



# **Optimisation de la culture de microspores isolées chez les orges de printemps à six rangs**

**Thèse**

**Patricio Esteves**

**Doctorat en biologie végétale**  
Philosophiæ doctor (PhD)

Québec, Canada

© Patricio Esteves, 2014



## Résumé court

Les plantes haploïdes doublées (HD) sont des individus complètement homozygotes souvent obtenues via l'androgenèse in vitro, entre autres par culture de microspores isolées (CMI). La technique est réputée la plus efficace chez l'orge, mais les génotypes à six rangs du type printemps sont typiquement récalcitrants à cause du faible taux d'embryogenèse et d'une forte incidence de l'albinisme. Pour développer un protocole CMI adapté à ce type d'orge, nous avons réalisé des travaux avec quatre cultivars d'orge afin de : 1) définir le stade optimal de récolte des tiges, 2) comparer trois prétraitements des microspores, 3) comparer deux potentiels osmotiques au sein du milieu d'induction, et 4) identifier une densité optimale d'étalement. Ensuite, nous avons exploré l'utilisation de phytohormones alternatives à la fois dans les milieux d'induction et de régénération. Dans l'ensemble, nous avons réussi à améliorer substantiellement l'efficacité de la CMI sur ce type récalcitrant d'orge. Finalement, nos résultats ont été validés sur des génotypes F1 d'un programme d'amélioration.



## Résumé

Les plantes haploïdes doublées (HD) sont des individus complètement homozygotes qui peuvent être obtenus via l'androgenèse in vitro. Les HD sont très appréciés comme outils de recherche en génétique et en amélioration végétale. La culture de microspores isolées (CMI) est le moyen le plus efficace de produire des HD. Malheureusement, les orges de printemps à six rangs, le type prédominant cultivé dans l'Est du Canada, sont considérées comme récalcitrantes à cause d'une faible embryogenèse et d'une propension à l'albinisme. Notre objectif était de développer un protocole CMI adapté à ce type d'orge. Nous avons entamé des travaux exploratoires sur quatre cultivars : ACCA et Léger (six rangs, printemps), Gobernadora (deux rangs, printemps) et Igri (deux rangs, hiver). Dans une première phase, nous avons évalué l'impact de quatre facteurs physiques. Nous avons trouvé que l'optimisation du stade de récolte des tiges pouvait augmenter de 2 à 4 fois la récolte de microspores embryogéniques. Deuxièmement, deux des prétraitements (0,3 M mannitol pendant 2 jours et une combinaison de froid et de chaleur pendant 15 jours) ont tous deux été significativement plus productifs qu'un prétraitement très largement employé (28 jours à 4 °C). Troisièmement, l'ajout de mannitol au milieu d'induction a permis de doubler le nombre de plantes vertes obtenues. Finalement, la densité des microspores à l'étalement a eu un impact significatif sur l'obtention de plantes vertes,  $10^6$  microspores/ml s'étant avéré optimal. Dans une deuxième phase, nous avons exploré l'utilisation de régulateurs de croissance alternatifs tant dans le milieu d'induction (thidiazuron et dicamba) que de régénération (meta-topoline). Comparativement à des milieux témoins contenant principalement la 6-benzyl-aminopurine, nos milieux d'induction ont produit 5,1 fois plus de plantes vertes, principalement par réduction de l'albinisme. Notre milieu de régénération amélioré a permis d'obtenir 2,9 fois plus de plantes vertes que le témoin. Finalement, ces résultats ont été validés avec succès sur des génotypes F1 d'un programme d'amélioration. Au terme de ce travail, nous avons ainsi réussi à améliorer substantiellement l'efficacité de la CMI chez les orges de printemps à six rangs.



## Abstract

Doubled haploid (DH) plants are completely homozygous individuals that can be generated via *in vitro* androgenesis. DHs are useful as research tools both for genetic studies and in plant breeding. Isolated microspore culture (IMC) is the most efficient way to produce DHs. Unfortunately, six-row spring barley genotypes, the main type produced in Eastern Canada, are considered recalcitrant because of a low embryogenesis and a high rate of albinism. Our objective was to develop an IMC protocol more suitable to this type of barley. We carried out exploratory work on four barley cultivars: ACCA and Léger (six-row, spring), Gobernadora (two-row, spring) and Igri (two-row, winter). In a first phase, we explored four factors. First, we found that a 2-4-fold increase in the yield of embryogenic microspores is possible by optimizing the harvest stage for each genotype. Second, two pretreatments (0.3M mannitol for 2 days or a combination of cold and heat over 15 days) both performed significantly better than the commonly used cold pretreatment (28 days at 4°C). Third, an induction medium containing mannitol doubled green plant regeneration. Fourth, we observed a marked effect of microspore plating density on the number of green plants obtained, with  $10^6$  microspores/ml yielding the best results. In a second phase we explored the use of alternative growth regulators both in the induction medium (thidiazuron and dicamba) and in the regeneration medium (meta-topoline). Compared to control media containing 6-benzyl-aminopurine, our improved induction medium led to a 5.1-fold increase in green plant production, mainly achieved by reducing albinism. Similarly, our regeneration medium yielded 2.9-fold more green plants than the control. Finally, these results were successfully validated using F1 genotypes from a breeding program. On the whole, we have succeeded in substantially improving the efficiency of IMC in this type of recalcitrant barley.





# Table de matières

Résumé court.....	III
Résumé.....	V
Abstract.....	VII
Table de matières.....	IX
Table de Figures.....	XI
Liste de Tableaux.....	XIII
Remerciements.....	XVII
Avant-propos.....	XIX
<b>Chapitre 1 : Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>La culture in vitro chez les végétaux.....</b>	<b>1</b>
Concepts de base.....	1
Culture in vitro : Méthodes et Applications.....	1
Facteurs clés de la culture in vitro.....	5
Milieu de culture.....	5
Régulateurs de croissance.....	8
Compétence embryogénique de l'explant.....	11
<b>L'orge et son amélioration génétique.....</b>	<b>14</b>
L'espèce.....	14
Méthodes d'amélioration génétique chez l'orge.....	18
Avantages de l'utilisation de doubles-haploïdes.....	20
Méthodes d'obtention d'haploïdes doublés.....	21
Méthode des croisements interspécifiques (CI).....	22
Méthode de culture d'anthères (CA).....	25
Méthode de culture de microspores isolées (CMI).....	29
Les étapes clés d'un protocole CMI.....	31
<b>Hypothèse et objectifs.....</b>	<b>37</b>
<b>Chapitre 2 : Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: I-Optimization of key physical factors.....</b>	<b>38</b>
Abstract.....	39
Key Message.....	39
Introduction.....	40
Materials and methods.....	41
Plant material and growth conditions.....	41
General procedure for microspore isolation and culture.....	42
Modified procedures for optimization experiments.....	43
Impact of harvest stage on microspore yield.....	43
Impact of pretreatments: exploratory experiment.....	43
Impact of pretreatments: validation experiment.....	43
Impact of osmotic potential of the induction medium.....	43
Impact of microspore density at plating.....	44
Experimental design and data analysis.....	44

Results.....	44
Impact of harvest stage on microspore yield.....	44
Comparison of three pretreatments .....	46
Exploratory experience .....	46
Validation experiment .....	48
Impact of osmotic potential in the induction medium.....	50
Impact of microspore density at plating.....	51
Discussion .....	52
Impact of harvest stage on microspore yield.....	52
Comparison of three pretreatments .....	53
Impact of the osmotic potential of the induction medium .....	54
Impact of the plating density of microspores .....	54
Summary.. .....	55
Acknowledgments.....	55
Literature cited .....	57
<b>Chapitre 3 : Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: II-Exploring novel growth regulators to maximize embryogenesis and reduce albinism.....</b>	<b>60</b>
Abstract.....	61
Key Message .....	61
Introduction.....	62
Material and Methods.....	64
Plant materials and growth conditions .....	64
Microspore culture .....	64
Induction media.....	65
Regeneration media.....	65
Evolution of DH production efficiency.....	66
Data analysis .....	66
Results.....	66
Hormonal composition of the induction medium .....	66
Hormonal composition of the regeneration medium.....	70
Improvement in the efficiency of DH production in six-row spring barley.....	71
Discussion .....	72
Hormonal composition of the induction medium .....	72
Hormonal composition of the regeneration medium.....	73
Increasing the efficiency of DH production step by step .....	74
Acknowledgments.....	75
References .....	78
<b>Chapitre 4 : Conclusion générale.....</b>	<b>81</b>
<b>Chapitre 5 : Bibliographie .....</b>	<b>89</b>
<b>Chapitre 6 : Annexe : Analyses statistiques de la réponse de génotypes.....</b>	<b>99</b>
Comparaison de trois prétraitements sur quatre cultivars .....	99
Impact des hormones d'induction sur quatre cultivars.....	100

# Table de Figures

## Chapitre 1 : Introduction

Figure 1.1 : Exemples de techniques et applications biotechnologiques de la culture in vitro de cellules, tissus ou organes chez les végétaux .....	2
Figure 1.2 : Structures chimiques représentatives des principaux groupes d'hormones végétales reconnus au présent. ....	12
Figure 1.3 : Modèle conceptuel de la morphogenèse proposée pour expliquer la modulation hormonale chez les plantes. ....	12
Figure 1.4 : Épis d'orges à deux et à six rangs. ....	17
Figure 1.5 : Schéma de l'amélioration conventionnelle, et par HD, chez l'orge. ....	19
Figure 1.6 : Methodes d'obtention de HD chez les céréales. ....	22
Figure 1.7 : Quelques-unes des étapes de la méthode bulbosum. ....	24
Figure 1.8 : Commutation de la gametogenèse vers l'embryogenèse chez les microspores. ....	26
Figure 1.9 : Culture d'anthères chez l'orge. ....	27
Figure 1.10 : Caractéristiques des microspores embryogéniques d'orge. ....	32
Figure 1.11 : Les grandes étapes d'un protocole CMI. ....	32

## Chapitre 2 : Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: I-Optimization of key physical factors

Figure 2.1: Relationship between the internode distance at the time of harvest and the number of isolated microspores per spike for four barley cultivars. ....	46
Figure 2.2: Impact of three pretreatments on plant regeneration from four barley cultivars. ....	47
Figure 2.3: Impact of three pretreatments on plant regeneration from four F1-genotypes. ....	48
Figure 2.4: Impact of increasing the osmotic potential of the induction medium. ....	50
Figure 2.5: Impact of plating density of microspores on the number of green plants produced. ....	50
Figure 2.6: Impact of three pretreatments on plant regeneration from four F1-genotypes. ....	52
Figure 2.7: Impact of increasing the osmotic potential of the induction medium. ....	53

### **Chapitre 3 : Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: II-Exploring novel growth regulators to maximize embryogenesis and reduce albinism**

Figure 3.1: Effect of four hormonal regimes on plant regeneration: BAP (1.0 mg/l) or TDZ (0.1, 0.3 or 1.0 mg/l) used in the induction medium. ....	68
Figure 3.2: Effect on plant regeneration of the replacement of the cytokinin BAP by TDZ combined with three levels of the auxin dicamba in the induction medium. ....	69
Figure 3.3: Effect on the ratio of green to albino plants of seven induction media differing in their hormonal composition. ....	69
Figure 3.4: Comparison of the number of green plants produced per $10^5$ microspores on two induction media differing in their hormonal composition. ....	70
Figure 3.5: Number of green embryo-like structures (ELs) and green plants developed on two different regeneration media. ....	71
Figure 3.6: Impact of hormones and physical factors in HD-production efficiency. ....	72

### **Chapitre 6 : Annexe : Analyses statistiques de la réponse de géotypes**

Figure A.1 : Prétraitements, plantes vertes régénérées par $10^5$ microspores pour quatre cultivars. ....	100
Figure A.2 : Hormones d'induction, comparaison BAP vs. TDZ : plantes vertes régénérées par $10^5$ microspores pour quatre cultivars. ....	101
Figure A.3 : Hormones d'induction, comparaison BAP vs. TDZ+DIC, plantes vertes régénérées par $10^5$ microspores pour quatre cultivars. ....	101

# Liste de Tableaux

## Chapitre 1 : Introduction

Tableau 1.1 : Composition de trois milieux de base utilisés en culture in vitro de végétaux..	7
Tableau 1.2 : Les régulateurs de croissance et des exemples de leurs effets saillants.....	10
Tableau 1.3 : Moyennes de la superficie cultivée et de la production mondiale de céréales (2010-2012).....	15
Tableau 1.4 : Moyennes de la production d'orge par pays pour la période 2010-12 dans les dix principaux producteurs .....	16

