de la culture des tissus .....	11
a. La culture de cals : .....	11
b. Fusion de protoplastes : .....	12
c. Embryogénèse somatique : .....	12
d. Haplo-diploïdisation : .....	13
2. Production des haploïdes chez l'Orge.....	14
2.1. Androgenèse.....	14
2.2. Gynogenèse.....	15
2.3. Culture des microspores isolées .....	15
2.4. Croisements interspécifiques.....	16
3. Technologie par les outils moléculaire.....	16
3.1. Transgénèse.....	16
3.2. Création de variétés par mutagenèse.....	17

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

<b>1. Matériel végétal .....</b>	<b>18</b>
<b>2. Méthodes de travail.....</b>	<b>18</b>
2.1 Mise en place de l'expérimentation.....	18
2.2 Choix du milieu de culture .....	19
2.3 Préparation du milieu de culture .....	19

2.4	La composition de notre milieu nutritif.....	19
a.	Les éléments essentiels pour la nutrition minérale des végétaux .....	19
b.	Une source d'énergie (les sucres) .....	20
c.	Composés organiques (Vitamines et acides aminés).....	20
d.	Régulateurs de croissances .....	21
e.	Substances gélifiantes.....	21
2.5	Stérilisation du milieu .....	22
2.6	Stérilisation de la hotte.....	22
2.7	Préparation du matériel végétale .....	22
2.8	Imbibition des grains.....	22
2.9	Désinfection du matériel végétale.....	23
2.10	L'incision des embryons.....	23
2.11	L'ensemencement des embryons.....	23
2.12	Conditions physiques de culture des embryons matures .....	23
2.13	Repiquage des cultures .....	23
2.14	Annotations et observations.....	24
3.	Paramètres morphologiques étudiés .....	24
3.1	Durée nécessaire pour le gonflement des embryons.....	24
3.2	Le taux d'induction des cals .....	24
3.3	La surface des cals .....	24
3.5	Analyse statistique.....	24

### Chapitre 3 : Résultats et discussions

1.	Durée du gonflement des embryons .....	26
2.	Taux d'induction des cals .....	27
3.	Surface des cals.....	28
4.	Poids frais des cals.....	29
5.	Problème de contamination.....	32

Conclusion et perspectives .....	33
----------------------------------	----

Référence bibliographiques.....	34
---------------------------------	----

## ANNEXES

## SOMMAIRE

---

# **INTRODUCTION**

## Introduction

L'orge (*Hordeum vulgare* L.) fait partie des espèces les plus anciennes cultivées, et il a joué un rôle dans le développement de l'agriculture, des civilisations et des différentes sciences telle que l'agronomie et la sélection, il est cultivé et utilisé dans le monde entier. (Ultrich, 2011)

En Algérie la culture de l'orge est pratiquée essentiellement sur les hautes plaines et les zones sèches grâce aux caractéristiques d'orge qui est une espèce très adaptée à la sécheresse. Cette adaptation est liée à un cycle de développement plus court et à une meilleure vitesse de croissance appréciable, en début de cycle (Mossab, 2007).

Suite à cette tolérance, toute relative, l'orge est emblavée dans des régions arides et semi-arides qui se caractérisent par des contraintes assez fortes rendant la culture des blés peu économique (Bouzerzour et *al.*, 1998).

L'augmentation de la production de cette espèce, dans les milieux difficiles, caractérisés par des contraintes abiotiques sévères et même biotiques, passe certes par l'amélioration de l'itinéraire technique, mais aussi et surtout par l'amélioration variétale. (Benmahammed et *al.*, 2010)

Par ailleurs, depuis les années 70, l'effort nationale d'amélioration génétique s'est principalement appuyé sur les méthodes de sélection classique longues et fastidieuses comparativement à certains outils de biotechnologies végétales qui peuvent aider les sélectionneurs et les améliorateurs à perfectionner leurs travaux et résultats en matière de raccourcissement des cycles de sélection. (Ramla, 2017)

Parmi ces outils la technique d'embryogenèse somatique qui permet la reprogrammation d'une cellule végétale pour qu'elle se transforme en embryon, anatomiquement et physiologiquement identique à ceux issus de la reproduction sexuelle. Ainsi que la culture des embryons matures et immatures qui apparaît utile lors des croisements interspécifique et encore la production des haploïdes. (Esteves, 2014)

Pour cela il est important de mettre à profit ces avancées et de développer l'utilisation des tels outils, on les intégrant aux méthodes classiques.

C'est dans ce sens que s'inscrit le présent travail qui vise à étudier la réponse génotypique chez dix lignée haploïdes doublées d'orge à deux rangs avec 2 types de barbes : cinq lignées avec barbes ordinaires et cinq avec barbes hooded (courbées) lors d'induction de callogénèse à partir des embryons matures.

Ce mémoire est structuré en trois chapitres :

Le chapitre I : Représente une synthèse bibliographique qui se base sur des généralités sur l'orge et les outils biotechnologiques qui permettent son amélioration en matière de rendement ou de résistance aux différents stress biotiques et abiotiques.

Le chapitre II : englobe la description du matériel végétal, des conditions de culture et les paramètres d'analyse étudiés pour exploiter ce travail.

Le chapitre III : fait l'objet de traitement et de présentation des résultats obtenus dans ce travail ainsi que leur discussion.

Le mémoire est achevé, par une conclusion et des perspectives.

# ***CHAPITRE I***

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUES**



## I. Généralités sur l'orge

### 1. Historique et origine géographique

*Hordeum vulgare* L. vulgairement appelé l'Orge est probablement la plus ancienne espèce cultivée par l'homme, dont la culture remonte, aux périodes 5000 à 7000 ans avant J.C. (Poehlman, 1985)

Le genre *Hordeum* présente des centres de diversité dont le centre et le sud ouest de l'Asie, dans l'ouest de l'Amérique du nord, dans le sud de l'Amérique du sud et dans la méditerranée. (OGTR, 2008)

Plusieurs espèces sont adaptées aux environnements extrêmes et beaucoup possèdent une tolérance aux conditions froides et salines (Von Bothmer, 1992), le grand groupe des orges cultivées, les recherches entreprises montrent l'existence de deux principaux centres de diversité, l'un appartenant au nord-est de l'Afrique, surtout les régions montagneuses d'Abyssinie (Ethiopie), l'autre se trouvant au sud-est de l'Asie ; c'est là le principal centre des orges nues, des orges sans barbes ou à barbes courtes. (Meunissier, 1926)

Les premiers domestiques jouent un rôle important au cours des centaines ou des milliers d'années de transition humaine d'une chasse et de cueillette à mode de vie agraire dans le «Croissant fertile» du Proche-Orient à partir d'au moins 10 000 ans. Le Croissant fertile est considéré comme le premier d'au moins des sept centres d'origine agricole dans le monde. (Smith, 1998)

Les études archéologiques effectuées en Syrie et en Iraq ont mis en évidence la présence de caryopses d'orge qui datent d'environ 10.000 ans avant Jésus-Christ et que la domestication des orges était plus ancienne que celle du blé. Ainsi, pendant l'antiquité et jusqu'au deuxième siècle avant Jésus-Christ, l'orge était la céréale la plus utilisée pour l'alimentation humaine dans les régions du croissant fertile, d'Europe et du bassin méditerranéen. (Badr et al., 2000) (fig. 1).

Quant aux pays du Maghreb son introduction s'est faite depuis le croissant fertile en passant par l'Egypte (Boulal et al., 2007).



**Figure 1.** Carte géographique du Croissant-Fertile (zone en vert) : aire de domestication de l'orge (*Hordeum vulgare* ssp, *vulgare*). Source : Feuillet et *al.*, (2008) in Usubaliev (2013)

## 2. Origine génétique

L'orge est l'une des premières céréales domestiquées (Rasmusson, 1987) dont les origines remontent à celles de l'agriculture elle-même. Le système génétique est relativement simple, tandis que l'espèce est génétiquement diverse, ce qui en fait un organisme d'étude idéal.

Les parents sauvages des plantes cultivées n'ont pas subi de changements génétiques cruciaux pendant les 10000 ans derniers, des études ont montré que l'orge sauvage (*Hordeum spontaneum*) et l'orge cultivée (*Hordeum vulgare* L.) sont morphologiquement semblables. (Zohary et Hopf, 1993)

Selon Rasmusson (1987), le genre *Hordeum* comprend des espèces diploïdes ( $2n=14$ ) dont les biotypes cultivés comme *Hordeum vulgare*, *Hordeum distichum*, *Hordeum*

*intermedium* et sauvage comme *Hordeum spontaneum*, *Hordeum agriocrithon* et *Hordeum pusillum*.

Parmi les *Hordeum* sauvages, il y a des espèces diploïdes, tétraploïdes et hexaploïdes beaucoup sont pérennes.

L'espèce tétraploïde ( $2n=4x=28$ ) est constituée des biotypes sauvages comme *Hordeum murinum*, *Hordeum bulbosum*, *Hordeum jubatum* et *Hordeum nodosum*.

L'espèce cultivée *H. vulgare* a un génome estimé à environ  $5 \times 10^9$  pb (Arumuganathan et Earle, 1991). Le génome de l'orge a été bien caractérisé par la génétique classique et cytogénétique, plus de 1000 gènes sont connus (Von Wettstein-Knowles, 1992).

Une cartographie comparative entre le génome de l'orge et celui des autres espèces de la famille des Triticeae montre que les chromosomes 1 à 7 de l'orge sont les homologues des chromosomes 7H, 2H, 3H, 4H, 1H, 6H, 5H respectivement, des autres espèces de cette famille (Linde-Laursen et al., 1997). Les preuves moléculaires ont révélé une homologie considérable entre l'orge, le blé et le seigle,

### 3. Description botanique

L'orge est une plante annuelle de 60 à 120 cm de hauteur classé parmi les monocotylédones, qui appartient à la famille des Poacées (Graminées) et au genre *Hordeum* qui comprend 32 espèces. (Baik & Ulrich, 2008)

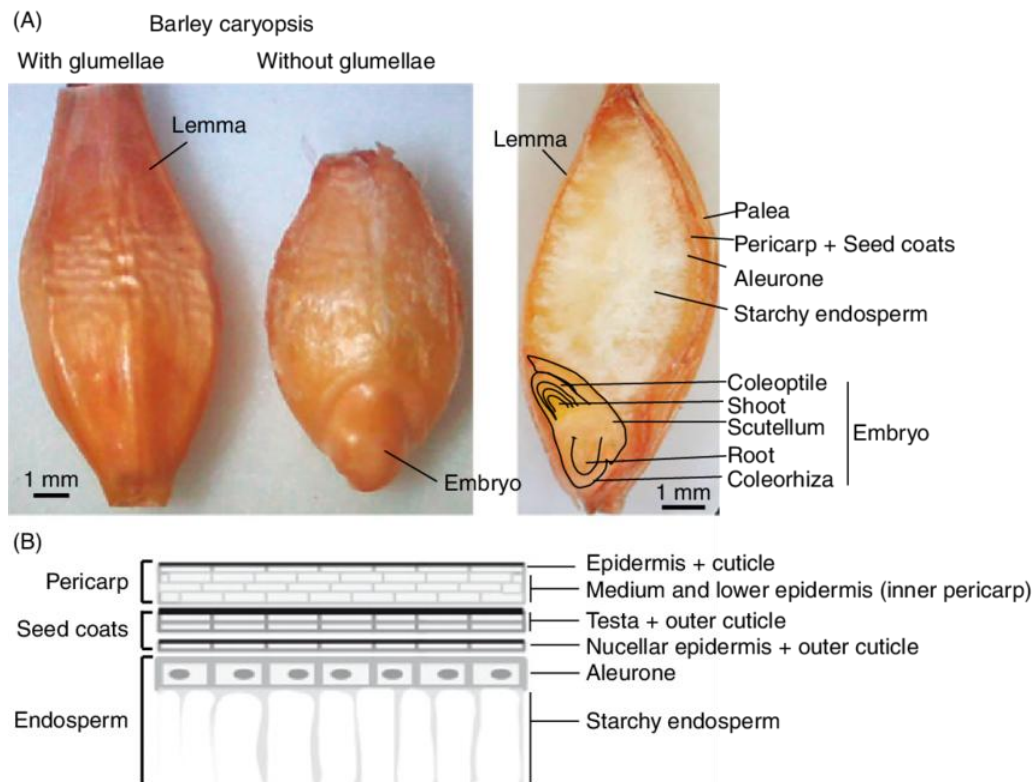
C'est la céréale dont la distribution géographique est la plus vaste, du fait de sa précocité, de son potentiel de productivité en zones arides, tropicales (Bonjean et Picard 1990 ; Ceccarelli et al. 1995).

Ce sont des plantes herbacées qui poussent en touffes, elles sont constituées par les racines, les feuilles, la tige et l'épi dans lequel sont contenues les graines.

#### 3.1 Morphologie et structure du grain

Le grain d'orge est le fruit appelé caryopse, il est caractérisé par la présence d'un sillon, lors de la dessiccation, le grain d'orge se sépare de la tige en restant inséré entre ses enveloppes (glumes et glumelles) on parle de grain vêtu.

La forme du grain varie non seulement en fonction des espèces, mais aussi au sein d'une même espèce comme elle peut varier en fonction de la variété considérée (fig. 2).



**Figure 2 :** Structure morphologique et histologique d'une graine d'orge .

(A) Vue dorsale d'un grain d'orge avec les coques (glumelles) et après élimination manuelle de la lemme et de la paléa. À droite, coupe longitudinale d'un grain d'orge indiquant les principales structures.

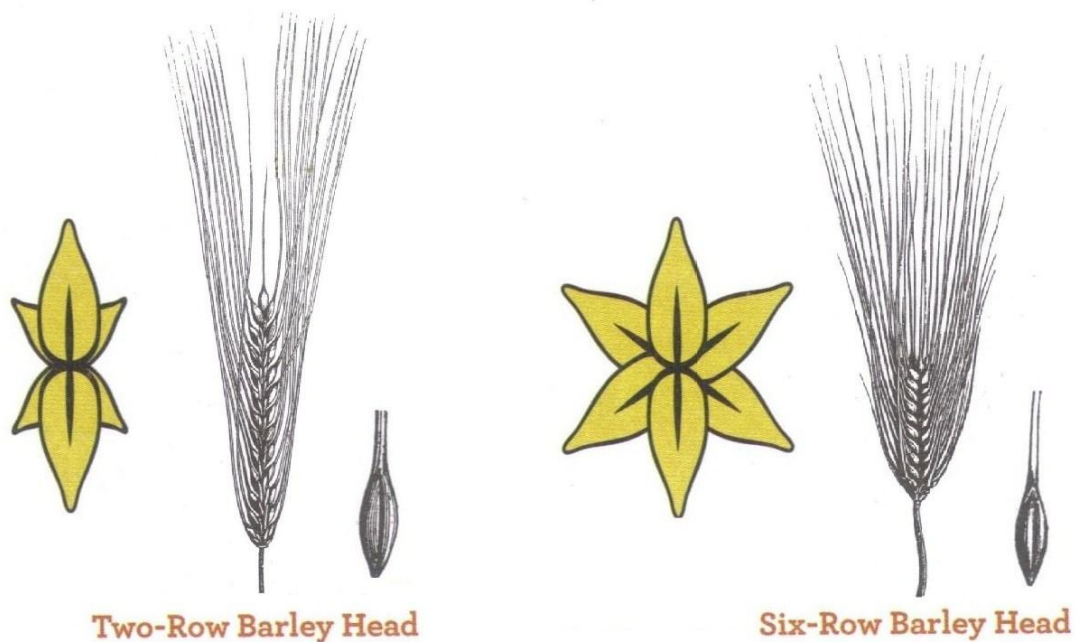
(B) Vue schématique des couches externes d'un caryopsis, y compris le péricarpe, les enveloppes de semences (testa plus épiderme nucellaire, chacune avec une cuticule externe) et la couche d'aleurone (endosperme vivant) au-dessus de l'endosperme amylicé (cellules mortes, avec amyloplastes). Le nombre de cellules pour chacune de ces couches varie selon les espèces (voir texte), de même que la composition et la distribution de divers composés phénoliques dotés de propriétés antioxydantes, pouvant conférer une pigmentation.

#### 4. Classification

Liné (1755), in Grillot (1959), a classé l'Orge selon le degré de fertilité des épillets latéraux, la densité de et la présence ou l'absence des barbes en deux groupes : (fig. 3)

- a. L'orge à 2 rangs ou l'orge distique: a un épi aplati composé de 2 rangées d'épillets fertiles, un sur chaque axe du rachis, entouré de 4 épillets stériles. Dans ce type existent surtout des variétés de printemps dont les épillets médians seuls sont fertiles dont *Hordeum distichum* L. qui a un épi aplati et lâche composé de deux rangées d'épillets fertiles, sur chaque axe du rachis, entouré de 4 épillets stériles.
- b. L'orge à 6 rangs ou orge hexastique : encore appelé exourgeon, à une section rectangulaire, sur chaque axe du rachis les 6 épillets médians et latéraux sont fertiles et qui se subdivise selon le degré de compacité de l'épi en :
- *Hordeum hexastichum* L. (escourgeon) a un épi compact composé sur chaque axe du rachis de 3 épillets fertiles.
  - *Hordeum tetrastichum* L. a un épi lâche composé sur chaque axe du rachis de 2 épillets fertiles.

Dans ce type n'existent pratiquement que des variétés d'hivers (Soltner, 2005).



**Figure 3 :** Schéma représentatif de deux classes d'orge, à gauche : orge à deux rangs et à droite orge à six rangs. Source : Google image.

Quant à Soltner (2005), il classe les orges selon leurs réponse vis-à-vis le climat (sensible au gel ou au contraire résistant au froid environ jusqu'à -15°C) en trois groupes qui sont :

- Les orges d'hiver dont le cycle de développement varie de 240 à 265 jours, s'implantent en automne. Ces orges ont besoin pour assurer leur montaison, de température vernalisante qui manifeste un degré plus au moins élevé de résistance au froid hivernal.
- Les orges de printemps dont le cycle de développement est très court (environ 120 à 150 jours), s'implantent au printemps. Ces orges n'ont aucun besoin de vernalisation pour assurer leur montaison.
- Les orges alternatives qui sont intermédiaires au plan tolérance au froid, entre les orges d'hiver et celles de printemps.

## **5. Le cycle de développement**

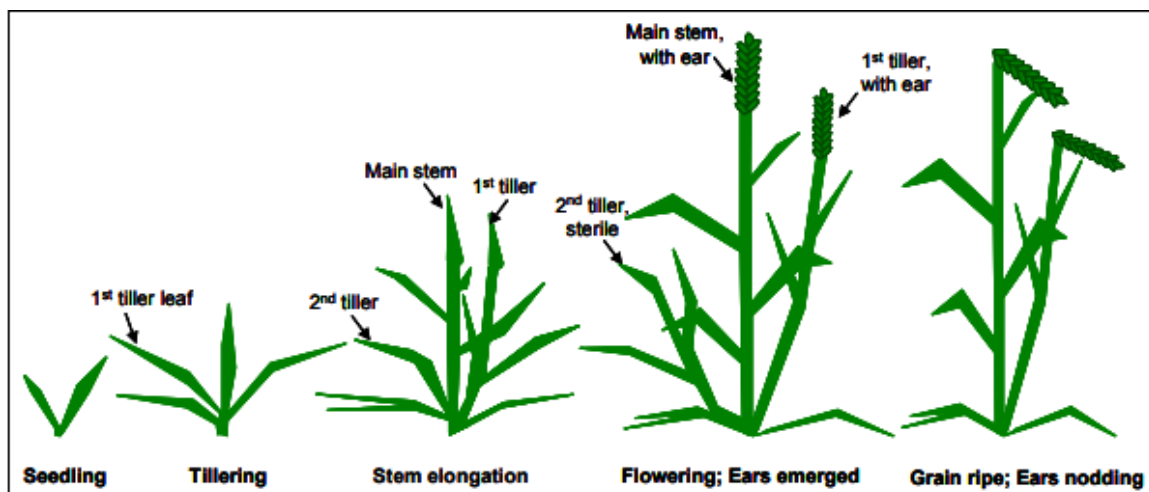
Ces céréales ont un cycle évolutif qui se divise en trois grandes périodes : période végétative, période reproductrice et période de maturation (Slafer et *al.*, 2002).

Les caractéristiques de végétation et de reproduction de l'orge sont voisines de celles du blé selon Jestin (1992) ; les différences les plus marquées concernent :

- une propension plus forte au tallage, avec une paille souvent plus fragile (fig. 5) ;
- un cycle semi maturité souvent plus court ;
- une capacité de survie au froid n'atteignant généralement pas celle des blés ou des seigles.

Soltner (1988), ajoute d'autres différences, comme :

- les exigences en eau sont légèrement plus réduites et surtout importantes au début de la végétation ;
- l'orge tire parti de sols légers et calcaires mieux que le blé.



**Figure 4 :** Schéma des différents stades de développement chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.)  
(Source : OGTR (2008)).