## Chapitre 2 : Physical key factors in isolated microspore culture of recalcitrant barley genotypes

Table 2.1: Impact of three pretreatments on the success of HD production in four barley cultivars.....	49
Table 2.2: Impact of three pretreatments on the success of HD production using four F1s.....	51
Supplementary table 2.1: Induction (M8M) and regeneration (RMT) media composition for barley IMC .....	57

## Chapitre 3 : Role of hormone regulation in isolated microspore culture of recalcitrant barley genotypes

Supplementary Table 3.1: F1 Genotypes used in validation experiments.....	77
---	----

## Chapitre 6 : Annexe : Analyses statistiques concernant la réponse par génotype

Tableau 5.1 : Comparaison de trois prétraitements appliqués sur quatre cultivars, Tableau de l'ANOVA.....	100
Tableau 5.2 : Comparaison des hormones d'induction évaluées sur quatre cultivars, Tableau de l'ANOVA.....	101



*À mes parents, Julio et Ginette*





## Remerciements

Merci à jamais, Docteur François Belzile, de votre patience, de votre soutien, de votre écoute, et surtout de m'apprendre toujours autant. J'ai eu beaucoup de chance de vous avoir eu comme directeur pour entamer ces recherches. Et c'est génial d'être avec vous pour cette nouvelle étape, mon post-doc

Un merci de tout mon cœur à mes parents, de m'avoir toujours inspiré et accompagné avec amour, et surtout à ma mère de s'être investie de son plus grand enthousiasme dans mon aventure au Québec. Vous deux, vous êtes toujours avec moi

Énormément merci à mes frères et meilleurs amis George et Daniel, pour votre support, votre aide, et surtout pour être toujours inconditionnellement là à chaque fois que j'ai eu besoin d'un coup de main. Vous êtes tous les deux très importants dans ma vie et : je vous aime beaucoup !

À mes enfants : Eli, Viiiir et Rami, pour toujours je vous remercierai d'autant de patience, de compréhension et d'amour. Vous êtes tous toujours dans mon cœur, et je pense toujours à vous

À Suzanne, Isabelle, Martine : Vous êtes géniales, les filles ! Merci beaucoup !

À l'équipe étudiante, gros merci, les amis ! Vous êtes les meilleurs.



*'Haploids cannot yet be produced to order.  
When this can be done it will lead  
to great speeding up of plant breeding.'*

Harland (1955)

## **Avant-propos**

Cette thèse porte sur l'optimisation d'un protocole de culture de microspores isolées (CMI) chez les orges de printemps à six rangs, largement reconnues comme récalcitrantes en androgenèse. Elle comporte quatre chapitres, dont le premier vise à présenter une revue de la littérature la plus pertinente dans le domaine de la culture in vitro de microspores isolées chez l'orge. Pour commencer, nous passons en revue en quoi consiste la culture in vitro des végétaux en général, les caractéristiques particulières de cette discipline, ainsi que les critères et aspects techniques qui lui sont propres en tant qu'ensemble d'outils biotechnologiques. Ensuite, nous faisons une rapide synthèse de la culture et de l'amélioration génétique de l'orge en mettant en lumière les particularités qui justifient l'intérêt pour l'androgenèse in vitro. Une comparaison des trois méthodes courantes d'obtention de doubles-haploïdes (HD) chez l'orge s'en suit, avec présentation des bénéfices et limitations de chacune. Enfin, la méthode de CMI est présentée en détail en mettant l'accent sur les contributions scientifiques les plus marquantes.

Les deuxième et troisième chapitres présentent, sous forme de manuscrits, les deux principaux volets de mon projet de recherche. Les résultats de mes travaux sont présentés en anglais, dans un format qui est conforme aux normes de présentation dans un périodique tel Plant Cell Reports, auquel ils seront soumis bientôt. Au cours de ces recherches, j'ai joué un rôle prépondérant dans les travaux d'expérimentation au labo, la formulation des hypothèses, la prise de données et leur analyse, l'interprétation des résultats, et la rédaction des manuscrits. Pourtant, tout ceci a été accompli sous la tutelle de mon directeur de recherche, le Dr François Belzile, et il faut remarquer que son aide, son support, et ses conseils autant que ses critiques ont été des facteurs décisifs pour que je puisse atteindre les objectifs poursuivis.

Le chapitre deux aborde l'impact de quatre facteurs physiques sur la production de plantes vertes en CMI chez les orges de printemps à six rangs. En guise de développement d'un protocole efficace pour ce type d'orge, nous avons travaillé sur l'optimisation du stade de récolte des épis, la comparaison de trois prétraitements, les effets observés sur l'osmoticum du milieu d'induction et de la densité d'étalement des microspores en phase d'induction. Les résultats d'une abondante expérimentation exploratoire sur un ensemble de quatre cultivars d'abord, et les travaux de validation effectués sur des ensembles de génotypes F1 par la suite, sont présentés.

Le chapitre trois est constitué par les recherches concernant l'impact des facteurs chimiques sur la régénération de plantes vertes : les régulateurs de croissance. Or, on a expérimenté avec des phytohormones qui, à notre connaissance, sont utilisées pour la première fois avec succès en CMI, et qui nous ont permis d'augmenter substantiellement l'efficacité de notre ancien protocole de production de HD. Finalement, ce chapitre décrit le transfert technologique de nos résultats vers un programme d'amélioration génétique d'orge mené en partenariat entre l'Université Laval et La Coop Fédérée de Québec. Ma participation active dans ce transfert des produits de la recherche vers une situation industrielle de travail m'a permis non seulement de valider à une grande échelle les résultats obtenus, mais aussi de vivre une expérience enrichissante au plan professionnel.

Finalement le chapitre quatre comprend la conclusion générale, et il résume d'ailleurs les faits saillants de ce travail, en les mettant dans un contexte de transfert technologique vers un programme de production de HD. Aussi, des extensions en vue de travaux futurs sont présentées.

# **1. Introduction**

## **1.1. La culture in vitro chez les végétaux**

### **1.1.1. Concepts de base**

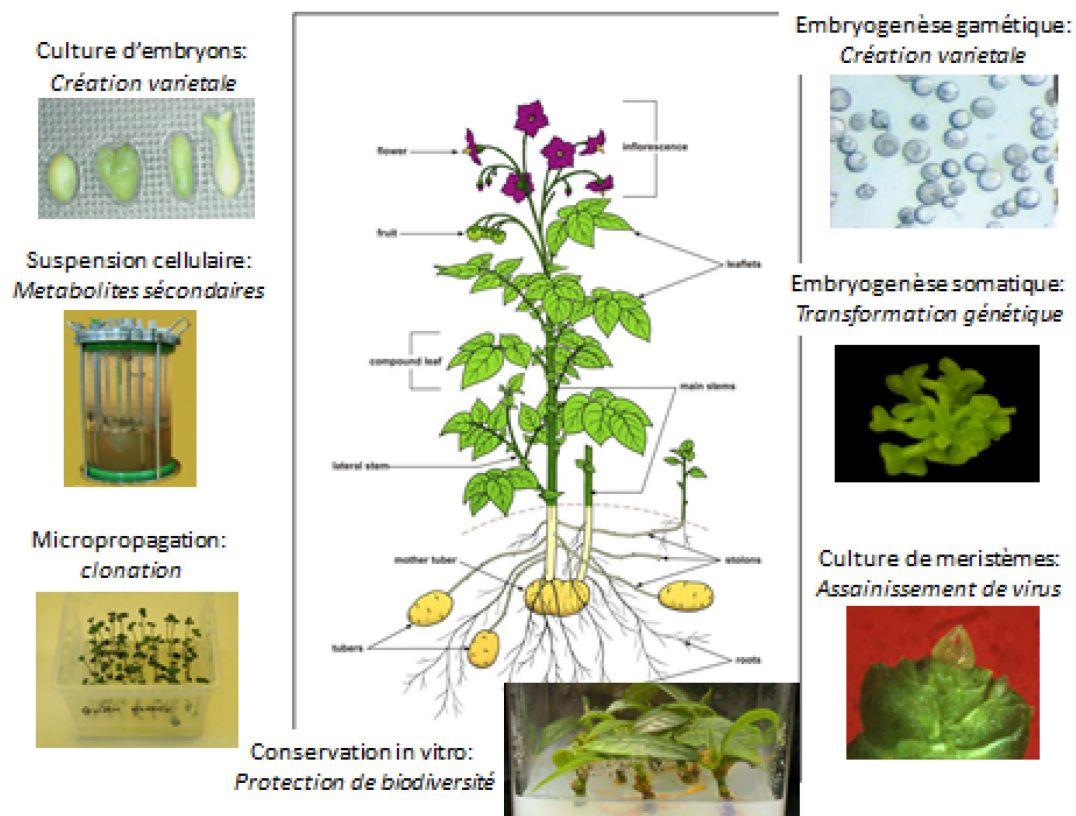
La culture in vitro de végétaux est un ensemble de techniques utilisées pour permettre l'entretien ou la croissance de cellules, tissus ou organes de plantes, dans des conditions de stérilité et sur un milieu de culture de composition définie, autant pour des fins de recherche que pour des applications commerciales. Elle permet non seulement la propagation massive d'individus sélectionnés, mais aussi l'obtention de plantes assainies (par exemple, exemptes de virus), de mutants, la production de métabolites secondaires et la transformation génétique des végétaux (Adamczuk et al., 2012).

La naissance de la culture in vitro (CIV) de végétaux pourrait remonter à 1902 lorsque, à Vienne, le physiologiste autrichien Gottlieb Haberlandt énonçait son hypothèse à propos de la totipotentialité des végétaux. Il proposait que chaque cellule d'un végétal possède la capacité de donner naissance à une plante entière (Haberlandt, 1902). D'autre part, il signalait que pour réguler leurs divisions, croissance et différenciation, des « facteurs de croissance » devaient être fournis. Même si les hormones végétales n'étaient pas connues à cette époque, Haberlandt venait de jeter les éléments de base qui formeraient l'assise de la culture in vitro des végétaux (Murashige, 1979).

La base méthodologique de la CIV des végétaux consiste à prélever un explant (des cellules un tissu, un organe ou une partie d'une plante) pour l'établir sur un milieu de culture aux propriétés définies. En fonction des stimuli extrinsèques fournis par le milieu et l'environnement, ainsi que de sa capacité intrinsèque de réaction, l'explant pourra modifier sa croissance ou son développement pour devenir un produit recherché. Il existe plusieurs techniques de CIV qui servent à des objectifs divers. Cependant, elles ont toutes en commun le fait d'imposer un contrôle soit pour accélérer, pour ralentir ou pour rediriger, le déroulement de la morphogenèse (croissance et développement) de l'explant.

### **1.1.2 Culture in vitro : Méthodes et Applications**

Depuis ses débuts, la CIV a évolué et s'est diversifiée pour donner naissance à un champ entier qu'on connaît sous le nom de « biotechnologies végétales », lesquelles regroupent les nombreuses méthodes et techniques qui assistent autant la recherche scientifique (en biologie végétale, génétique, etc.) que la production agricole (p.ex., vitro-plantes horticoles) et même industrielle (p.ex., produits bio-pharmaceutiques). Plusieurs des applications de la culture in vitro sont illustrées à la Figure 1.1 et sont décrites dans ce qui suit.



**Figure 1.1:** Exemples de techniques et applications biotechnologiques de la culture in vitro de cellules, tissus ou organes chez les végétaux

**La micropropagation :**

C'est la propagation végétative par développement in vitro de bourgeons axillaires ou adventifs. Notamment, elle permet de multiplier rapidement et à très grande échelle des individus sélectionnés (Rani et Rania, 2000). Une autre application de cette technique consiste à ralentir la croissance de boutures pour conserver à long terme un germoplasme végétal (Benson, 2008; Mathur, 2013).

**La culture de méristèmes :**

Parce que les méristèmes ne sont normalement infectés par des virus ou autres pathogènes (selon Morel, 1960), ils peuvent être utilisés pour régénérer des plantes assainies, ou « libérées de virus » (Grout, 1999). Des schémas de certification sanitaire des semences chez plusieurs espèces horticoles à propagation végétative ont été établis depuis des années et ceux-ci assurent la qualité de la production et des rendements augmentés (Navatel, 1990).