## 6. Importance économique et production de la culture d'orge

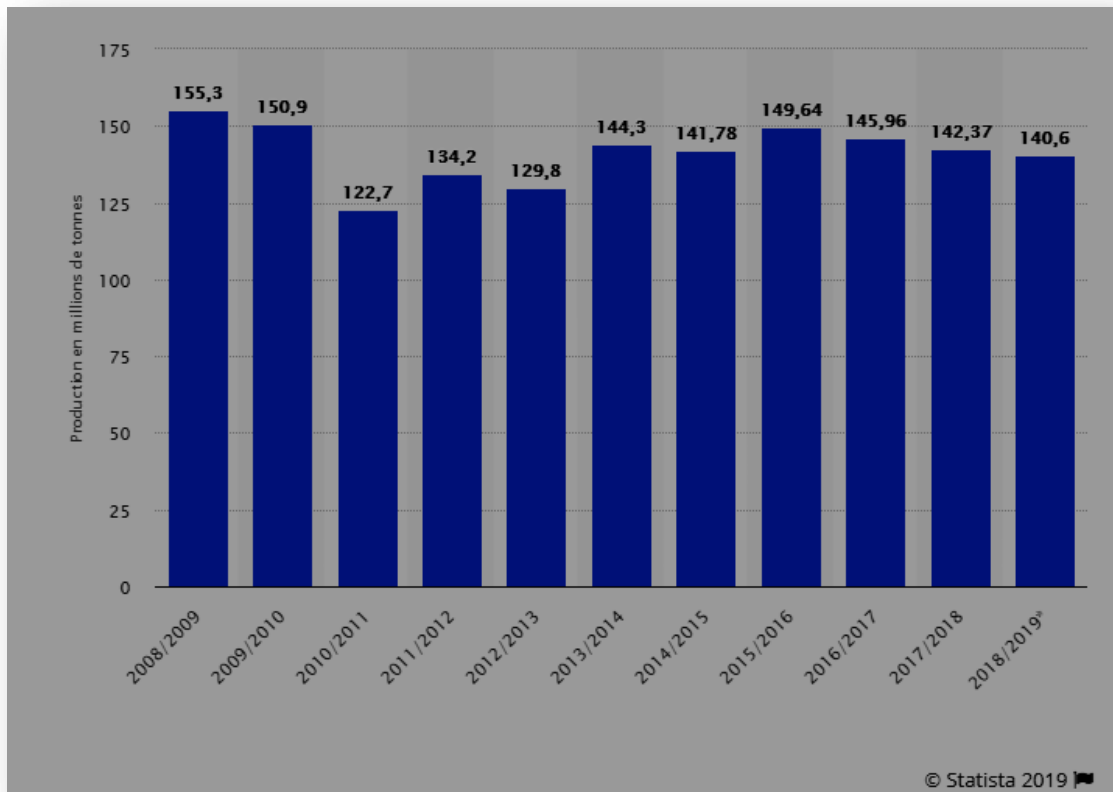
Dans le monde, l'alimentation animale est le principal débouché de l'orge, la deuxième céréale secondaire par ordre d'importance, bien qu'avant les années 1500, la farine d'orge était l'ingrédient principal du pain.

Actuellement, les usages industriels d'orge sont principalement : la fabrication de malt destiné à la brasserie.

### 6.1 Production mondiale

Au plan mondial, selon les statistiques de la FAO, pour la période 2010-2012, la production de l'orge a frôlé les 130 millions de tonnes, et cette culture a occupé une superficie cultivée de 48,4 millions d'hectares. Ceci fait de l'orge la quatrième céréale la plus cultivée au monde, à 5,1 % de la production céréalière mondiale, loin après le maïs (34,3 %), le riz (28,2 %) et le blé (26,6 %)(FAOSTAT, 2013).

Les statistiques de la figure 6 indiquent la quantité d'orge produite dans le monde pendant les années de récolte 2008/2009 à 2016/2017. 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 (STATIS, 2019 ). (fig. 6)



**Figure 5** : Production d'orge en volume au niveau mondial de 2008/2009 à 2018/2019 (en millions de tonnes) représenté en histogrammes. source : statista,2019

## 6.2 Culture d'orge en Algérie

Selon Actualitix, (2014) parmi les pays d'Afrique du nord, l'Algérie occupe la 2<sup>ème</sup> place après le Maroc en matière de superficies récoltées et de production et la 2<sup>ème</sup> place après l'Egypte en matière de niveau du rendement. Sur le plan des échanges commerciaux, l'Algérie représente un pays importateur d'orge. (Anonyme, 2014)

La production nationale céréalière réalisée à l'issue de la campagne 2017-2018 a atteint 60,5 millions de quintaux, contre 34,7 millions de quintaux enregistrés durant la campagne précédente, soit une hausse de 74,4%, selon le bilan de la campagne 2017-2018 présenté par le ministère de l'Agriculture, du développement rural et de la pêche dont l'orge avec 19,5 millions de quintaux (Bouazghi , 2018).

Ces performances encourageantes sont le résultat d'une politique de développement agricole, mise en place depuis 2000, visant essentiellement à l'amélioration substantielle de



l'offre agricole nationale, notamment celle des cultures stratégiques pour faire face aux besoins.

En Algérie, il existe huit variétés d'orge multipliées sur treize variétés autorisées à la production et à la commercialisation. La gamme variétale a connue un changement entre 1994 et 2006, cela s'est traduit par la diminution du nombre de variétés importées, en contrepartie, nous observons une progression des variétés locales (Saida et Tichedrett) avec un taux d'occupation de 89 %, du fait qu'elles sont très appréciées par les agriculteurs (Rachedi, 2003).

En Algérie et dans les zones soumises à une forte variabilité climatique, l'amélioration de la tolérance aux stress reste un objectif de sélection prioritaire.

## **II. Outils biotechnologiques dans l'amélioration génétique et la création variétale chez l'orge**

### **1. Technologie de la culture des tissus**

La culture de tissus fait référencé à la culture *in vitro* de tous types de cultures des plantes, grains, embryons, cellules, protoplastes, organes (pousses, apex, bourgeon, racine, anthères, méristème, ...etc.), appliquée à une grande variété d'espèces végétales, sur un milieu nutritif en conditions aseptiques et contrôlées.

Elle repose sur la capacité des cellules végétales différenciées de passer à un état méristématique dédifférencié puis, à se différencier à nouveau et former une plante entière.

Ces cultures de tissus offrent des vastes champs d'investissement et de manipulation dans le domaine d'amélioration des cultures végétales, on site parmi ces cultures :

#### **a. La culture de cals :**

induit à partir de la culture d'explants de tissu ou organes différencier, le cal est un tissu indifférencié, plus ou moins organisé, utilisé pour la culture cellulaires pour la production de métabolites secondaire ou encore en vue d'une variation somaclonale pour le domaine d'amélioration des plantes (i. sélection des variants aux caractères agronomiques améliorés, cas de l'orge), (pour les caractères rendement en gain, la hauteur, le nombre de talles, ...etc.); et la sélection des variants résistants aux maladies (orge : résistant à la *Rhynchosporiose*) et résistants aux stresses abiotiques (Chawla ,2002).

**b. Fusion de protoplastes :**

Maintenus sur un milieu approprié, ces protoplastes peuvent régénérer leur paroi et se diviser pour donner naissance à un cal puis à une plante entière. L'absence de paroi permet d'induire des fusions entre protoplastes appartenant à des espèces différentes sexuellement incompatibles grâce à des traitements favorisant les fusions. Cette hybridation somatique n'est pas sujette aux problèmes d'incompatibilité qui limitent souvent les croisements traditionnels parmi les applications de cette technique : les travaux de Kisaka, 1997 sur l'hybridation somatique intergénérique du riz (*Oryza sativa* L.) et d'orge (*Hordeum vulgare* L.) par fusion de protoplastes.

**c. Embryogénèse somatique :**

La culture *in vitro* des tissus végétaux est à l'origine de nouvelles formes d'embryogénèse. L'embryogénèse somatique est un processus par lequel les cellules du sporophyte ou gamétophyte donnent naissance, sans fusion gamétique, à des embryons qui passent par des stades embryologiques caractéristique.

L'embryogénèse somatique présente plusieurs avantages par rapport à la micropropagation conventionnelle : Les embryons somatiques peuvent être induits à partir de cellules cultivées en suspension, ce qui rend possible une production en fermenteur et réduit considérablement le coût de production. Les taux de multiplication sont généralement importants et chez certaines espèces, les embryons peuvent être encapsulés et traités comme des graines artificielles (Hamadani,2001).

Les manipulations sont donc simplifiées par rapport à la micropropagation traditionnelle qui nécessite plusieurs milieux différents pour le développement des tiges et des racines et l'obtention de plantules complètes.

Les embryons somatiques connaissent les mêmes stades de développement morphologiques que traversent habituellement les embryons zygotiques à savoir : stade globulaire, cordiforme, torpille et cotylédonaire (Egertsdotter et Arnold, 1998). Ils ont une structure chromosomique souvent semblable à celle de la plante- mère dont ils sont issus (Nuti ranchi, 1995).

Le critère qui permet de reconnaître un embryon somatique est certainement sa structure bipolaire, qui développe précocement et simultanément un méristème caulinaire et un méristème racinaire (Nutri ranchi, 1990). L'embryogénèse somatique emprunte deux voies :

- **L'embryogénèse directe** où les embryons sont initiés à partir de tissus en absence de prolifération de cal. Ceci se produit à partir des cellules pré-embryogéniques déterminées ou les cellules sont déjà engagées et ils ont besoins seulement d'être libérées. Elles semblent préexister dans les tissus de certains explants comme les embryons immatures ou les fragments de très jeunes plantes (Saadi, 1991).

- **L'embryogénèse somatique indirecte**, pour la quelle une prolifération cellulaire est requise. Les cellules embryogénèse apparaissent tardivement au sein du cal produit par la réactivation mitotique des cellules différenciées et/ou la prolifération des cambiums obtenus à partir d'explants de type racines, tige ou de feuille (Jullien, 1991 ; Rugkhla et Jones, 1998). Leurs multiplications aboutissent à la formation de groupes de cellules embryogénèse "nodules méristématiques" dispersés, parmi les autres cellules du cal et qui sont généralement de type parenchymateux (Saadi, 1991).

L'induction de l'embryogénèse somatique chez l'orge, comme dans la majorité des espèces, est affectée par la combinaison phytohormonale dans le milieu de culture. Dans ce contexte, plusieurs études ont montré que l'acide 3,6-dichloro-O- ainsi que (dicamba) convient mieux à l'induction de l'embryogénèse somatique chez l'orge (Chauhan et Kothari, 2004 ; Umet, 2007) et présente une fréquence de régénération plus élevée qu'à l'acide dichlorophénoxyacétique (2,4-D) ou piclorame pour l'induction et le maintien du cal embryogène. (Bouamama, 2011).

#### **d. Haplo-diploïdisation :**

La création variétale est un processus récurrent, dicté par le nombre de gènes impliqués dans les caractères quantitatifs et nécessitant plusieurs cycles de création variétale pour l'apport du progrès génétique. Dans ce processus, la durée des cycles est un élément important à prendre en compte.

L'haplo-diploïdisation est un outil issu des biotechnologies végétales, est le système le plus rapide pour développer l'homozygotie. C'est un puissant outil d'obtention rapide, en une seule génération, de nouvelles lignées pures à 100% d'homozygoties à partir d'hybrides en

ségrégation permettant la simplification et le raccourcissement du cycle de sélection et un gain de temps (Ramla, 2017).

Dans le cadre de l'amélioration génétique de l'orge, trois voies d'obtention des haploïdes doublés sont le plus souvent employées : la culture d'anthères (Davies et Morton, 1998), la culture de microspores isolées, (Bonjean, 1995) et le croisement avec *Hordeum bulbosum* (Picard et al., 1994).

Les travaux de Devaux (Picard et al., 1994), indiquent que la culture d'anthères et la méthode d'*Hordeum bulbosum* seraient d'une efficacité comparable en termes de production de plantes vertes. Par contre, la culture de microspores isolées donnerait une meilleure efficacité en ce qui concerne la production de plantes vertes (Davies et Morton, 1998).

## **2. Production des haploïdes chez l'Orge**

### **2.1 Androgenèse**

La culture *in vitro* des gamétophytes mâles de *Datura* (Guha et Maheswari, 1964) puis le tabac (Bourgin et Nitsch, 1967) a ouvert la voie aux techniques de production des haploïdes actuellement utilisés chez de nombreuses espèces (171 espèces).

Le principe de base est la mise en culture d'étamines ou des microspores isolés à un stade particulier de développement sur un milieu synthétique, ce qui permet une réorientation des microspores vers une succession de mitoses organisées aboutissant *in vitro* à la formation d'un embryon puis d'une plante entière après germination et mise en terre .