**Les suspensions cellulaires en bioréacteur :**

La culture massive de cellules végétales en milieu liquide stérile dans de grands récipients permet une extraction continue et stabilisée de produits du métabolisme secondaire, naturels ou recombinés, qui peuvent être exploités pour leurs propriétés chimiques, antibiotiques, insecticides ou herbicides (Hussain et al., 2012 b).

**La culture d'embryons :**

Lors de croisements contrôlés entre des espèces non-compatibles, le sauvetage d'embryons immatures est une technique qui permet de surmonter l'isolement reproductif (Shen et al., 2011). Ainsi, il devient possible d'obtenir des hybrides inter-génériques ou inter-spécifiques (Hussain et al., 2012 a) ou encore des plantes haploïdes comportant seulement le génome de la plante mère. Par exemple, des croisements entre le blé et le maïs sont utilisés pour produire des haploïdes de blé (Ahsan and Ahmad, 2011).

### **L'embryogenèse somatique :**

Dans des conditions définies de CIV il est possible de reprogrammer une cellule végétale pour qu'elle se transforme en embryon, anatomiquement et physiologiquement identique à ceux issus de la reproduction sexuelle. Par la suite, ces embryons germeront et deviendront des plantes normales. On trouve cette méthode à la base de la transformation génétique (transgénèse) de nombreuses espèces, notamment chez des Graminées. De plus, cette application permet une multiplication clonale beaucoup plus efficace que la micropropagation (Yang et Zhang, 2010).

### **L'embryogenèse gamétique :**

Les gamètes sont des cellules haploïdes et il est possible d'induire la régénération d'un embryon à partir d'une cellule gamétique. S'il s'agit de la culture de gamètes mâles, le processus est nommé « androgenèse », et « gynogenèse » pour les gamètes femelles (Germanà, 2011). Soit par doublement spontané, ou bien par traitement à la colchicine, on peut obtenir un doublement des chromosomes. De telles plantes haploïdes doublées récupèrent leur fertilité et, en même temps, elles se trouvent complètement homozygotes pour l'ensemble de leur patrimoine génétique. L'embryogenèse gamétique ou, plus particulièrement, la culture in vitro de microspores, est la méthode d'androgenèse qui fait l'objet des travaux rapportés dans cette thèse.

Selon Gamborg et Phillips (1995), les composantes nutritionnelles du milieu de culture et des régulateurs de croissance appropriés sont deux facteurs clés pour avoir du succès en CIV de cellules, tissus ou organes végétaux.



### **1.1.3 Facteurs clés de la culture in vitro**

#### **1.1.3.1 Milieu de culture**

Un milieu de culture basal vise à combler les besoins nutritionnels des explants cultivés. Donc, sa conception devra inclure trois groupes de facteurs constitutants :

##### ***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).

##### ***B) Une source d'énergie***

En conditions de CIV, les explants végétaux deviennent hétérotrophes, et des hydrates de carbone (sucres) doivent être ajoutés dans le milieu pour soutenir la croissance et le développement in vitro. En même temps, de par leur concentration, les sucres jouent un rôle dans la régulation du potentiel osmotique du milieu.

##### ***C) Composés organiques***

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 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 et al., 2008).

Il existe environ une demi-douzaine de milieux dit « de base », comprenant des sels inorganiques, des vitamines et des composés organiques qui, le plus souvent, ont été créés pour répondre aux besoins de la culture in vitro soit de cellules, de tissus, d'organes (méristèmes, disques foliaires, anthères, etc.), ou bien de groupes de plantes ayant des caractéristiques de croissance semblables (herbacées, ligneuses, etc.). La composition basale du milieu de culture est donc habituellement dictée par le type d'explants à mettre en culture, ainsi que par l'espèce végétale en question (Gamborg et Phillips, 1995).

Des exemples de milieux typiques sont présentés dans le Tableau 1.1. Le milieu basal MS, créé par Murashige et Skoog en 1962, est probablement le plus utilisé dans l'histoire de la culture in vitro. Par ailleurs, les milieux IMI (Li et Devaux, 2003) et FHG (Hunter, 1988) constituent deux milieux traditionnellement employés en androgenèse chez les céréales. En plus de ces milieux très répandus, plusieurs dizaines, voire des centaines, de milieux de culture plus spécialisés ont été créés en modifiant les milieux de base en ce qui a trait à leurs composantes organiques ou, plus fréquemment, leur régime hormonal.

**Tableau 1.1** : Composition de trois milieux de base utilisés en culture in vitro de végétaux. Les milieux IMI et FHG sont employés en androgenèse, tandis que le milieu MS l'est pour des fins très diverses.

Composante	MS		IMI		FHG	
	mg l <sup>-1</sup>	mM	mg l <sup>-1</sup>	mM	mg l <sup>-1</sup>	mM
Macro-éléments	mg l <sup>-1</sup>	mM	mg l <sup>-1</sup>	mM	mg l <sup>-1</sup>	mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650,00	20,60	165,00	2,06	165,00	2,06
KNO <sub>3</sub>	1 900,00	18,80	1 900,00	18,80	1 900,00	18,80
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	440,00	3,00	440,00	3,00	440,00	3,00
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	370,00	1,50	370,00	1,50	370,00	1,50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	1,25	170,00	1,25	170,00	1,25
Micro-éléments	mg l <sup>-1</sup>	μM	mg l <sup>-1</sup>	μM	mg l <sup>-1</sup>	μM
KI	0,83	5,00	0,83	5,00	---	---
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	100,00	6,20	100,00	6,20	100,00
MnSO <sub>4</sub> .4 H <sub>2</sub> O	22,30	100,00	22,30	100,00	22,30	100,00
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	8,60	30,00	8,60	30,00	8,60	30,00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0,25	1,00	0,25	1,00	0,25	1,00
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0,025	0,10	0,025	0,10	0,025	0,10
CoCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	0,025	0,10	0,025	0,10	0,025	0,10
Na <sub>2</sub> .EDTA	37,30	100,00	---	---	---	---
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	27,80	100,00	---	---	---	---
FeNa.EDTA	---	---	43,00	0,12	40,00	0,11
Vitamines et organiques	mg l <sup>-1</sup>	μM	mg l <sup>-1</sup>	μM	mg l <sup>-1</sup>	μM
Thiamine.HCl	0,10	0,30	10,00	30,00	0,40	1,20
Pyridoxine.HCl	0,50	2,50	1,00	5,00	0,50	2,50
Ac. Nicotinique	0,50	4,00	1,00	8,00	0,50	4,00
<i>myo</i> -Inositol	100,00	555,00	300,00	1 615,00	---	---
Glycine	2,00	27,00	---	---	40,00	540,00
Caséine hydrolys.	---	---	500,00	2 272,72	---	---
Ac. Ascorbique	---	---	25,00	141,95	---	---
Sucrose	30 000,00	0,088	---	---	---	---
Maltose	---	---	60 000,00	0,175	62 000,00	0,181
pH	5,8		5,8		5,6	

### 1.1.3.2 Régulateurs de croissance

La définition traditionnelle des hormones végétales les décrit comme « un groupe de substances naturelles qui influencent les processus de croissance ou de développement à faibles concentrations » (George et al., 2008; Davies, 2010). Une autre définition un peu moins restrictive inclut dans ce groupe des molécules de synthèse qui ont un effet physiologique de nature comparable à une phytohormone. L'ensemble est ainsi dénommé « régulateurs de croissance », lesquels sont donc « 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 » (Santner et Estelle, 2009).

La première phytohormone reconnue fut l'acide indole-3-acétique (AIA) (Kögl and Kostermans, 1934), une auxine comportant des effets sur l'élongation cellulaire. En l'utilisant, en 1939, Gauthéret et Nobécourt, dans des travaux indépendants, rapportent la culture « indéfinie » des cals de racines de carotte (*Daucus carotta* L.) en milieu artificiel. C'est cet événement qui marquerait la naissance de la phase expérimentale de la culture in vitro chez les végétaux comme discipline scientifique. L'évènement fondateur suivant a été la découverte par Miller et al. (1955) d'une nouvelle classe de phytohormones : la première cytokinine, la kinétine, qui stimulait les divisions cellulaires. À l'aide de cette substance, il est devenu possible de produire des cals in vitro sur presque n'importe quelle espèce (Murashige, 1979). Et ce n'est qu'une année plus tard que Skoog et Miller (1957) découvrirent qu'avec ces deux phytohormones combinées en proportions différentes il était possible de diriger la morphogenèse in vitro des tissus végétaux. Ainsi, par exemple sur des explants de parenchyme médullaire de tabac, un ratio relativement élevé d'auxines/cytokinines promouvait la formation de racines, tandis que l'opposé amenait à la formation de bourgeons (Skoog et Miller, 1957).

Cinq groupes de phytohormones étaient reconnus classiquement, mais au cours des 15 dernières années ce nombre est monté à au moins dix (Santner et Estelle, 2009). Le Tableau 1.2 contient les groupes acceptés d'hormones végétales et leurs rôles principaux. Cependant, bien qu'elles se distinguent les unes des autres par leurs effets différents sur les

tissus végétaux, les phytohormones n'agissent pas seules, mais conjointement, ou bien en opposition, de façon que la condition finale de croissance ou de développement représentera l'effet net du bilan hormonal (Davies, 2010).

Une autre particularité pour plusieurs phytohormones telles que les auxines, cytokinines et gibbérellines est qu'elles sont présentes sous des formes chimiques distinctes qui ont toutes un effet du même type, mais usuellement d'intensité différente. Ainsi, par exemple, il existe des précurseurs métaboliques de l'auxine AIA, soit sous une forme libre ou conjuguée (avec des molécules très diverses) qui vont toutes promouvoir le même type de réponse physiologique, mais de façon variable et particulière pour chacune d'entre elles (Normanly, 2010).

**Tableau 1.2** : Les régulateurs de croissance et des exemples de leurs principaux effets.  
(adapté de Davies, 2010; Umehara et al., 2008; He et al., 2012; Santner et Estelle, 2009)

<b>Phytohormone</b>	<b>Rôles saillants (exemples)</b>
Auxines	Impliquées dans la différenciation du tissu vasculaire, le contrôle de l'élongation cellulaire, la prévention de l'abscission, la dominance apicale et plusieurs tropismes, la libération d'éthylène, le développement des fruits
Cytokinines	Stimulent la division cellulaire, préviennent la sénescence, activent les bourgeons dormants
Gibbérellines	Démarrant la mobilisation de réserves au cours de la germination, causent l'élongation des tiges, stimulent la croissance du tube pollinique
Acide Abscisique	Maintient la dormance des semences et bourgeons, stimule la fermeture des stomates
Éthylène	Stimule le murissement des fruits climactériques, promeut l'abscission, cause la formation de l'aérenchyme en tiges submergées, détermine le sexe des cucurbitacées
Jasmonates	Impliquées dans la réponse au stress environnemental, et dans le contrôle de la germination des semences
Brassinostéroïdes	Promeuvent l'élongation, stimulent la floraison et la division cellulaire, peuvent affecter la courbature tropique
Acide Salicylique	Impliqué dans les mécanismes de défense des plantes
Oxyde Nitrique	Stimule la tolérance à l'aluminium par régulation de l'équilibre hormonal à travers la signalisation
Strigolactones	Régule l'architecture aérienne de la plante et la communication intercellulaire interspécifique

En outre, bien que les deux facteurs extrinsèques principaux qui déterminent la réponse *in vitro* d'un explant soient la composition minérale et la formulation hormonale du milieu, il n'en demeure pas moins que des interactions entre ces deux facteurs peuvent survenir et que ces interactions peuvent modifier le résultat (Jansen et al., 1990; Preece, 1995; Ramage et Williams, 2002).