Chez l'orge, les anthères sont prélevées le plus souvent au stade de la microspore mi-uninuclée précoce. A travers cette technique, on vise à obtenir une déviation du fonctionnement pollinique : le pollen, au lieu de présenter une division inégale, donnera deux noyaux fils semblables (Augé et al., 1989). Cette modification physiologique est indispensable à l'évolution du pollen vers la formation de calcs ou d'embryons (souvent la calogènes précède l'embryogenèse).

D'après Asakaviciute et al., (2006), le processus d'androgenèse chez l'orge comprend trois étapes : l'induction, pendant laquelle le développement habituel du gamétophyte est bloqué et un programme alternatif (sporophytique) est induit, la culture, pendant laquelle les microspores produisent des structures callogéniques ou embryogéniques, et la régénération,

au cours de laquelle les plantes haploïdes sont régénérées à partir des embryons ou cals androgènes.

L'androgenèse peut conduire à la formation de plantes haploïdes, haploïdes doublées, tétraploïdes et aneuploïdes. Chez l'orge, il se produit un phénomène de dédoublement spontané du stock chromosomique dont la fréquence oscille autour de 70 % à 90 %, (Devaus, 1988). Un marqueur associé au taux de diploïdisation a été trouvé sur le chromosome 4H. Grâce à la culture d'anthères, à partir des gamètes d'un individu hétérozygote, le sélectionneur a la possibilité de régénérer en un cycle une population d'haploïdes doublés.

## 2.2 Gynogenèse

Parallèlement, la culture *in vitro* des ovules non fécondés d'ovaires immatures ou boutons floraux entiers a été utilisée avec succès tout d'abord chez l'orge (San Noeum, 1976) puis chez plusieurs espèces, telles que l'oignon, la betterave à sucre, le concombre, la courge, le gerbera, le tournesol, le blé, l'orge, etc. mais son application en sélection est principalement limitée à l'oignon et à la betterave à sucre.

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, 1976).

Bien que les régénérants gynogénétiques présentent une stabilité génétique supérieure et un taux inférieur de plantes albinos par rapport aux plantes androgénétiques,

## 2.3 Culture des microspores isolées

La culture de microspores isolées, à l'instar de la culture d'anthères, constitue un outil précieux pour l'amélioration des plantes. Comme en culture d'anthère, les épis sont récoltés quand la majorité des microspores sont au stade uninucléé médian. Après la récolte, les épis sont le plus souvent soumis à un prétraitement au froid ou au mannitol. Ils sont ensuite découpés en fragments et placés dans un broyeur contenant une solution de mannitol. L'homogénat est filtré, par la suite, une centrifugation conduit au regroupement des microspores dans un surnageant. Les microspores ainsi isolées sont suspendues dans un milieu de culture liquide. La suspension est alors utilisée pour l'induction des microspores en culture. À partir de la phase d'induction des microspores en culture, les autres étapes de la technique restent identiques à celles de la culture d'anthères (San, 1982).

## 2.4 Croisements interspécifiques

L'utilisation des croisements interspécifiques a principalement servi à introduire un ou plusieurs caractères présents chez une espèce voisine ; la résistance aux parasites est l'exemple le plus courant. Peu d'intérêt était porté aux plantes mâles stériles obtenues, en particulier chez les espèces autogames.

La méthode de croisement interspécifique est puissante et fut développée par Ho et Kasha il y a un peu plus de 40 ans lorsqu'ils ont découvert que certains chromosomes portent des éléments génétiques qui confèrent de l'instabilité génétique en croisements interspécifiques comme, par exemple, entre *Hordeum vulgare* et *H. bulbosum* (Kasha and Kao, 1970).

La technique est relativement simple et utilisée surtout chez l'orge, sous la dénomination de 'méthode *bulbosum*' (Ho and Kasha, 1975). Elle consiste d'abord à polliniser des épis émasculés de *H. vulgare* avec du pollen de *H. bulbosum* et, 12-14 jours plus tard, à récupérer les embryons immatures. Approximativement 65-90 % (Choo et al., 1985; Houben, et al., 2011) des embryons seront haploïdes (plus quelques-uns diploïdes et aneuploïdes) et porteront exclusivement le génome de *H. vulgare*. Le génome de *H. bulbosum* aura été exclu à la suite de la fécondation. Ces embryons haploïdes seront cultivés *in vitro* afin qu'ils complètent leur développement normal. Ensuite, ils seront traités à la colchicine pour doubler leur complément chromosomique et retrouver la condition diploïde qui leur permettra ainsi de devenir des plantes fertiles à maturité.

Au total, selon les deux génotypes parentaux ainsi que les conditions environnementales, entre 10-30 % des fleurs pollinies peuvent former des haploïdes doublées.

## 3 Technologie par les outils moléculaire

### 3.1 Transgénèse

Il s'agit de déterminer et d'isoler des fragments d'ADN de petites tailles, puis de les incorporer dans des génomes d'autres organismes. Cette technique a pu être possible grâce au développement des outils moléculaire et l'évolution des connaissances sur les agrobactéries et le développement des techniques physiques d'électroporation et de la biolistique qui permettent la transformation des cellules végétales. (Varoquaux et pelettier, 2002).

De nombreux programmes ont été développés pour l'amélioration des cultures de colza, maïs, coton et soja. Par contre d'autre culture tell que le blé, l'orge, manioc, banane, etc.) sont encore en cours de recherche. Divers essais des champs sont rapportés telque ceux portant sur les lignées d'orge et de blé génétiquement modifié pour une efficience d'utilisation de l'azote. (Henard et Ricoch, 2014).

### **3.2 Création de variétés par mutagenèse**

Cette méthode de création variétale combinant les techniques de cultures *in vitro* aux traitements physiques (irradiation au cobalt 60) ou chimiques (traitement au méthane sulfonates d'éthyle...etc.) afin de provoquer des mutations est considérée comme une technique rapide et efficace pour l'obtention de nouveaux cultivars aves des caractères désirés dont la tolérance au stress biotique et abiotique. (Anonyme ,2001)

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

- 1/ Rompre des liaisons entres gènes défavorables et gènes favorables ;
- 2/ Associer un gène d'intérêt avec un 'gène marqueur' pour repérer le premier.

Exemple chez l'orge: associer le gène de stérilité mâle avec le gène d'absence de chlorophylle. Variations du nombre des chromosomes (ploïdie): mutations génomiques.

## ***CHAPITRE II***

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**



## Matériel et méthodes

### 1. Matériel végétal

Nous avons utilisé au cours de notre expérimentation des grains de dix géotypes d'orge *Hordum vulgare* L. dont cinq lignées sont à deux rangs avec barbes ordinaires et cinq lignées à deux rangs avec barbes hooded (encapuchonnées), choisies à partir d'une collection de 196 haploïdes doublées obtenu après un croisement d'un parent mâle à six rangs hooded: 6B89.2027//chamico//tradition avec le deuxième parent femelle: Alanda01//Atahualpa/Iraq black à deux rangs ordinaire à l'ICARDA du Maroc dans le but de rechercher des lignées avec un bon rendement et une résistance à la maladie de *Rynchosporium*, nous avons procédé cette expérience afin de tester leurs aptitudes à la callogénèse a partir des embryons matures .

Ces lignées ont été fournis par la station expérimentale de l'INRAA El-Khroub, le tableau ci-dessous montre les lignées utilisées avec leur codes et types de barbes.

**Tableau1** : caractéristiques morphologiques (rang et type de barbe) et le code des lignées d'orge utilisée.

2 rangs ordinaires G1	2 rangs Hooded G2
Lignée 19	Lignée 04
Lignée 40	Lignée 30
Lignée 54	Lignée 35
Lignée 131	Lignée 105
Lignée 188	Lignée 135

### 2. Méthodes de travail

#### 2.1 Mise en place de l'expérimentation

Avant de commencer l'expérience de callogénèse, un traits morphologique a été réaliser pour les 196 lignées de collection selon le type de rang : deux ou six, et le type de barbe : ordinaire ou hooded. Ces lignées ont été classées et conservées pour les futurs essais de la station expérimentale.

L'expérience de callogénèse a été conduite au laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale (GBBV) équipe de Biotechnologie et Amélioration des Plantes à Chaabat EL Rasses de l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 durant la période du 21 mai au 7 juillet 2019.

## **2.2 Choix du milieu de culture**

Les embryons matures ont été cultivés sur le milieu MS (Murashige et Skoog., 1962), fréquemment utilisé pour la culture d'embryons matures et immature d'orge pour l'induction de la callogénèse. Il existe d'autres milieux qui ont été utilisés pour l'induction de callogénèse chez plusieurs espèces végétales comme le milieu B5 (Gamborg et *al.* 1968) et LS (Linsmaier et Skoog., 1965), ce dernier est utilisé pour la culture d'embryons matures chez le maïs et le blé.

## **2.3 Préparation du milieu de culture**

L'asepsie constitue un élément très important qui conditionne la réussite de la culture d'embryons, car certaines irrégularités des résultats, concernant notamment leur survie, semblaient dues à des différences dans les conditions de stérilisation. (Monnier., 1971)

La préparation de milieu de culture est une étape très importante, car il est généralement admis que les erreurs dans la préparation des milieux de culture représentent la source principale de coûteux échecs (Street, 1977).

La composition basale du milieu de culture est habituellement dictée par le type d'explants à mettre en culture, ainsi que par l'espèce végétale en question. (Gamborg et Phillips, 1995)

On a préparé 1.5l de milieu MS, puis il a été écoulé sur 60 boîtes de Pétri contenant un volume de 20ml environ.

## **2.4 La composition de notre milieu nutritif**

### **a. Les éléments essentiels pour la nutrition minérale des végétaux**

Un élément est considéré essentiel lorsque sa carence empêche le végétal de compléter son cycle, et qu'il ne peut pas être remplacé (White and Brown, 2010). Or, sous forme de sels inorganiques, chacun des éléments essentiels est présent dans le milieu de culture. En

fonction de leur abondance relative dans la formulation, ils sont classifiés en macro-éléments : Azote (N), Phosphore (P), Potassium (K), Calcium (Ca), Magnésium (Mg), et Soufre (S), ou micro-éléments : Chlore (Cl), Bore (B), Fer (Fe), Manganèse (Mn), Cuivre (Cu), Zinc (Zn), et Molybdène (Mo). Les solutions mères préparées doivent être stockées au froid (2°C) et à l'obscurité, pour une durée limitée.

Murashige et Skoog (1962) a défini l'équilibre minéral pour ce milieu à partir de travaux sur la croissance des cals de tabac cultivés *in vitro*, il se trouve qu'il donne de bons résultats pour beaucoup de culture (embryons, méristèmes) et pour différentes espèces (blé, orge, etc) (Annexe 1)

### **b. Une source d'énergie (les sucres)**

En conditions de culture des embryons mature, les embryons cultivés sont hétérotrophes, et des hydrates de carbone (sucres) doivent être ajoutés dans le milieu pour soutenir leur croissance et leur développement *in vitro*. En même temps, les concentrations des sucres jouent un rôle dans la régulation du potentiel osmotique du milieu. Le saccharose constitue en général la meilleure source de carbone et on l'apporte à la concentration de 20 g/l or qu'on a utilisé aussi le Myo-inositol comme source d'énergie et pour son rôle lors de la croissance et du développement des cals.

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

### **c. Composés organiques (Vitamines et acides aminés)**

La croissance et le développement des explants peuvent être améliorés par l'ajout de vitamines, d'acides aminés, et d'autres substances organiques non-spécifiques (Gamborg, 1986). Parmi ces dernières on a utilisé : la Thiamine-HCl 1ml, la Pyridoxine-HCl 5, la Glycine 20 et l'acide Nicotinique 5. Il a été démontré par plusieurs chercheurs, que l'emploi de diverses vitamines dans un milieu de culture favorise le développement des cultures *in vitro*.

Comme il peut être long et fastidieux de peser les produits nécessaires à chaque préparation du milieu, l'utilisation des solutions mères dont les ingrédients sont incorporés au préalable est recommandée

#### **d. Régulateurs de croissances**

Les régulateurs de croissance sont décrits comme une collection non-apparentée de petites molécules dérivées de divers processus métaboliques essentiels à travers lesquelles la croissance et le développement des plantes sont régulés. Chez les végétaux, on connaît actuellement 5 groupes de phytohormones (régulateurs de croissance) qui agissent principalement sur la division cellulaire (donc la croissance de la plante) et leur différenciation (la formation de divers organes). L'effet des hormones dépend à la fois de leur concentration, de leur site d'action, du stade de développement de la plante ainsi que de leur concentration relative (une hormone pouvant inhiber le rôle d'une autre).

Ces substances sont utilisées à des doses faibles qui varient entre  $10^{-2}$  mg/l et  $10^{-3}$  mg/l, mais elles sont d'une importance considérable.

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

Les régulateurs de croissances ne sont pas solubles dans l'eau, ils sont préalablement solubilisés dans des solvants appropriés NaOH, éthanol et le méthanol.

La plupart des travaux relatifs à l'induction des cals embryogénèse à partir d'embryons matures et immatures rapportent l'utilisation du 2,4-D à l'ordre de 2 mg/l, plusieurs auxines comme l'AIA et l'ANA et des cytokinines comme la KIN et le BAP ont été également employés. Afin d'induire la callogenèse nous avons utilisé le 2.4-D.

En revanche, les milieux contenant les substances de croissance seront conservés de préférence au froid.

#### **e. Substances gélifiantes**

On a utilisé l'agar à 8 g/l, c'est une substance extraite des algues marines appelés agar-agar ou gélose, elle se dissout à 100° C, et donne un gel transparent au-dessous de 40° C.

Après avoir mélangé les différentes quantités requises d'agents actifs pour chacune des formulations du milieu de culture, le pH est ajusté à 5,7 avec du NaOH (0.5 N) sous agitation permanente, on ajoute graduellement sur une plaque chauffante les sucres et

l'agar d'une manière uniforme à la solution préparée jusqu'à ébullition où la plupart des moisissures et des levures seront détruites.

## **2.5 Stérilisation du milieu**

La stérilisation des produits qui contiennent de l'eau ne peut être obtenue qu'en chaleur humide et sous pression. La simple ébullition ne suffit pas : les spores des bactéries et des moisissures résistent à 100° C. L'utilisation d'un autoclave permet d'obtenir en atmosphère de vapeur d'eau des températures de 120° C sous pression (1 bar). La stérilisation est obtenue en maintenant ces conditions pendant 20 minutes. C'est la vapeur d'eau sous pression qui stérilise et l'eau à ébullition. Le flacon contenant le gel nutritif à stériliser est placé dans un panier au dessus de l'eau.

Après avoir stérilisé le milieu on laisse les flocons se refroidissent après on rajoutes les vitamines par microfiltration ( $\varnothing$  0.2  $\mu$ m).

## **2.6 Stérilisation de la hotte**

Avant chaque manipulation, on doit nettoyer on d'abord la hotte avec l'hypochlorite de sodium commercial (10%) puis on vaporise à l'éthanol (70%) à l'intérieur des parois et la surface de travail ainsi que tout le matériel de travail et les instruments nécessaires. La stérilisation est complétée en lavant les autres paillasses, sol...etc., on place au centre du plan de travail désinfecté le bec Bunsen. A proximité du bec Bunsen, on place une boîte de Pétri stérile et un stérilisateur à billes pour faire plonger le matériel en acier (pince et scalpel) après chaque utilisation.

## **2.7 Préparation du matériel végétale**

Les précautions exigées pour maintenir l'asepsie des cultures de tissus sont d'un ordre supérieur car elles sont sans défense.

La difficulté de stérilisation tient de la nécessité absolue de la destruction totale des micro-organismes par les produits employés sans que les cellules de tissus (qui sont au moins aussi sensible que les bactéries et aux champignons) soient abîmés.

## **2.8 Imbibition des grains**

50 grains matures de chaque lignée, ayant séjournés pendant 18 heures dans l'eau distillée stérile pour faciliter la dissection par la suite.

Il faut prendre en considération que les grains risquent de germer si on les laisse plus de 18 heures dans l'eau, et la lumière pour cela on a pris 4 jours pour terminer les 10 lignées.

### **2.9 Désinfection du matériel végétale :**

Les grains sont plongés dans de l'éthanol à 70% pendant 30s en agitant fortement afin de dissoudre les substances cireuses pouvant imprégner leur tégument, ensuite ils sont débarrassés de l'éthanol par lavage à l'eau distillée stérile.

Les caryopses égouttés sont immergés dans une solution d'hypochlorite de sodium commerciale à 10% diluée 2 fois pendant 20 minutes sous une hotte à flux laminaire, en agitant fortement, suivi de 5 à 6 rinçages successifs à l'eau distillée stérile.

### **2.10 L'incision des embryons**

L'incision est réalisée près du bec Bunsen au niveau de la face dorsale du coté opposé à la brosse à l'aide d'une pince et d'un bistouri stérile. L'incision fait ressortir l'embryon suspendu à l'albumen, il est tout de suite récupéré à l'aide d'une autre pince stérile et déposé sur le milieu de culture approprié de façon à ne pas l'endommager.

### **2.11 L'ensemencement des embryons**

L'ensemencement des embryons est réalisé sous la hotte près du bec benzène, les embryons sont disposés de part et d'autre à raison de dix embryons par boîte de Pétri, afin d'éviter tout risque de contamination, chaque lignée possède trois répétitions (30 embryons ont été mise en culture pour chaque lignée) .Les embryons sont déposés de façon à ce que le scutellum soit bien en contact avec le milieu de culture.

### **2.12 Conditions physiques de culture des embryons matures**

Les boîtes de Pétri ensemencées contenant les embryons matures sont scellées par la parafilme et placées dans une chambre de culture à une température de  $25^{\circ}\text{C}\pm 2$  environ dans l'obscurité.

### **2.13 Repiquage des cultures**

En cas de contamination, on procède aux repiquages des cals sains sur un milieu MS de même composition dans des nouvelles boîtes de Pétri.

## 2.14 Annotations et observations :

Chaque trois jour, on procède à une observation et une prise de vues de nos cals.

## 3. Paramètres morphologiques étudiés

### 3.1 Durée nécessaire pour le gonflement des embryons

Pour ce paramètre on a basé sur une observation morphologique de l'ensemble des embryons cultivé lors de gonflement de ces derniers

### 3.2 Le taux d'induction des cals

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

$$\%IC = \frac{\text{nombre des embryons induisant des cals}}{\text{nombre totale des embryons inoculés}} \times 100$$

### 3.3 La surface des cals

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

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

On a utilisé un application Apk ImageMetre pour faciliter les mesures de la surface pour chaque cal induit.

### 3.4 Le poids frais des cals

Le poids frais des cals: a été déterminé en pesant les cals immédiatement après avoir les retirés des boites de Pétri.

### 3.5 Analyse statistique

Le traitement des données concernant la surface et le poids frais des cals a été réalisé à l'aide de l'outil EXCEL- One-Way ANOVA Analysis Toolpack selon la procédure

ANOVA. Lorsque la valeur de la probabilité P est inférieure à 5 %, l'analyse est basée sur la comparaison de moyennes à l'aide d'un test de Duncan (au seuil de 5 %).



**Figure 6 :** planche représente le matériel utilisé dans de l'expérience d'induction de la callogénèse : **a)** les 4 types d'orge de la collection des lignées HD ; **b)** solutions mères des éléments composant le milieu de culture MS utilisé lors d'induction des cals ; **c)** pH mètre pour ajuster le pH du milieu nutritif ; **d)** hotte à flux laminaire utilisé pendant l'expérience ; **e)** autoclave à pression pour la stérilisation du milieu ; **f)** organisation du plan de travail lors de l'incision des embryons ; **g)** extractions des glumelles par la pince pour faciliter l'obtention des embryons ; **h)** biote de Pétri scellée par le parafilme et marquée après l'ensemencement des embryons sur le milieu de culture MS ; **i)** balance de précision pour la pesée des cals frais.



## ***CHAPITRE III***

# **RÉSULTATS ET DISCUSSIONS**

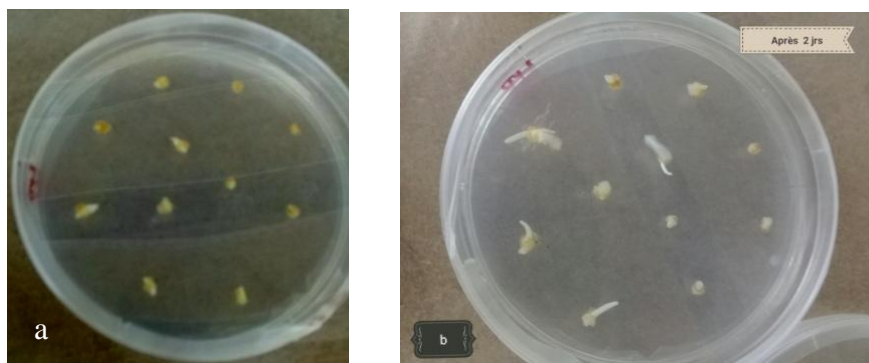
### III Résultats et discussions

#### 1. Durée du gonflement des embryons

L'action favorable de concentration auxinique du milieu de culture (2.4.D) se traduit dès la mise en culture des embryons matures et concerne la totalité des génotypes. En effet, les embryons des lignées avec barbe ordinaire cultivés sur ce milieu réagissent les premiers pour le gonflement du scutellum et qui a lieu en 24 à 48 heures seulement en moyenne.

Chez les génotypes du groupe 2 les lignée avec barbe hooded la durée de gonflement varie entre 48h et 72h.

Il est utile de rappeler, dans notre cas, que la présence du 2,4-D favorise considérablement la callogénèse. A ce sujet, de nombreux travaux rapportent l'efficacité du 2,4-D, employé seul ou en association avec une cytokinine, vis à vis de la callogénèse (Sanghamitra et Sumitra, 1998 ; Jayasree, 2001).



**Figure 7** : prise de vue des embryons matures cultivés : **a)** embryons matures cultivés après 3h d'encensement ; **b)** embryons misent en culture après 2jours d'inoculation

Cette différence dans les réactions des scutellums, peut être attribuée d'une part à l'état physiologique des embryons en particulier les taux de réserves qui sont plus concentrés chez les embryons matures, se traduisant ainsi par la précocité du gonflement (Kammoun et Daaloul., 1990).