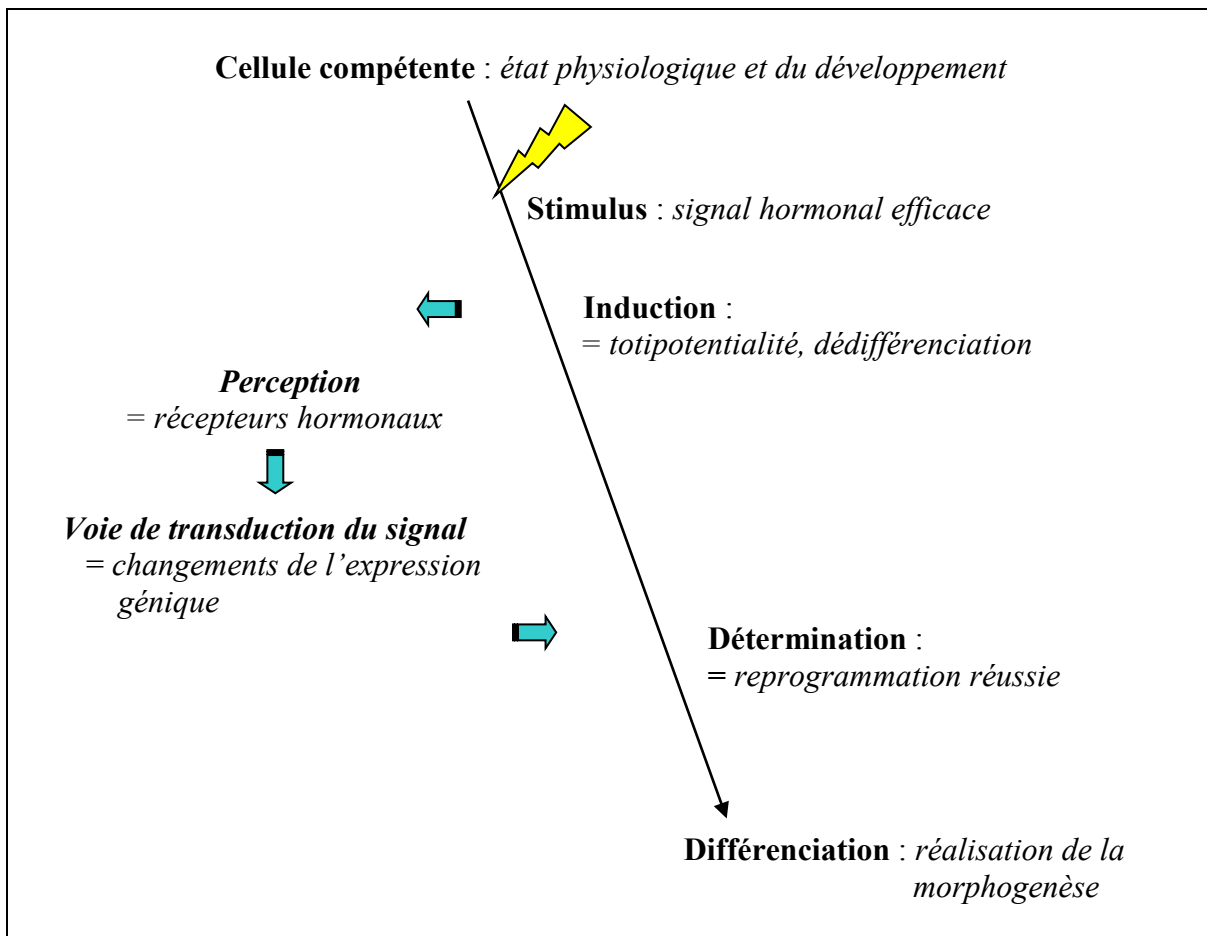
### 1.1.3.3 Compétence embryogénique de l'explant

La réponse de l'explant en CIV va dépendre d'un autre facteur clé, cette fois intrinsèque, qui est apporté par son état physiologique et de développement (Carman, 1990; Henry et al., 1994; Namasivayam, 2007). Or, ce facteur intrinsèque est aussi défini comme la « compétence morphogénétique de l'explant », à savoir sa capacité à réagir aux stimuli fournis par les conditions de culture *in vitro* et d'emprunter la voie de la morphogenèse (Jimenez, 2001).

La totipotentialité des cellules végétales est conséquence d'une caractéristique majeure des végétaux, à savoir, que la différenciation cellulaire est déterminée par la position et non par le lignage (Caboche, 2010). Ainsi, la différenciation d'une cellule végétale dans un tissu spécifique requiert des signaux émis par d'autres types cellulaires, et perçus par les cellules adjacentes. Or, c'est à cause de ce même phénomène que les cellules végétales perdent rapidement leurs caractéristiques de différenciation lorsque isolées des tissus. Cette notion de dédifférenciation est analogue à celle de compétence morphogénétique de l'explant (Preece, 2008). Ensuite, une fois ces explants exposés aux conditions environnementales adéquates, et en présence des signaux appropriés, ils seront capables de régénérer une plante (Caboche, 2010).

Ainsi, un schéma conceptuel du déroulement du processus de régénération *in vitro* considère l'existence de deux phases : l'induction et la détermination (Preece, 2008; Christianson, 1987) (Figure 1.2). Au cours de la phase d'induction, les cellules dédifférenciées acquièrent la compétence embryogénique, tandis qu'au cours de la phase de détermination les cellules embryogéniques vont exprimer leur compétence et ensuite se

différencieront en embryons (Jimenez, 2001). Ces deux phases sont proposées comme indépendantes entre-elles, et sont donc influencées par des facteurs différents (Jimenez, 2001; Namasivayam, 2007). Néanmoins, étant donné que l'induction ne se fait évidente que grâce à ses produits finaux, et que la phase de détermination précède la morphogenèse réelle, il reste que ces deux phases ne peuvent se démontrer qu'au moyen de manipulations expérimentales.



**Figure 1.2** : Modèle conceptuel de la morphogenèse proposé pour expliquer la modulation hormonale chez les plantes (adapté de Preece, 2008, et de Christianson et al., 1987).

Ainsi, on peut conclure que le développement d'un nouveau protocole de culture in vitro est de nature surtout empirique, puisqu'il s'appuie largement sur l'expérimentation (Chan, 2010). Les conditions qui mèneront à l'induction de l'embryogenèse in vitro sur des



espèces ou géotypes différents sont souvent trouvées par des expériences du type « essai et erreur » (Jacobsen 1991; Henry et al. 1994), à travers l'analyse des effets de différentes conditions de culture in vitro -notamment des régulateurs de croissance et de la régulation osmotique- sur un milieu basal adéquat (Ammirato, 1983; Armstrong and Green, 1985; Rhodes et al., 1986).

Les travaux de recherche qui sont présentés dans le cadre de cette thèse portent sur l'optimisation d'une méthode d'androgenèse par CMI pour l'orge de printemps à six rangs. Avant d'entrer dans le vif de ce sujet, nous commencerons par mettre en contexte l'espèce, autant au plan botanique qu'économique.

## 1.2 L'orge et son amélioration génétique

### 1.2.1 L'espèce

L'orge (*Hordeum vulgare* L.) est une espèce diploïde, monoïque, et autoféconde, qui appartient à la famille des *Poaceae*, et à la tribu des *Triticeae*. Plante herbacée, annuelle, domestiquée depuis plus de 10 000 ans, elle serait la plus ancienne céréale cultivée (Saisho et Purugganan, 2007).

Une caractéristique essentielle de l'espèce est son extraordinaire adaptation à des conditions extrêmes, notamment par sa précocité (90-120 jours pour certaines variétés), sa résistance à la sécheresse et à la salinité du sol (Jestin, 1992). Au Canada, 11 à 12 millions de tonnes d'orge sont produites annuellement, dont plus de 90 % sont cultivées dans l'Ouest du pays (Manitoba, Saskatchewan et Alberta). Approximativement 80 % de la production canadienne est utilisée localement pour l'alimentation animale, le reste étant destiné à un usage brassicole (Horsley and Harvey, 2011).

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 (FAOSTAT, septembre 2013). 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 %) (Tableau 1.3).

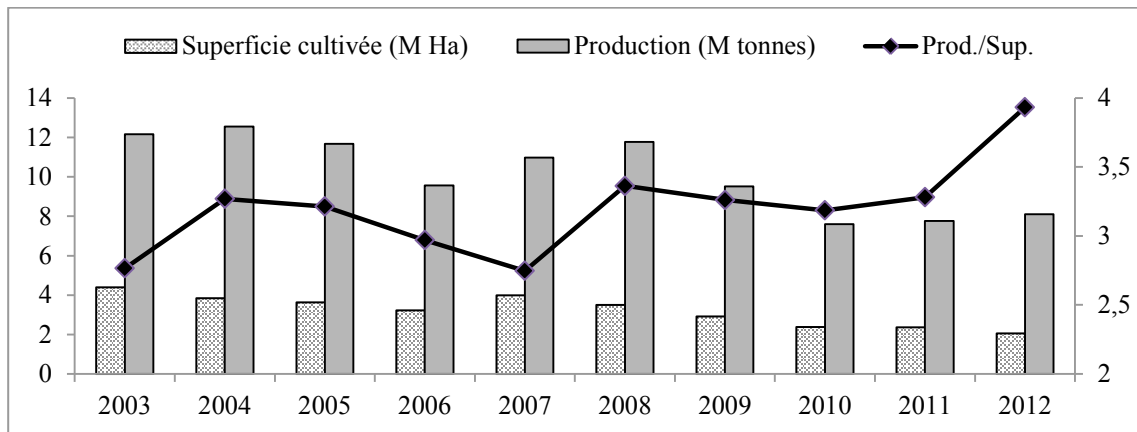
**Tableau 1.3** : Moyennes de la superficie cultivée et de la production mondiale de céréales (2010-2012) en millions d'hectares et en millions de tonnes.

	Superficie (M ha)		Production (Mt)	
Blé	218,2	31,1 %	676,1	26,6 %
Maïs	170,9	24,4 %	870,1	34,3 %
Riz	162,8	23,2 %	714,0	28,2 %
<b>Orge</b>	<b>48,4</b>	<b>6,9 %</b>	<b>129,7</b>	<b>5,1 %</b>
Sorgho	40,4	5,8 %	58,6	2,3 %
Millet	33,7	4,8 %	28,4	1,1 %
Avoine	9,5	1,4 %	21,1	0,8 %
Autres	17,3	0,03 %	38,7	1,5 %

Pour la période 2010-2012, le Canada occupe la sixième place mondiale avec une production de 7,8 millions de tonnes (Tableau 1.4). Cependant, il faut noter qu'au fil des dix dernières années, la superficie cultivée au pays a fondu de plus de la moitié (Figure 1.3), tandis que la production nationale a diminué du tiers. Cela indique qu'au cours de cette période il y a eu une amélioration de la productivité moyenne. Par ailleurs, face à la réduction de la superficie, il est clair que cela suggère que les producteurs trouvent la culture de l'orge moins attrayante que les alternatives qui s'offrent à eux. Ainsi, pour soutenir ou même rattraper l'ancien niveau de production au pays, il faudra rendre la culture de l'orge plus attrayante et la recherche peut jouer un rôle important à cet égard.

**Tableau 1.4** : Moyennes annuelles de la production d'orge par pays pour la période 2010-12 dans les dix principaux producteurs, en millions de tonnes.

	2010		2011		2012			
Allemagne	10,4	8,4 %	Féd. Russe	16,9	12,7 %	Féd. Russe	14,0	10,5 %
France	10,1	8,2 %	Ukraine	9,1	6,8 %	France	11,3	8,6 %
Ukraine	8,5	6,9 %	France	8,8	6,6 %	Allemagne	10,4	7,9 %
Féd. Russe	8,4	6,8 %	Allemagne	8,7	6,6 %	Australie	8,2	6,2 %
Espagne	8,2	6,6 %	Espagne	8,3	6,2 %	Canada	8,0	6,1 %
Canada	7,6	6,1 %	Australie	8,0	6,0 %	Turquie	7,1	5,4 %
Australie	7,3	5,9 %	Canada	7,8	5,8 %	Ukraine	6,9	5,2 %
Turquie	7,2	5,9 %	Turquie	7,6	5,7 %	Espagne	6,0	4,5 %
R.-Uni	5,2	4,2 %	R.-Uni	5,5	4,1 %	R.-Uni	5,5	4,2 %
É-U A.	3,9	3,2 %	Argentine	4,1	3,1 %	Argentine	5,5	4,2 %
Total Monde	123,7			133,0			132,4	



**Figure 1.3** : Évolution de la production, de la superficie (axe à gauche), et du ratio production/superficie (axe à droite) pour l'orge au Canada (période 2003-2012). Source : FAOSTAT (septembre 2013).

On peut distinguer deux sous-espèces d'orge, selon que l'épi porte deux ou six rangées de grain. Chez l'orge à deux rangs, *H. vulgare* ssp. *distichum*, chaque nœud du rachis compte trois épillets dont un seul est fertile et produit une graine. 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 (Blattner, 2009) (Figure 1.4).

Également, l'orge peut être classifiée en fonction de son cycle végétatif, selon qu'elle est semée à l'automne ou au printemps. Les orges d'hiver 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 le font sans ce besoin (Cockram et al., 2011).



**Figure 1.4** : Épis d'orges à deux et à six rangs. Photo : Brian Steffenson, University of Minnesota.

## 1.2.2 Méthodes d'amélioration génétique chez l'orge

En ce qui a trait à l'amélioration génétique de l'orge, il faut considérer premièrement que le type de variété rencontrée est la lignée pure, et les principaux objectifs de sélection sont l'augmentation du rendement et de la qualité (Bingham et al., 2012). Ensuite, l'orge étant une espèce autogame, les méthodes d'amélioration s'appuient sur les éléments suivants :

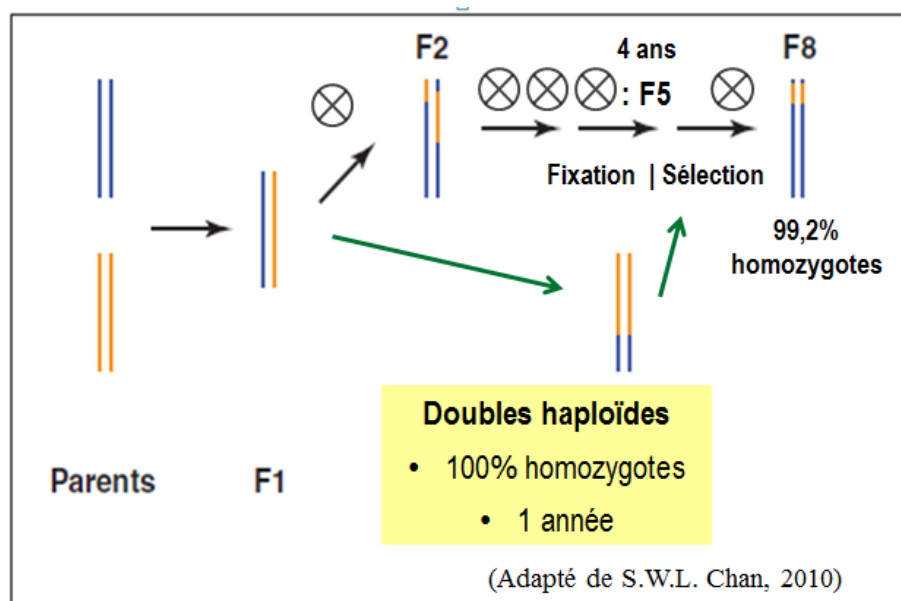
- a) L'hybridation artificielle par des croisements contrôlés entre des lignées parentales et l'obtention d'hybrides F1 qui vont produire ultérieurement de la variabilité génétique propice à la sélection
- b) Plusieurs générations d'autofécondation (couramment, 6 à 8) des hybrides F1, qui s'ensuivront pour constituer la phase de fixation des nouvelles combinaisons d'allèles dans les progénitures
- c) Des cycles d'évaluation au champ et de sélection massale pendant trois à cinq ans à partir de la F3 ou F4, pendant lesquels le matériel le plus prometteur sera identifié et réservé pour le cycle suivant (Charalampos et al., 2012).

Ainsi, l'amélioration génétique chez l'orge dépend de la sélection de types supérieurs parmi l'ensemble des progénitures des croisements initiaux, dès qu'ils sont génétiquement stabilisés (Ramage, 1987). Il faudrait remarquer qu'à cause du biais engendré par la sélection trop précoce au sein de matériels encore hétérozygotes, ce n'est qu'à compter des générations F5 ou F6 que le niveau d'homozygotie est suffisant pour commencer l'estimation de la valeur des lignées (Jestin, 1992).

L'homozygotie confère la stabilité et l'uniformité phénotypique, et rend ainsi prévisible le comportement agronomique des lignées. Une homozygotie élevée est exigée pour l'enregistrement de nouveaux cultivars (Devaux et Pickering, 2005), et elle permet, en même temps, de réduire la fréquence d'allèles indésirables pendant la phase de sélection. Parmi les mécanismes naturels, l'autofécondation est la voie qui conduit à l'homozygotie le plus rapidement : dans la progéniture d'un individu hétérozygote (issu d'un croisement contrôlé), elle augmente en moyenne du 50 % à chaque génération. Or, sous un schéma

d'amélioration conventionnelle, entre six et huit générations d'autofécondation sont nécessaires pour atteindre un niveau d'homozygotie quasi-totale (par exemple, > 98 %).

C'est dans ce contexte que les techniques d'haploïdisation offrent un bénéfice important pour l'amélioration génétique chez l'orge, puisqu'elles permettent d'obtenir des génotypes complètement homozygotes en quelques mois (Forster et al., 2007; Asif, 2013). Ce bénéfice se traduit autant par le raccourcissement de la durée du cycle d'amélioration que par une totale homozygotie des lignées haploïdes-doublées (HD) (Dunwell, 2010; Germanà, 2011) (Figure 1.5).



**Figure 1.5** : Schéma de l'amélioration conventionnelle, et par HD, chez l'orge. À partir d'un croisement F1, les HD évitent plusieurs cycles d'autofécondation, et l'homozygotie des progénitures est parfaite (100 %)

### 1.2.3 Avantages de l'utilisation de doubles-haploïdes

Les plantes HD sont des lignées parfaitement homozygotes issues de gamètes haploïdes au moyen des méthodes biotechnologiques (Snape et al., 1986; Hussain et al., 2012), notamment, par androgenèse. Les HD constituent la route la plus courte vers l'homozygotie, car elles permettent de fixer « instantanément » le génotype d'un produit méiotique obtenu à partir d'un hybride hétérozygote (Dunwell, 2010), là où 8 ou 10 générations seraient nécessaires si c'était par autofécondation (Oleszczuk et al., 2006 ; Rajcan et al., 2011; Hussain et al., 2012).

Au plan théorique, les avantages des lignées DH pour une espèce autogame comme l'orge, sont (Bjornstad et al., 1993) :

- 1) La fixation immédiate de génotypes homozygotes et l'élimination de la variabilité génétique non-additive,
- 2) Le temps économisé dans la création de cultivars, qui permet une augmentation du gain génétique.

Or, sur le plan des applications pratiques, les lignées HD s'avèrent un matériel expérimental attrayant pour l'amélioration des variétés fixées et hybrides (Morrison and Evans, 1988; Morrison *et al.*, 1991; Baenziger, 1996; Germanà, 2011), car elles permettent d'accélérer les travaux d'amélioration génétique ainsi que de réduire leurs coûts (Guha and Maheshwari, 1964; Brown and Thorpe, 1995; COST Action 851, 2006; Ferrie and Caswell, 2011).

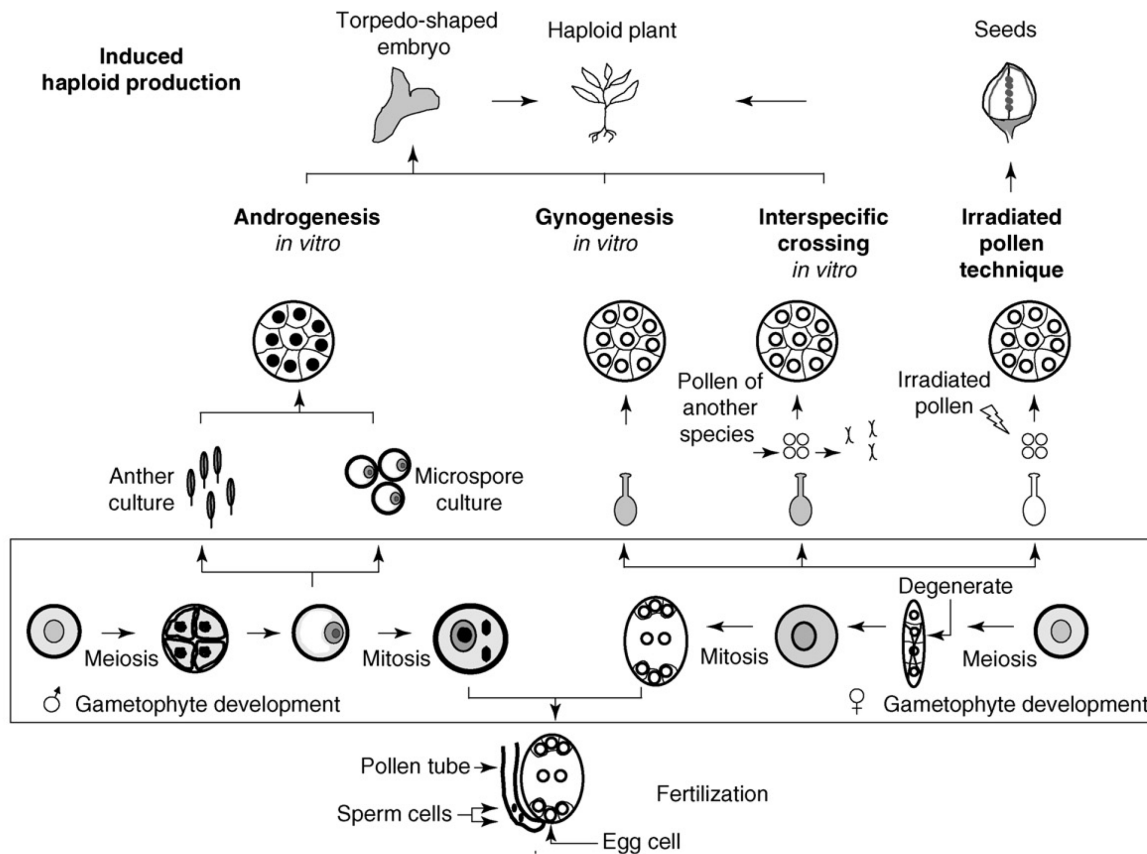
Outre leur intérêt en amélioration génétique, les plantes HD peuvent avoir une grande valeur également dans le cadre d'études génétiques fondamentales. Par exemple, les populations de lignées HD sont extrêmement utiles pour identifier et cartographier des marqueurs moléculaires liés à des gènes d'intérêt tels que le rendement, la qualité, et la résistance aux maladies (Gallais, 1990; Graner, 1996; COST Action 851, 2006; Hussain et al., 2012).



À présent, on estime que les HD ont eu un impact important au sein de l'industrie semencière et pour l'illustrer il est éclairant de savoir que 50 % des cultivars d'orge enregistrés en Europe en 2006 étaient des HD (Forster et al., 2007; Asif, 2013). Ainsi, les HD auraient permis d'accroître le développement de variétés, d'économiser des ressources économiques, du travail et des années d'amélioration (Germanà, 2011; Ferrie et Caswell, 2012; Rajcan et al., 2011). De même, au plan institutionnel, l'importance des HD est illustrée de par les initiatives d'organisations internationales. Par exemple, l'UE a organisé le programme de recherche COST Action 851, « Gametic cells and molecular breeding for crop improvement » qui a regroupé 26 pays et qui s'est déroulé entre 2001 et 2006. Dans le rapport final de cette initiative on trouve la liste de presque 300 variétés HD inscrites pour douze espèces cultivées (<http://www.scri.ac.uk/assoc/COST851/Default.htm>). Parallèlement, autant l'Organisation des Nations Unies pour l'agriculture et l'alimentation (FAO), que l'Agence Internationale de l'Énergie Atomique ou le CIMMYT ont, pour leur part, organisé des programmes et des activités pour contribuer à la recherche dans le domaine, ainsi qu'au transfert de résultats vers le secteur publique.

#### **1.2.4 Méthodes d'obtention d'haploïdes doublés**

L'objectif principal de la production de HD est d'obtenir des lignées pures, 100% homozygotes, en une seule génération. La Figure 1.6 illustre des méthodes d'obtention de HD chez les céréales. Des haploïdes peuvent être induits via la culture in vitro d'anthères ou de microspores (androgenèse), d'ovules ou d'ovaires (gynogenèse), via des croisements interspécifiques et en utilisant du pollen irradié (Forster et al., 2007). La technique du pollen irradié et la gynogenèse n'ont pas connu de succès dans un contexte de production à grande échelle, tandis que les méthodes basées sur l'androgenèse et la méthode de croisements distants présentent une efficacité beaucoup plus grande, et sont les plus utilisées au présent en production commerciale de HD.