## 2. Taux d'induction des cals

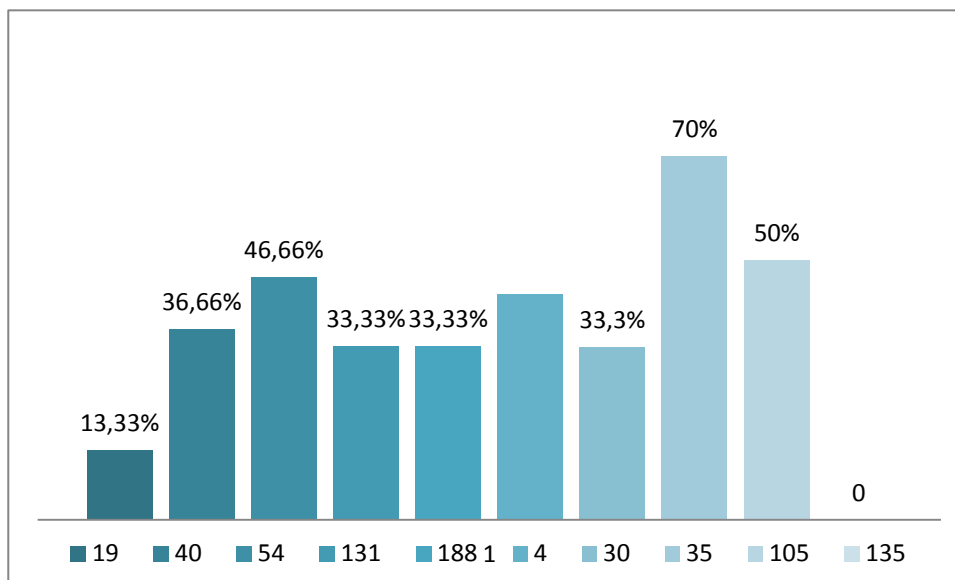
Pour l'induction de cals, on note que tous les embryons cultivés sur ce milieu induisent la cal en premier, mais le temps d'initiation paraît plus court chez les génotypes de groupe 1 (4jours) que chez les génotypes du groupe 2 (5jours).

Le pourcentage de callogénèse du groupe 1 (avec une moyenne de 32.59%) est inférieure à celui du groupe 2 (avec une moyenne de 39.33 %).

Comme il est montré sur la figure 8, les lignées du G1 qui ont une barbe normale, le taux minimal de 13.33% observée chez la lignée 19, et le taux maximal de 46.66% est enregistré chez la lignée 54.

D'autre part, le groupe 2 des orges à deux rangs avec barbe hooded a un taux maximal d'induction des cals observé chez la lignée 35 avec ou 70% des embryons misent en culture ont induit des cals. (fig.8)

Les trois lignées 131, 188 et 30 présentent des taux similaires d'induction des cals avec 33.33%.



**Figure 8:** taux d'induction de callogénèse chez les dix lignées en pourcentage observé après 30 jours.

La lignée 135 n' a pas développés de cals, ainsi que d'autres embryons pour le reste des lignées ceci est principalement dû à l'indifférenciation cellulaire et à l'incapacité des cellules à exprimer leur totipotence (Kammoun et Daaloul., 1990). (Fig.9)



**Figure 9** : prise de vue montre l'absence d'induction des cals chez la lignée 135 après 30 jours.

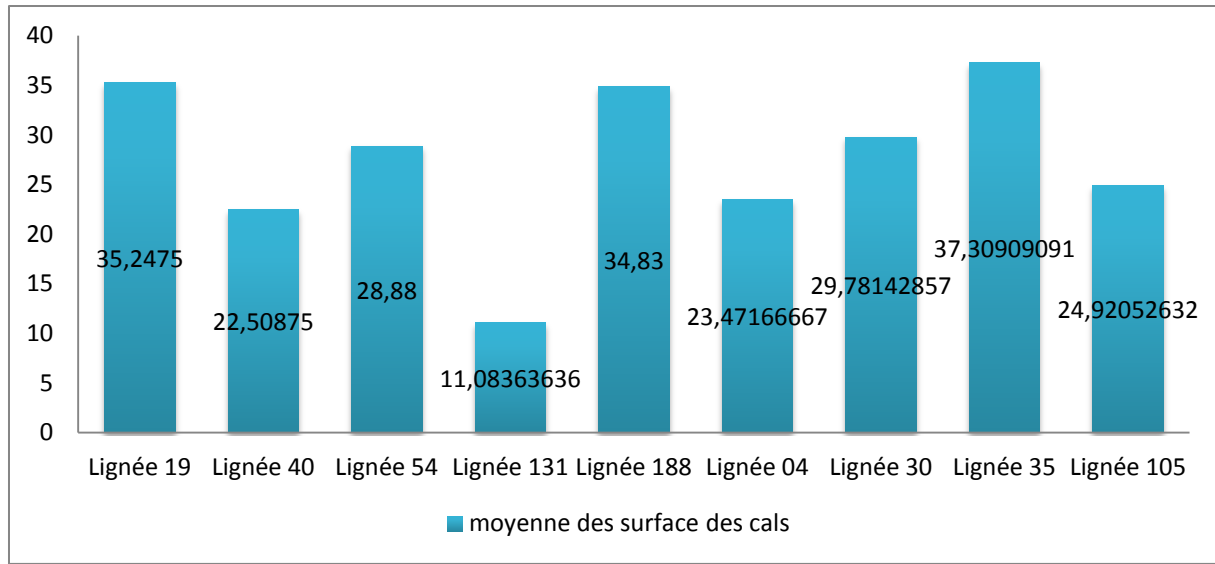
Pour les parametres suivant on a procédé à une analyse statistique ANOVA pour s'assurer de signification des résultats et pour pouvoir interpréter ces résultats les tableaux en annexe montre les probabilité à 5%.

### 3. Surface des cals

Généralement la surface des cals nous indique sur le taux de développement et de croissance de ces derniers.

On a mesuré la surface des cals des lignées HD d'orge après un mois d'incubation, dans le but de comparer la réponse des dix lignées à la callogénèse par rapport a ce facteur.

D'après la figure 10 qui montre les moyennes de surface des cals (MSC) des lignées HD testées, on note que la lignée 19 a la moyenne la plus élevé dans le G1, d'autre part la MSC de la lignée 131 était la plus faible par rapport aux lignées du même groupe.



**Figure 10:** représentation en histogrammes des moyennes des surfaces des cals chez les lignées étudiées en (mm<sup>2</sup>) mesuré après un moi d'incubation.

Dans le deuxième groupe la MSC de la lignée 35 est la plus élevée ; et celle de la lignée 04 est la plus faible par rapport aux lignées du 2ème groupe.

La lignée 135 qui n'a aucune induction des cals on marque une moyenne des cals nulle.

Le groupe 1 a une moyenne de surface des cals (26.50 mm<sup>2</sup>) supérieure de celle du groupe 2 (24.49 mm<sup>2</sup>) ; les cals du premier groupes sont mieux développés en surface malgré que ce groupe avait un taux faible d'induction de callogénèse .

#### 4. Poids frais des cals :

Après l'exposition des calls à la lumière durant une semaine, on remarque une déviation de couleur et réduction de la taille des cals. Certains ont transformé partiellement de la couleur blanchâtre (L19, L105, L131, L04, L30 et L35) au couleur verte, d'autre ont été déshydratés et ont devenu jaunes (un peu marron) avec réduction de leurs taille. (Fig.11)



**Figure 11 :** **a)** cals induits après 30 jours de mise en culture montrant la couleur verte au sommet des cals de la lignée 35; **b)** jaunissement et réductions de tailles après exposition à la lumière pendant une semaine.

La figure 12 résume les résultats obtenus après la mesure du poids frais des cals des dix lignées testées.

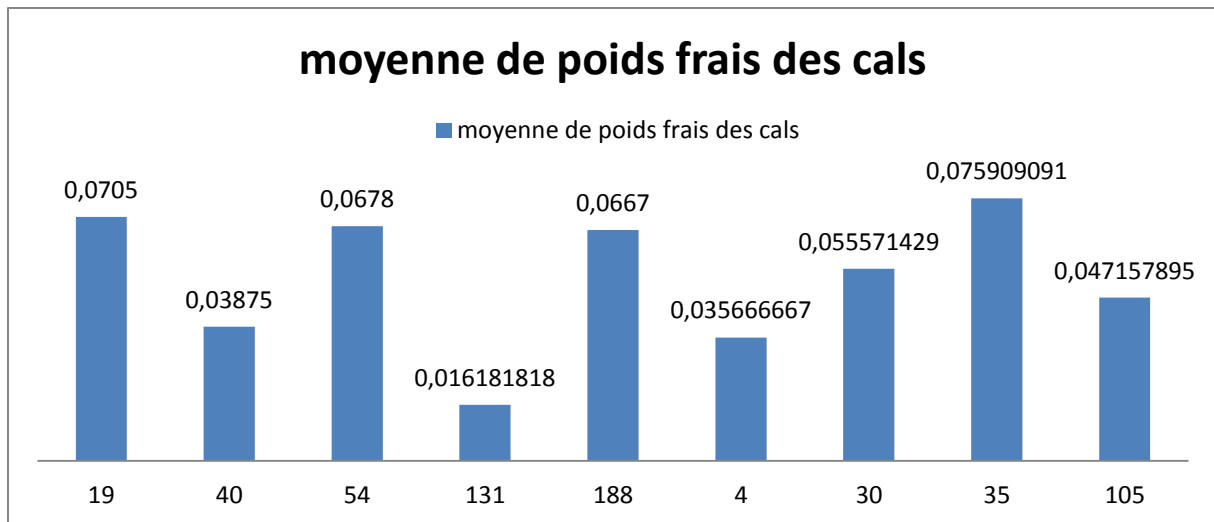
Pour le groupe 1 des lignées à barbe ordinaire on note que la lignée 19 présente la valeur la plus élevée du moyenne des poids frais (MPF) avec (0.07g), par contre la lignée 131 a une MPF très basse par rapport aux autres lignées du même groupe.

Comme il est indiqué sur la Fig.12 le meilleur développement en biomasse était observé chez la lignée 35 qui apparaît au groupe 2 avec (0.75g), elle possède une forte capacité d'induction de cals d'après la mesure précédente qui a été traduite par une moyenne de poids frais des cals supérieure à celles des lignées testées dans cette expérience.

L'absence de présentation de la lignée 135 en histogramme dans la figure 12, s'explique par le taux d'induction qui été nul.

Pareille pour les résultats des moyennes de surface des cals, la moyenne de poids frais des cals du premier groupe (0.26 g) est supérieure à celle du groupe 2 (0.21g)

Dans notre cas en maintenant le même milieu de culture et les mêmes conditions environnementales, ces résultats peuvent être expliqués par la présence d'un effet génotype sur le développement en masse des cals.



**Figure 12:** présentation en histogrammes des moyennes de poids frais des cals chez lignées testées en (gramme) mesurées après une exposition à la lumière durant une semaine.

Les différences des taux de callogénèse observées chez les cinq génotypes pour un même groupe d'explant ont indiqué que la constitution génétique est également un facteur important affectant l'efficacité d'induction des cals, cette différence de réactivité entre génotypes ayant été signalée par de nombreux auteurs .