**Figure 1.6 :** Méthodes d'obtention de HD chez les céréales qui ont recours à la culture in vitro (adapté de Forster et al., 2007).

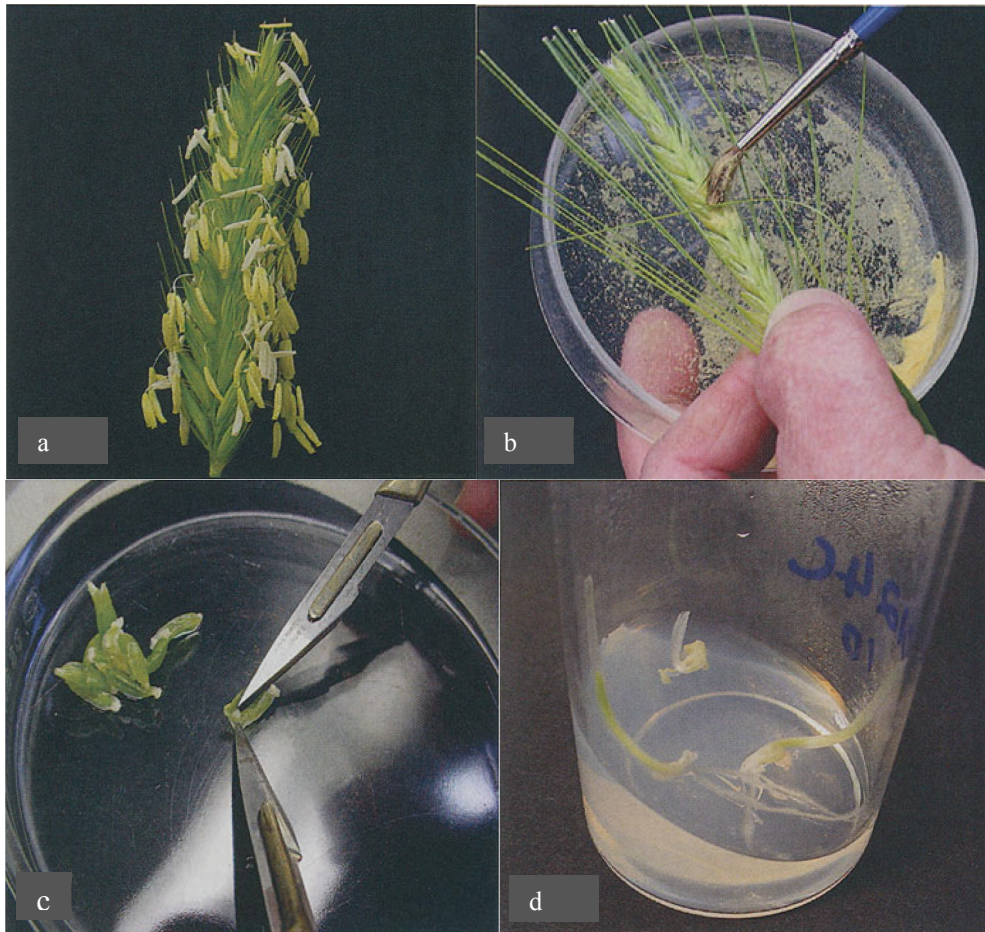
Ainsi, chez l'orge, les plantes HD sont efficacement obtenues par trois méthodes :

- 1) À partir de croisements interspécifiques avec le *Hordeum bulbosum* L. (CI),
- 2) Par culture d'anthères (CA), ou
- 3) Par culture de microspores isolées (CMI)

#### 1.2.4.1 Méthode des croisements interspécifiques (CI)

La méthode CI 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 (Figure 1.7). 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 (Devaux and Kasha, 2009). Au total, selon les deux génotypes parentaux ainsi que les conditions environnementales, entre 10-30 % des fleurs pollinisées peuvent former des HD (Houben et al., 2011).



**Figure 1.7** (a-d) : Quelques-unes des étapes de la méthode bulbosum. a : épi de *H. bulbosum* prêt pour récolter le pollen; b : pollinisation chez *H. vulgare*; c : prélèvement d'embryons haploïdes 12-14 jours plus tard; d : embryons cultivés in vitro, en germination. (Source : Devaux, 2003)

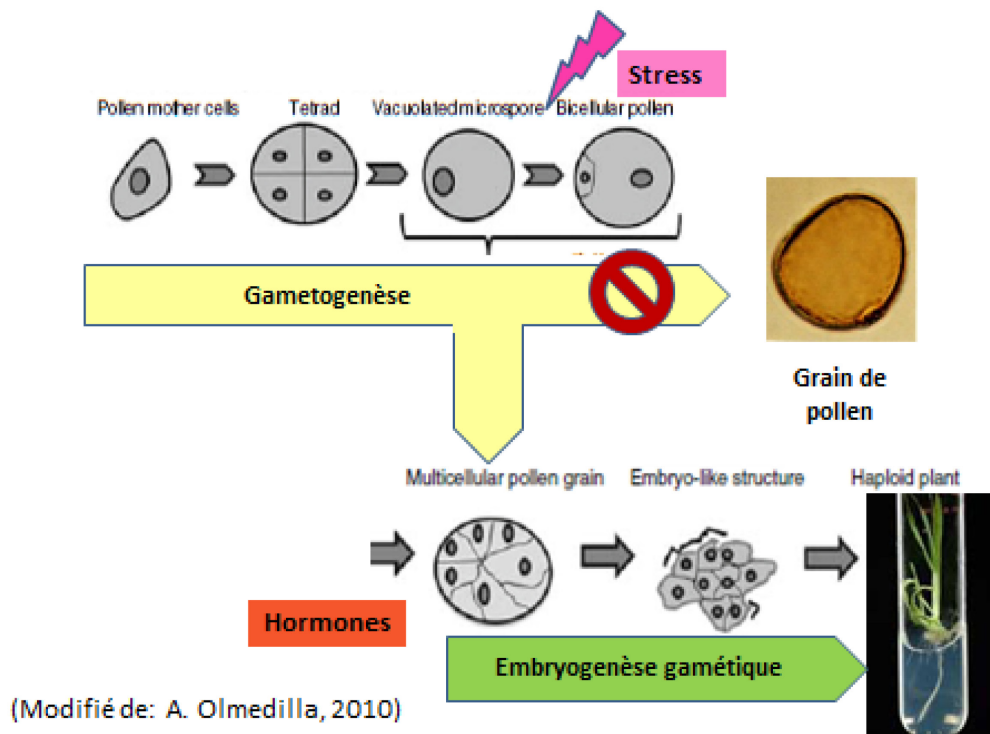
En date de 2008, il avait été rapporté que la méthode bulbosum avait généré le plus de cultivars d'orge par rapport aux autres méthodes existantes (Rajcan et al., 2011). Pourtant, à cause des dernières améliorations et de la diffusion récente des méthodes d'androgénèse in vitro cette méthode a été largement surpassée par la CA et la CMI, et on voit à présent que ces dernières peuvent être utilisées couramment d'une façon plus efficace (Wedzony et al., 2009). Il reste que la méthode bulbosum peut être appelée à jouer un rôle, en particulier chez les génotypes qui s'avèrent récalcitrants à la production des HD par la voie de l'androgénèse (Kahani et al., 2012). De plus, elle offrirait un autre avantage, soit un plus faible biais de ségrégation que celui qui a été observé chez les progénitures HD obtenues via d'autres méthodes (Schön et al. 1990; Devaux et al. 1996 ; Houben et al., 2011).

#### 1.2.4.2 Méthode de culture d'anthères (CA)

Depuis peu, il est considéré que les techniques de CA et de CMI dominent la création de cultivars chez l'orge (Devaux and Kasha, 2009). Parmi ces deux techniques, jusqu'à récemment c'est la CA qui a été la plus fréquemment utilisée pour la production de HD à cause de sa simplicité, sa rapidité, et sa plus faible demande en équipement (Jähne et Lörz. 1995; Mirzaei et al., 2011).

La méthode CA a été développée à partir des travaux de Guha et Maheshwari (1964; 1966) sur l'obtention d'embryons haploïdes de *Datura* par la culture in vitro des anthères. Chez l'orge, c'est Clapham (1973) qui a été le premier à rapporter l'obtention de plantes haploïdes par CA. Au fil du temps l'efficacité de la technique s'est beaucoup améliorée (Pickering et Devaux, 1992 ; Devaux et Kasha, 2009), et des protocoles assez performants pour être utilisés dans le cadre des projets d'amélioration génétique sont disponibles à présent (Jacquard et al. 2003; Cistué et al. 2003; Szarejko 2003).

Essentiellement, un protocole de CA consiste d'abord à cultiver les plantes mères dans de conditions optimales de nutrition minérale, illumination, température et humidité. Ensuite, une fois l'épiaison commencée, les tiges sont récoltées contenant des épis dont les anthères contiendraient des microspores à un état précis du développement, le stade uninucléé moyen ou tardif. Avant de les mettre en culture in vitro, une phase de stress leur sera appliquée (Devaux and 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 à former des grains de pollen, vers l'embryogenèse gamétique et donc la régénération in vitro de plantes (Touraev et al., 2001) (Figure 1.8).

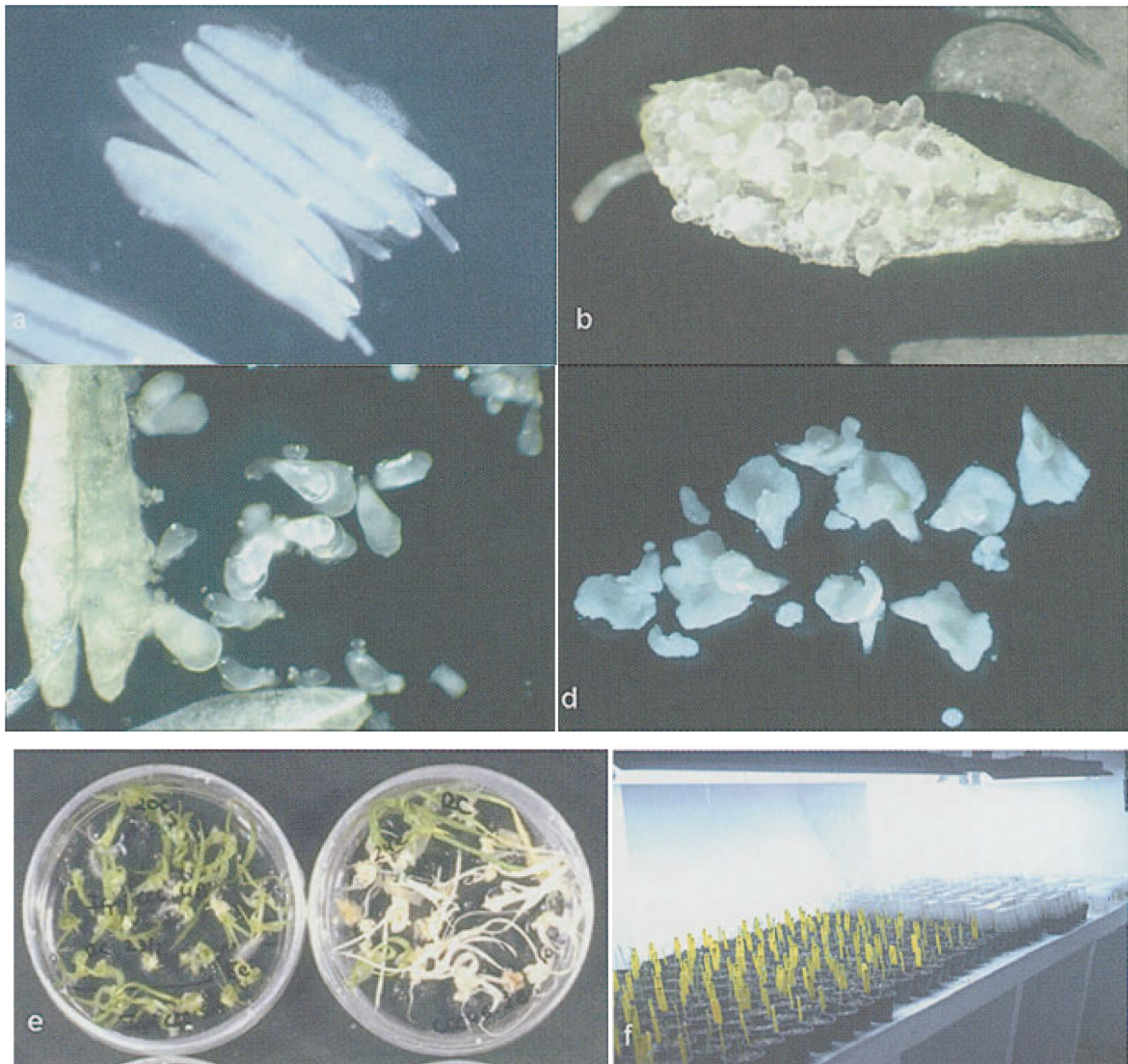


**Figure 1.8:** Commutation de la gamétogenèse vers l'embryogenèse chez les microspores. Une phase de stress est essentielle avant la phase de culture in vitro.

Chez l'orge, les types de stress les plus couramment utilisés en CA sont : un prétraitement au froid (« cold shock », Devaux et Kasha, 2009) ou un choc osmotique avec une privation de nutriments (Hoekstra et al., 1993; Cistué et al., 1994). Dans le premier cas, des tiges fraîchement récoltées sont généralement entreposées à 4 °C pour une durée de 28 jours (Hunter, 1988), tandis que dans le second cas, le prétraitement consiste à incuber les épis dans une solution de mannitol 0,30-0,70 M à 26-28 °C pendant 3-4 jours (Hoekstra et al., 1993; Cistué et al., 1994).

Après le prétraitement, dans des conditions stériles, les anthères sont extraites et placées dans un milieu dit « d'induction » comme, par exemple, le FHG mis au point par Hunter (1988) ou le BAC3 (Szarejko and Kasha, 1991), et incubées à 26-28 °C à l'obscurité. Entre 3 et 5 semaines plus tard, les embryons de plus de 1 mm de taille sont transférés vers un milieu dit « de régénération », qui comportera des composantes minérales et organiques

égales ou semblables au milieu d'induction, sauf pour une réduction du sucre et, surtout, des régulateurs de croissance (Devaux et Kasha, 2001) (Figure 1.9).



**Figure 1.9** : Culture d'anthères chez l'orge. a : anthères post-prétraitement dans le mannitol pendant 4 jours; b : embryons après 12-14 jours en milieu d'induction; c : embryons après 18-20 jours en milieu d'induction; d : embryons bien développés avant leur transfert au milieu de régénération; e : plantes vertes et albinos en milieu de régénération; f : plantes prêtes pour le transfert au sol (post-acclimatation). (Source : Devaux, 2003).

Ensuite, les embryons en phase de régénération sont exposés à une illumination douce, et une fois que les plantules ont atteint le stade 3-4 feuilles, elles peuvent être transférées dans un terreau pour démarrer la phase ex vitro. Éventuellement, une phase d'acclimatation, dans une chambre humide pendant 4-8 jours, pourrait s'imposer afin de réduire la mortalité des plantes.

Des comparaisons directes et récentes de l'efficacité des deux méthodes sont rares dans la littérature. Toutefois, le sujet a été abordé par Foroughi-Wehr et al. (1981), qui ont comparé le nombre de plantes obtenues par épi traité sur un ensemble de croisements, et ont conclu que les fréquences de plantes produites à travers chaque méthode étaient significativement corrélées ( $r= 0,79$ ). Dans le même sens, en 1987 Devaux a rapporté que le nombre de plantes vertes obtenues par épi traité par la méthode CA était semblable à celui obtenu par la méthode CI (0,7 et 1,0 plante verte/épi, respectivement). Parallèlement, Bjornstad et al. (1993) ont déterminé que même si les deux méthodes ne comportent pas la même demande méthodologique, elles restent équivalentes au point de vue de leur utilité en amélioration génétique. De même, les coûts de production (par lignée HD) au moyen ces deux méthodes se sont ressemblés pendant quelques années (Pickering and Devaux, 1992; Kasha and Maluszynski, 2003).

Vers le tout début de ce siècle, la CI et la CA étaient considérées semblables à l'égard de leur efficacité. Cependant, depuis, des améliorations techniques ont été apportées aux deux méthodes, lesquelles ont fait bondir leur productivité. Ainsi, par exemple pour la méthode bulbosum il a été démontré qu'une pulvérisation avec une solution contenant des phytohormones (acide gibbérellique et auxines) favorisait la récupération d'embryons (Houben et al., 2011), tandis que pour la CA, le remplacement du saccharose par le maltose a beaucoup amélioré son taux de succès (Devaux et Pickering, 2005). Il est ainsi que, plus récemment, on s'attendait à ce que la méthode CA remplace graduellement la CI et, de même, que la CMI, à son tour, remplace la CA (Devaux et Kasha, 2009; Houben, 2011).



Les caractéristiques propres de la CI qui sont absentes chez le CA sont, notamment, une moindre distorsion de la ségrégation (Kleinhofs et al., 1993; Devaux et al. 1996) et une influence moins marquée du génotype sur la production de plantes (Choo and Kasha, 1987). Particulièrement cette dernière fait de la CI une méthode alternative de production de HD pour les génotypes récalcitrants (Devaux et Kasha, 2009).

L'effet du génotype sur la régénération des HD a souvent été considéré comme déterminant (Kasha et al., 2001; Oleszczuk et al., 2006; Rajcan et al., 2011; Muñoz-Amatriain et al., 2009; Kahrizi and Mirzaei, 2012). Par exemple, les orges du type printemps sont souvent caractérisées par une réponse moins favorable à l'androgénèse que celles du type automne (Lu et al., 2008; Torp and Andersen, 2009; Devaux and Kasha, 2009). En ce qui a trait à l'albinisme, malgré l'existence de plusieurs études et d'une expérimentation approfondie, ce désordre est toujours limitant pour la production de HD par androgénèse (Devaux et Pickering 2005; Atanassov et al., 2009). Des différences au niveau de la différenciation des proplastides, du développement du thylakoïde et son contenu en ADN, ainsi qu'en ce qui a trait à la capacité des cellules à se diviser ont été répertoriées entre cultivars qui régénèrent des proportions contrastantes de plantes albinos (Datta, 2005). Par rapport aux orges à deux rangs, celles à six rangs présentent une plus haute fréquence d'albinisme en production de HD (Cistué et al., 1999; Marchand et al., 2008); cette proportion est parfois si forte que seulement des plantes albinos sont régénérées (Weyen, 2009). Ensemble, ces deux contraintes font des orges de printemps à six rangs le matériel le moins productif en androgénèse.

#### 1.2.4.3 Méthode de culture de microspores isolées (CMI)

Selon Shim et Kasha (2003), les limitations imposées par le génotype vis-à-vis de la régénération in vitro en CA pourraient être surmontées au moyen de la CMI. Des résultats qui vont dans le même sens sont rapportés par Li et Devaux (2005). En effet, ils ont réussi à régénérer des plantes vertes par CMI sur deux génotypes récalcitrants, là où la CA avait échoué.

On peut constater, d'après les plus récents travaux, que la CMI serait la méthode qui offre le plus grand potentiel de production de plantes HD, autant en termes de l'échelle de production envisageable, qu'en termes de l'efficacité de la procédure (Davies et Morton, 1998; Li and Devaux, 2005; Mirzaei et al., 2011). En effet, la CMI permet l'établissement rapide de grandes populations de microspores unicellulaires et haploïdes qui montrent un haut niveau de synchronicité (Li et Devaux, 2005). En raison du fait qu'elles ont été isolées des anthères, ces microspores sont moins sujettes aux interactions avec d'autres organes ou tissus (Shim et Kasha; 2003), ce qui permet de mieux maîtriser les dispositifs expérimentaux utilisés autant en recherche qu'en production massive de plantes HD.

La CMI ressemble à la CA en ce qui a trait au besoin d'avoir des plantes-mères d'excellente qualité, à la récolte de tiges comportant des microspores à un stade approprié, à l'application d'une phase de stress afin de reprogrammer leur morphogenèse, et à l'utilisation des milieux d'induction et de régénération adéquats. Pour l'essentiel, la méthode CMI diffère de la CA, soit le moment où les microspores sont isolées des anthères (Devaux and Kasha, 2009), et la quantité, bien plus importante, de microspores qui peuvent être mises en culture en un temps plus court (Li et Devaux, 2005)(Figure 3.5). Ainsi, les épis sont extraits des tiges récoltées et prétraitées et, après une désinfection superficielle, ils sont découpés en morceaux de 2-3 cm et broyés, filtrés pour séparer les gros débris et lavés dans une solution tampon, avant de procéder à une sélection des microspores embryogéniques au moyen d'une centrifugation en gradient discontinu (Devaux and Pickering, 2005). Ce système permet d'isoler les microspores compétentes à la régénération (Wenzel et al. 1975; Bedinger and Edgerton, 1991). Un protocole détaillé de la CMI chez l'orge a été décrit par Kasha et al. (2001) ainsi que par Maluszynski et al. (2003).

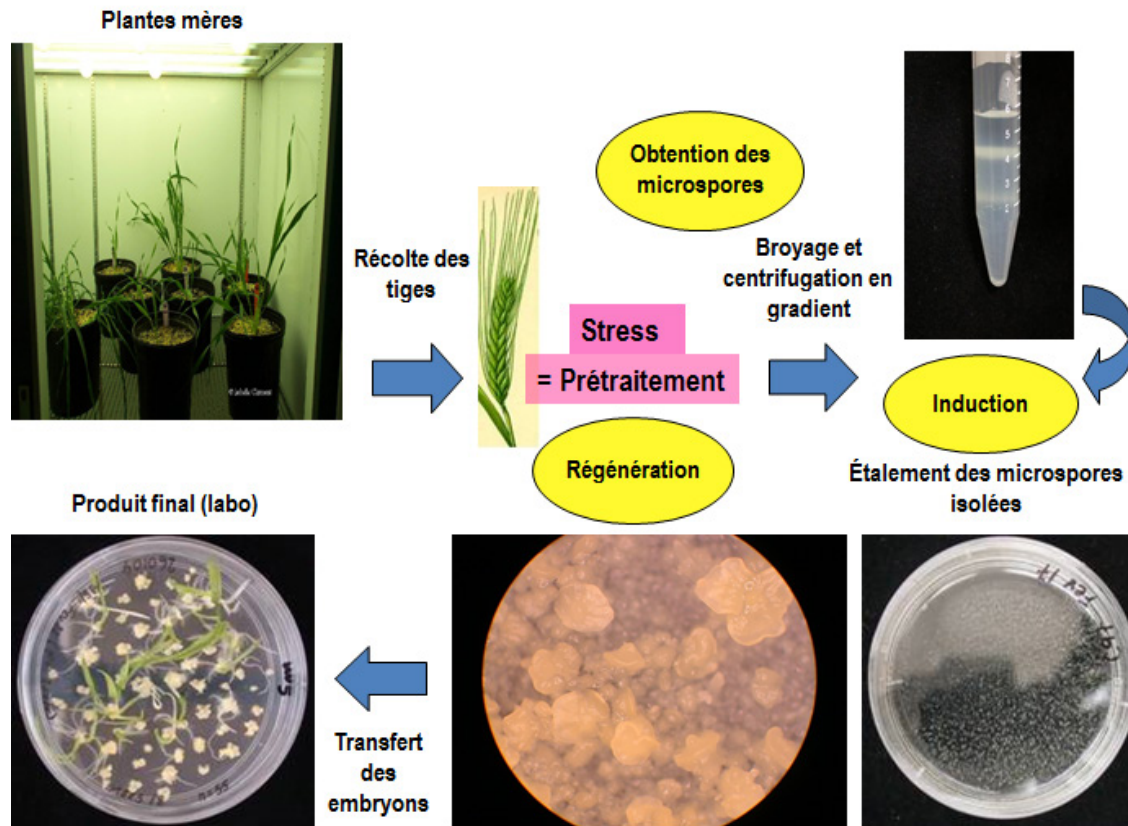
En termes d'efficacité, la CMI s'avère bien plus avantageuse que la CA. Par exemple, Hoekstra et al. (1992), avec le cultivar Igri, ont régénéré cinq fois plus de plantes vertes en CMI qu'en CA. De manière semblable, en utilisant six cultivars d'orge, Li et Devaux (2005) ont régénéré en moyenne 9,3 fois plus de plantes vertes par CMI que par CA. D'ailleurs Davies and Morton (1998), et Kasha et al. (2001) ont régénéré plusieurs

centaines, voire quelques milliers, de plantes vertes avec de nombreux génotypes, parmi lesquels certains étaient considérés comme récalcitrants.