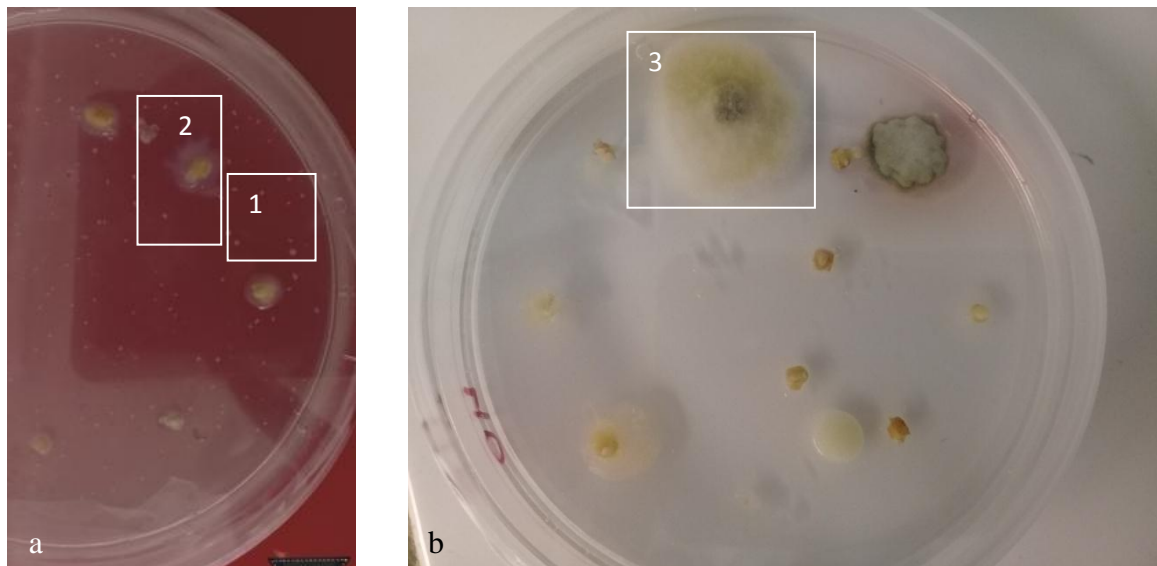
Il est remarquable d'après les mesures du poids frais et de surface des cals qu'il y a une corrélation entre ces deux paramètres, on constate que chez toutes les lignées à l'exception de la lignée 54, les histogrammes de la MSC et du MPS sont très similaires. On peut dire qu'il existe une relation proportionnelle positive entre la surface et le poids des cals.

Cela est légèrement différent pour la lignée 54 on remarque qu'elle a une moyenne de surface des cals moins élevées par rapport à celle du poids frais. Cela peut être expliqué par le type des cals volumineux qui sont compacts donc ils se développent verticalement ce qui ne demande pas une grande surface. (Annexe 2)

## 5. Problème de contamination

Dès les premiers jours après l'inoculation on a observé l'apparition de contamination sur la majorité des boites de Pétri ça concerne des colonies de bactéries, des moisissures avec des larves de vers qui ont été développées au dessous du milieu de culture coulé dans les boites comme il est montré dans la figure 13

Notant que le milieu de culture MS était stérilisé et on a respecté les conditions d'asepsie de la culture *in vitro*, on suggère que les boites de Pétri étaient la source de contamination qui a probablement réduit le taux d'induction et/ou empêche le développement de certains cals.



**Figure 13:** prise de vue des cals: **a)** début de contamination : 1 = larves de vers, 2 = colonie de bactérie ; **b)** boite de Pétri contiens des contaminations : 3 = moisissures

Pour cela on a procédé à des repiquages pour les lignées endommagées pour récupérer les cals sains. (Annexe 3)



# **CONCLUSION**

## Conclusion et perspectives

Lors de ce travail qui vise à étudier la réponse de dix lignées d'orge vis-à-vis l'induction de la callogénèse, on a obtenu des résultats plus au moins significatives.

Les résultats obtenus au cours de cet essai, en matière d'induction de la callogénèse ont montré que le matériel végétal utilisé : les lignée haploïdes doublées de l'orge à deux rangs ordinaire et à deux rangs hooded répond positivement à la callogénèse , à l'exception de la lignée 135 qui n'a présenté aucune réponse .

Les réactions des lignées du premier groupe (orge avec barbe ordinaire) était plus précoces que celles du deuxième groupe, tant pour le gonflement du *scutellum* que pour l'initialisation d'induction de cals. Par ailleurs, l'acquisition de la compétence à la callogénèse est dépendante du génotype.

Pour la mesure du taux de la callogénèse on a constaté une variance entre les lignées où la lignée 35 avait le taux le plus élevé (70%) parmi les autres génotypes étudiés par contre les embryons cultivés de la lignée 135 n'avaient aucune réponse à la callogénèse dans ce milieu.

Les mesures de moyenne des surface et des poids frais des cals ont montré que la réponse des lignées est similaire pour ces deux paramètres, on a trouvé que la surface des cals a une relation positivement proportionnel avec le poids frais, les mêmes lignées qui ont des moyennes élevées en surface des cals, ont monté un bon développement en biomasse. Dans le même concept une légère différence de comportement a été marquée chez la lignée 54 où on a remarqué que ses cals ont une biomasse élevée alors que leur surface n'était pas assez importante.

D'autre part, l'incubation de l'ensemble des embryons dans les mêmes conditions environnementales avec l'utilisation du même milieu de culture a permit de confirmer l'existence d'une variation dans la réponse de chaque génotype, ce qui est propre à l'effet génotypique des lignées.

Ce travail peut être compléter par un suivi d'embryogenèse somatique et la régénération de ces cals en association avec la sélection *in vitro* pour la résistance à la maladie de *Rynchosporium* ainsi que pour le rendement par la suite, cela permet d'accélérer encore le temps d'obtention et de multiplication des lignées pures après fixation des caractères, il parait utile d'intégrer ce processus de sélection pour les programmes nationaux d'amélioration pour les culture aussi stratégiques que les céréales.

**RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques :

**Agnès E. Ricroch, and Marie-Cécile Hénard-Damave.**,(2014) . Next biotech plants: new traits, crops, developers and technologies for addressing global challenges. Crit Rev Biotechnol, Early Online: <http://informahealthcare.com/eprint/qA9vp4ZS5JrXKhPIcxUd/full> Crit Rev Biotechnol, Early Online: 1–16.

**Anonyme.**, (2001). Information sur des aliments nouveaux biotechnologie alimentaire blé tolérant l'imidazolinone. <http://www.hcgc.ca>

**Arumuganathan et Earle.**,(1991).Nuclear DNA content of some important plant species In:Plant Molecular Biology Reporter August, Volume 9, Issue 3, pp 208–218

**Badr.A ,K. Muller, R. Schafer-Pregl, H. El Rabey, S. Effgen, H. H. Ibrahim,C. Pozzi, W. Rohde, and F. Salamini** .(2000). On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*). In: \*Faculty of Science, Botany Department, Tanta University, Tanta, Egypt; Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Cologne, Germany; and Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute, Menoufiya University, Sadat City, Egypt.

**Baik,B.-k& Ulrich,S.E.** (2008).Barley for food: characteristics,improvement and renewed intereset.Journal of cereal science 48,233-242(2008)

**Benmahammed A., M. Kribaa, H. Bouzerzour, A. Djekoun.**,( 2010). Assessment of stress tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) advanced breeding lines under semi arid conditions of the eastern high plateaus of Algeria. Euphytica, 172: 383-394

**Bonjean A.,Piccard E.**,(1990): Les cereals à paille.Origine,Histoire,Economie et sélection. Edition Nathan.

**Bouazgh.**(2018). Bilan de la campagne nationale cerealiere 2017-2018 in : [http://www.minagri.dz/pdf/Divers/2018/Septembre/Allocution\\_Monsieur\\_le\\_Ministre\\_Bilan\\_de\\_la\\_Campagne\\_Cerealiera\\_2017-2018\\_01\\_09\\_2018\\_Fr.pdf](http://www.minagri.dz/pdf/Divers/2018/Septembre/Allocution_Monsieur_le_Ministre_Bilan_de_la_Campagne_Cerealiera_2017-2018_01_09_2018_Fr.pdf)

**Boulal H., Zaghouane O., El mourid M. et Rezgui S.**, (2007) - Guide pratique de la conduite des céréales d'automne (blés et orge) dans le Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie). Ed. TIGC, INRA, ICARDA, Algérie, 176 p.

**Bouzerzour, H., A. Djekoun, A. Benmahammed, K.L. Hassous.,**(1998). Contribution de la biomasse aérienne de l'indice de récolte et de la précocité à 71 l'épiaison au rendement grain (*Hordeum vulgare* L.) en zone d'altitude. Cahiers de l'Agriculture, 8: 133-137.

**Briggs, D.E.,**(1978). Barley, Chapman and Hall Ltd, London.

**Chawla HS.,**(2002). Introduction to Plant Biotechnology. Published by Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA. 538 pages.

**Choo T.M., E. Reinbergs and K.J. Kasha.,**(1985): Use of Haploids in Breeding Barley. Plant Breed Reviews. Volume 3: 219-251.

**Davies PA, Morton S.,**(1998). A comparison of barley isolated microspore and anther culture and the influence of cell culture density. Plant Cell Rep 17: 206–210.

**Egertsdotter U et Arnold S.V.,** (1998). Development of somatic embryos in Norway spruce. *Jou EXP Bot* **49 (319): 155 - 162.**

**FAO,** (2019) Bulletin de la FAO sur l'offre des céréales : <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/fr/>

**Feuillet et al.,**(2008) in Usabaliev (2013). Barley Genetic Resources for Kyrgyz Plant Breeding .

**Gamborg O. L., Shyluk J. P., Brar J. P., Constabel F.,** (1977). Morphogenesis and plant regeneration from callus of immature embryos of Sorghum. *Plant. Sci. Lett.*, 10, 67-74.

**Gamborg, O.L. and Phillips, G.C.,** (1995): Preface. In: Gamborg, O.L. and Phillips, G.C. Eds.: Plant cell, tissue, and organ culture: Fundamental methods. Springer (Berlin and New York). 360 pp.

**Guha S, Maheshwari SC.,** (1964). In vitro production of embryos from anthers in *Datura*, *Nature* 204:139–144.

**Hamdani zohra.,**(2001) . Régénération via l'organogénèse ou l'embryogénèse somatique chez le *Scorpiurus*. Mémoire de master en biologie végétale. Université Hassiba ben bouali ,chlef.

**Halperin w.,** (1967). Population density effects in embryogenesis in carrot cell cultures. *Exp. Cell Res.* 48:170-173.

- Ho and Kasha, 1975** High Frequency Haploid Production in Barley (*Hordeum vulgare* L.)
- Jestin L.**, (1992). L'orge. In amélioration des espèces végétales cultivées. INRA, Paris. PP 55– 70.
- Jullien M.**,(1991): La multiplication végétative *in-vitro* , bases méthodologiques et physiologique . D.E.A . Ressources génétiques et Amélioration des plantes . INA Paris Grignon 101p.
- Kammoun N et Daaloul A.**,(1990). Culture in vitro des embryons immatures d'orge (*Hordeum vulgare* L.) : Effet des caractéristiques de l'embryon sur la formation des cals. 7(1): 330-8065.
- Linde - Laursen , I. , J.S. Heslop - Harrison , K.W. Shepherd , and S. Taketa .**,(1997) : The barley genome and its relationship with the wheat genomes. A survey with an internationally agreed recommendation for barley chromosome nomenclature . Hereditas 12: 1 – 16 .
- Liné.**(1755) in :Grillot.,(1959) .La classification des orges cultivées. Au. Am. Plantes, 4 :446-486.
- Linsmaier e.m et Skoog f.**, (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18:100-127.
- Meunissier A.**, (1926). Etudes sur l'origine des plantes cultivées. D'après N.I. Vavilov. In : *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale.* 6ème année, bulletin n° 60, août 1926. PP 476-484
- Monnier M.**, (1971). Action des conditions de stérilisation sur la valeur nutritive des milieux utilisés pour la culture des embryons isolés de *Capsella bursapastoris*, *Rev. Gén. Bot.* 78 : 57-60.
- Mossab M.**,(2007) : Contribution à l'étude de l'exploitation à double fin de l'orge *Hordeum vulgare* L. en zones semi-arides d'altitude. Magister, option production de végétale. Université Constantine de Sétif.
- Murashige T., Skoog F. A.**,(1962). Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.*15 (3):473-97.

**Nuti Ranchi V.**, (1995): Mitosis and meiosis in cultured plant cells and their relationship to variant cell types arising in culture . International review of cytology 158: 65 - 139.

**Nuti Ranchi V.**,( 1990): Organogenesis and embryogenesis : genetic and physiological approaches 1st International symposium in-vitro culture and horticultural breeding ,Acta Horticulturae 280: 1 - 11

**OGTR.**,(2008).The Biology of *Hordeum vulgare* L. (barley). SECTION 2: ORIGINS AND CULTIVATION , Centre of diversity and domestication.pp.2 x.

**Patricio Esteves**, (2014). Optimisation de la culture de microspores isolées chez les orges de printemps à six rangs. Thèse de doctorat en biologie végétale.Université Laval , Canada.

**Picard E, Crambes E, Liu GS, Mihamou-Ziyyat A.** (1994). Evolution des méthodes d'haplodiploïdisation et perspectives pour l'amélioration des plantes. C. R. Soc. Biol 188 : 109-141.

**Pochlman.J.M.**,(1985).Adaptation and distribution.In D.C.Rasmusson (cd).Barley(Monograph 26). American Society of Agronomy ,Madison ,WI.pp.1-17.

**Rachedi MF.**, (2003) : Les céréales en Algérie : problématique et option de réforme. Céréaliculture. N° 38, pp 6-9

**Ramla D.**,(2017). Intéret de l'androgèset la mutagénèse dans l'amélioration de la production et de la résistance à la strie foliaire chez l'Orge (*Hordeum vulgare* ).Thèse de doctorat option : science et techniques de productions végétales, ENSA Alger.

**Rasmusson D.C.**, (1987 ).Barley crop. An SSA/ASA Monograph series number 56. Madison, Eds ASA. 250p.

**Rughla A et Jones M.G.K.**, (1998). Somatic embryogenesis and plantlet formation in *Santalum album* and *S.spicatum* . Jou.Exp Bot 49 (320) : 563 - 571

**Saadi A.** (1991).Régénération de plantes de pois *Pisum sativum* L par embryogènèse somatique. Thèse de doctorat, Paris Grignon, France.

**San L. H., Ahmadi N.**,( 1982). Variability of doubled haploids from in vitro androgenesis and gynogenesis in *Hordeum vulgare* L. in « Variability in plants regenerated from tissue culture ». Earle E. D. et Demarly Y. (eds), Praeger Press, New York, 273.

**San Noeum L. H.**, (1976). Haploïdes d'*Hordeum vulgare* L. par culture in vitro d'ovaires non fécondés. Ann. Amélior. Plantes, 26 (4), 751-754.

**Santalla M., Power J.B. et Davey M.R.**,(1998).Efficient *in-vitro* shoot regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus* . Euphytica,102(2) : 195 - 202

**Santner A., L.I.A. Calderon-Villalobos and M. Estelle.**,(2009).Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. Nature Reviews

**Slafer, G. A.** (1996): Differences in phasic development rate amongst wheat cultivars independent of responses to photoperiod and vernalization.in : POTENTIAL AND STRESS ADAPTATION IN CEREALS viewpoint of the intrinsic earliness hypothesis. J. Agr. Sci. (Cambridge)

**Smith , B.D.** (1998). The Emergence of Agriculture . Scientific American Library , New York.

**Smith , L.** (1951) . Cytology and genetics of barley . Bot. Rev. 17 : 1 – 51 , 133 – 202 , 285 – 355.

**Soltner D.**, (1990 ).Phytotechnie spéciale, Les grandes productions végétales. Céréales, plantes sarclées, prairies. Sciences et Technique Agricoles éd. Soltner D., 2005 - Les grandes productions végétales. 20ème Edition. Collection science et techniques agricoles. 472p.

**Soltner D.**, (2005 ) .Les grandes productions végétales. 20ème Edition. Collection science et techniques agricoles. 472p.

**Ulrich S E.**(2011): Significance, Adaptation, Production and Trade of barley. In: Steven E Ulrich ©, eds.BARLEY : Production, Improvement and uses. Garsington Road, Oxford (U.S.A):Blackwell Publishing Ltd, pp: 3-13.

**Varoquaux F et pelettier G.**,(2002) .Evolution des techniques, outils et méthodes en amélioration des plantes

**Vavilov N.I.**,(1926) - Centres of origin of cultivated plants. Bull. Appl. Bot. Genet. Plant Breed.

**Von Bothmer R.**, (1992). The wild species of *Hordeum*: Relationships and potential use for improvement of cultivated barley. Chapter 1. In: RP Shewry. Ed. Barley: Genetics,



Biochemistry, molecular biology and Biotechnology. C.A.B. International, Wallingford, Oxon. PP 3-18

**White P.J. and P. H. Brown.,** (2010): Plant nutrition for sustainable development and global health. In: Overview: Part of a special issue on plant nutrition. Annals of Botany 105: 1073–1080.

**Zohary D. and Hopf M.,** (1993) : The domestication of plants in the Old World. Oxford, Clarendon Press. ed. 2. x-278 p. (ed. 1 : 1988). P.S.

### **Sites web:**

**Actualitix** ,(2018 ).production d'orge en Algerie : <https://fr.actualitix.com/pays/wld/orge-pays-producteurs.php>.

**Anonyme** :google image (schéma des orges à deux rangs et à six rangs )  
:<https://www.google.com/url?sa=i&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwilo76H0bTjAhWksBQKHAE6At0Qjhx6BAgBEAI&url=http%3A%2F%2Fbrulosophy.com%2F2018%2F04%2F09%2Fgrain-comparison-2-row-pale-malt-vs-6-row-pale>.

**Statista,(2019):** production d'orge dans le monde  
<https://fr.statista.com/statistiques/570924/production-d-orge-dans-le-monde-2008-2009/>.

**ANNEXE 1 :**

**Tableau 1 :** Composition du milieu de culture MS

Constituants	Solution mère(L) (mg/l)	Concentration finale (mg/l)
<b>Macro-elements 20X</b>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33000	1650
KNO <sub>3</sub>	38000	1900
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	8800	→ 440
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	7400	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3400	170
	50ml	
<b>Micro-éléments 100×</b>		
MnSO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	2230	22.3
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	860	8.6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620	6.2
KI	83	→ 0.83
Na <sub>2</sub> MnO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	25	0.25
CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	2.5	0.025
CoCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	2.5	0.025
	10ml	
<b>Fer 100×</b>		
Na <sub>2</sub> EDTA	3730	37.3
FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	2780	→ 27.8
	10ml	
<b>Acides aminée et vitamines 100×</b>		
Glycine	5 mg pour 100ml	0.5
AC. Nicotinique	1 mg pour 100ml	→ 0.1
Pyridoxine-HCl	5 mg pour 100ml	0.5
Thiamine-HCl	20 mg pour 100ml	0.1
	10ml	
<b>Agar</b>	-	8
<b>Saccharose</b>		20
<b>Myoinositol</b>		4.5
<b>2.4-D</b>		2

## ANNEXE 2 : Analyse de variance calculée par one-way ANOVA EXCEL

**Tableau 3** : analyse de variance des moyennes de poids frais des cals calculée par one-way ANOVAEXCEL

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	probabilité	Valeur critique pour F
Entre groupes	0.034724822	8	0.004340603	3.907381066	0.000590214	2.052009938
A l'intérieur des groupes	0.092202428	83	0.001110873			
Total	0.12692725	91				

**Tableau 4** : analyse de variance des surfaces des cals calculée par one-way anova EXCEL

Source de variation	Somme de carrés	DDL	Moyenne des carrés	F	probabilité	Valeur critique pour F
Entre groupes	6301.30841	8	787.663551	4.44420949	0.00016420	2.05200993
A l'intérieur des groupes	14710.3944	83	177.233668			
Total	21011.70287	91				

### ANNEXE 3 : Repiquage des cals



**Figure 14:** repiquage de cals saines de la lignée 54 sur le milieu MS après contamination.



**Figure 15 :** prise de vue des cals volumineux chez la lignée 54 sur milieu MS.

# Aptitude à la callogénèse de dix lignées haploïdes doublées de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) à deux rangs.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et  
Génomique Végétale

## Résumé :

300 embryons matures issus de 10 lignées haploïdes doublées d'orge (*Hordeum vulgare* L.) ont été cultivées sur le milieu MS additionné de 2.4-D afin d'induire la callogénèse. Ceux-ci appartiennent à deux groupes, cinq sont à deux rangs avec barbes ordinaires (groupe1) et cinq sont à deux rangs avec barbes hooded (encapuchonnées) (groupe2). La majorité des embryons cultivés présentent une réponse positive à la callogénèse. Pour comparer la réponse des dix génotypes à la callogénèse différents paramètres sont pris en considération : la durée de gonflement des embryons où on a trouvé que le premier groupe avait une réponse plus rapide (24 h à 48 h) que celle du deuxième groupe (48 h à 72 h), ainsi pour l'initialisation d'induction de callogénèse (4 jours sont enregistrés pour le G1 et 5 jours pour le G2). Le taux d'induction de cals est supérieur chez le groupe 2 par rapport au premier groupe, soit un taux respectif de 39,3 % et 32,59 %, avec une forte induction de cals chez la lignée 35 à 70%. En revanche la lignée 19 du groupe 1 avait le plus faible pourcentage avec 13.33%. Contrairement au taux d'induction des cals les moyennes de surface et du poids frais des cals ont montré des résultats similaires par rapport au comportement des cals on a trouvé que le groupe 1 a une moyenne de surface de 26.50 mm<sup>2</sup> et de poids frais de cals à 0.26 g supérieure à ceux du deuxième groupe avec une surface de 24.48 mm<sup>2</sup> et un poids de 0.21 g. Les cals de la lignée 35 ont les meilleurs résultats vis-à-vis les paramètres testés, l'inverse est constaté chez la lignée 135 qui a répondu négativement à l'induction de la callogénèse qui dépend peut être à l'effet du génotype.

**Mots clés :** Orge, *Hordeum vulgare* L., callogénèse, culture *in vitro* et embryons matures.

**Laboratoire de recherche :** Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale (GBBV) Constantine 1

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** Mr. BENBELKACEM A. (Directeur de recherche INRAA Constantine).

**Encadrant :** Mr. KELLOU K. (MAA- UFM Constantine 1).

**Examinatrice :** Mlle. MOUELLEF A. (MAA- UFM Constantine 1).

**Date de soutenance :** 18 /07/2019