### **1.2.5 Les étapes clés d'un protocole CMI**

La voie morphogénétique qui conduit vers la régénération d'une plantule à partir d'un grain de pollen immature a été nommée « embryogenèse gamétique » (COST Action 851, 2004). Bien que la technique de CMI soit potentiellement plus efficace que la CA, elle est aussi plus complexe au plan technique que cette dernière. Les étapes essentielles qui caractérisent la CMI (Figure 1.10) sont :

- a) L'obtention d'épis avec des microspores au bon stade de développement
- b) Le prétraitement chimique ou physique pour reprogrammer la morphogenèse
- c) L'extraction et l'isolement des microspores
- d) La culture des microspores sur un milieu d'induction de composition adéquate
- e) La régénération d'embryons
- f) Le prélèvement des jeunes plantules et leur acclimatation avant leur transfert en serre ou champ.



**Figure 1.10** : Les grandes étapes d'un protocole CMI. En haut, de gauche à droite : Des tiges sont récoltées comportant des épis qui seront prétraités. Ensuite, les microspores seront extraites par une séquence de broyage-filtration-centrifugation en gradient, pour les étaler dans le milieu d'induction (en bas, à droite). Après 15-18 jours, les embryons seront transférés vers le milieu de régénération, où ils deviendront des plantes (vertes ou albinos) (en bas, à gauche). Adapté de Kasha et al., 2001.

Le présent travail de recherche vise à cibler les étapes a – e, afin d'identifier, puis de maîtriser, les facteurs physiques et chimiques clés d'un protocole CMI qui déclenchent l'embryogenèse gamétique et la récupération de plantes vertes HD, particulièrement chez des orges de printemps à six rangs. Conceptuellement, les étapes signalées constituent un « cycle » où les produits de sortie d'une deviennent les matières premières de la suivante. Or, afin d'optimiser l'efficacité globale, nos travaux d'expérimentation visent à maximiser le taux de succès à chacune d'entre elles.

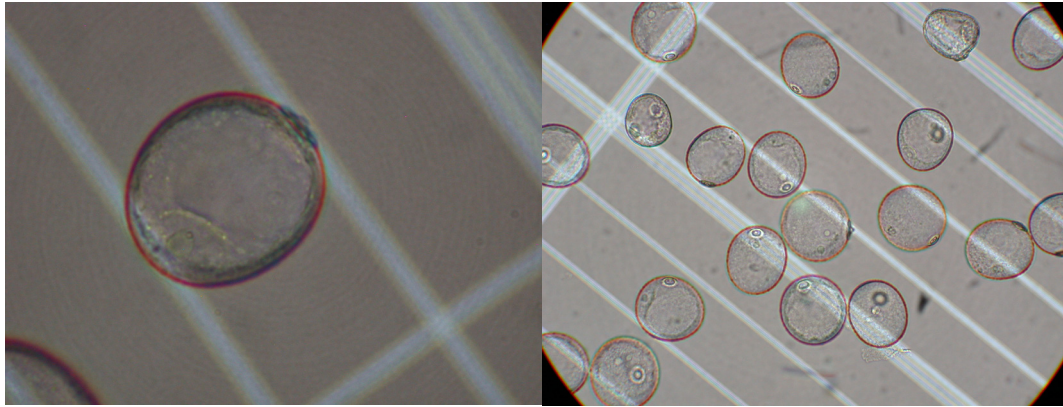
Selon la littérature, l'obtention d'épis portant des microspores au bon stade de développement est un prérequis essentiel pour avoir du succès en CMI (Weyen, 2009). Ce fait a été reconnu tôt par Weathley et al. (1985), et ces auteurs ont développé un indicateur pour définir le moment optimal de récolte, indiqué par la distance entre la ligule de la feuille étendard et la ligule de la deuxième feuille. Ils ont établi une corrélation satisfaisante entre la distance inter-ligulaire et la présence de microspores au stade recherché. La majorité sinon la totalité des travaux qui ont été publiés depuis ont adopté cette méthode pour définir le moment de récolte des tiges (Atanassov et al., 1995; Kasha et al., 2001; Oleszczuk et al., 2006; Rajcan et al., 2011).

À propos de la phase de prétraitement, tout comme en CA, un prétraitement adéquat est nécessaire pour qu'une fraction de la population des microspores soit amenée à modifier son programme morphogénétique initial pour démarrer l'embryogenèse gamétique. Le facteur déclencheur de cette réorientation du développement est le stress (Jähne and Lörz 1995; Touraev et al. 1997; Oleszczuk et al., 2006). On trouve une grande diversité d'agents stressants qui ont été appliqués avec succès sur des tiges, épis et aussi sur des microspores isolées chez l'orge. Parmi ceux-ci, notons le froid, la chaleur, la privation nutritionnelle et certaines substances chimiques (Davies et Morton, 1998; Roberts-Oehlschlager et Dunwell, 1990; Ziauddin et al., 1990; Li et al., 1995; Li et Devaux, 2001; Zheng et al., 2001). Comme en CA, les méthodes les plus utilisées sont le « choc de froid » (Jähne-Gartner and Lörz 1995; 1999) et le « choc osmotique » (Ziauddin et al. 1992; Hoekstra et al., 1992), ce dernier étant parfois combiné avec celui de froid (Hoekstra et al. 1997; Caredda et al. 1999).

Certains auteurs pensent que la proportion élevée de plantes albinos serait causée par les prétraitements (Oleszczuk et al. 2006). Pourtant, Li et Devaux (2001) ont montré que le type de prétraitement affectait le taux de régénération mais pas la proportion de plantes albinos. Néanmoins, Kasha et al. (2001) ont spéculé que c'est l'application adéquate du bon prétraitement qui pourrait fournir une solution pour surmonter le problème de la dépendance du génotype en androgenèse. La grande variabilité de résultats rapportés dans la littérature pourrait bien être attribuée au fait que la phase de stress permettant de

reprogrammer les microspores varie non seulement selon l'espèce en question, mais aussi avec le génotype (Maraschin et al., 2005; Shariatpanahi et al., 2006). Malgré une littérature relativement abondante sur le sujet, très peu de travaux ont été réalisés chez l'orge de printemps à six rangs, le type d'orge le plus répandu au Québec.

Après l'application d'une phase de stress, seulement une fraction des microspores sera amenée à suivre la voie embryogénique. La purification et la mise en culture de microspores compétentes sont donc des phases critiques en vue du développement embryonnaire et de la régénération de plantes (Li et Devaux, 2003). Les microspores compétentes possèdent une forme parfaitement ronde et sont de grande taille, elles montrent un cytoplasme clair, une mince couche d'intine, et une grande vacuole en position centrale (de Faria Maraschin, 2005). Cet état particulier est facilement reconnu par une coloration des parois qui tend vers le brun-rouge sous le microscope optique (Figure 1.7). Finalement, au stade de développement recherché, le noyau est situé à l'opposé du pore de la microspore (Wheatley et al., 1986; Kasha et al., 2001b). Ces caractéristiques particulières des microspores embryogéniques permettent de les séparer de l'ensemble au moyen d'une centrifugation différentielle en gradient discontinu. Divers protocoles pour l'isolement des microspores ont également été décrits dans la littérature, la majorité faisant appel à un gradient à base de maltose 20 % et mannitol 0,30 M (Wenzel et al., 1975; Mordhorst and Lörz 1993), les autres utilisant un gradient de percoll (10 à 30 % ; Olsen, 1991).



**Figure 1.11** : Caractéristiques des microspores embryogéniques d'orge, sous le microscope optique, après l'isolement par centrifugation en gradient de maltose/mannitol. Leur forme ronde, grande taille relative ( $\sim 50 \mu\text{m}$ ), couleur rougeâtre ainsi que la position du noyau opposé au pore ont été rapportés comme des indicateurs de compétence à la régénération.

Après avoir isolé convenablement les microspores embryogéniques, leur étalement à une densité adéquate doit suivre. Les travaux faisant référence à l'impact de la densité des microspores en culture chez l'orge sont peu nombreux, et ceci surtout chez les orges de printemps à six rangs. Certains travaux rapportent une forte corrélation positive entre la réponse embryogénique et la densité des microspores en culture (Hoekstra et al., 1993; Davies and Morton, 1998; Castillo et al., 2000), mais les valeurs optimales rapportées diffèrent considérablement. De plus, la gamme de densités explorées n'est souvent pas très grande. En même temps, Ferrie and Caswell (2011) la considèrent comme un facteur important qui doit être ajusté pour réussir un protocole CMI.

D'autres facteurs clés ont été identifiés pour la réussite d'un protocole CMI, parmi lesquels les conditions de culture (Jähne et Lorz, 1995; Kasha, et al., 2001; Forster et Thomas, 2004). Même s'ils ont fait l'objet de plusieurs recherches, il n'existe pas de consensus clair à propos de la composition hormonale optimale des milieux d'induction et de régénération. Aux débuts du développement de la CMI chez l'orge, Hunter (1988) a utilisé un milieu d'induction contenant 1 mg/l de l'auxine AIA (acide indole-acétique) pour comparer cinq cytokinines ajoutées. Il a conclu qu'il existait des différences en androgenèse qui leur étaient attribuables, et c'est le BAP qui avait fourni le meilleur résultat. Ensuite, sur un milieu contenant 1 mg/l de BAP, il a comparé quatre auxines, pour conclure que l'AIA

présentait la meilleure réponse. Pourtant, comme il a constaté ultérieurement une corrélation négative entre la concentration d'AIA (entre 0 et 1 mg/l) et la régénération de plantes vertes, il a conclu qu'un milieu d'induction optimal ne contiendrait que la cytokinine BAP à raison de 1 mg/l. C'est ainsi qu'a été mis au point le milieu FHG, l'un des plus couramment utilisés en androgenèse chez l'orge partout au monde (Devaux, 2005).

Depuis, la controverse à propos de la composition hormonale du milieu d'induction ne s'est jamais arrêtée. Pour certains (e.g. Hoekstra et al. 1997), la composition hormonale serait un facteur clé de la réussite en androgenèse, alors que pour d'autres auteurs (e.g. Olmedilla et al. 2010), les phytohormones ne sont pas nécessaires pour induire l'embryogenèse chez les microspores. Or, à présent, on trouve une grande variété de protocoles qui considèrent l'utilisation soit d'une cytokinine seule (Jahne and Lörz, 1993), soit d'une auxine seule (Cistué et al., 1999), ou bien l'inclusion des deux (Devaux and Pickering, 2005). À nos yeux, cette controverse et la grande variabilité de résultats publiés signalent qu'il pourrait s'avérer utile d'expérimenter avec des nouvelles formes d'hormones végétales et différentes combinaisons d'auxines et de cytokinines lors de la recherche d'un protocole CMI efficace pour des génotypes d'orge dits récalcitrants.

Parmi les conditions de culture des microspores, certains auteurs ont rapporté que le potentiel osmotique du milieu d'induction pouvait s'avérer important (Hoekstra et al. 1992; Wojnarowicz et al. 2004). En effet, ils ont observé une forte augmentation du nombre d'embryons (ou ELS de l'anglais « embryo-like structure ») ainsi que du nombre et de la proportion de plantes vertes lorsque le potentiel osmotique du milieu d'induction était augmenté. Malgré ces quelques travaux, cette pratique n'est pas très répandue et il pourrait s'avérer intéressant de l'évaluer chez les orges de printemps à six rangs.

Finalement, à propos des conditions de culture des embryons en CMI, on trouve très peu d'articles rapportant des travaux visant l'optimisation du milieu de régénération. Pourtant, Castillo et al. (2000) ont conclu qu'il s'agissait d'un facteur qui affecte la récupération de



plantes régénérées ainsi que leur vigueur. À cet égard, depuis les travaux de Foroughi-Wehr et al. (1976) jusqu'à ceux plus récents de Devaux et Pickering (2005), on trouve un consensus à l'effet qu'il est souhaitable de réduire les quantités de sucre et d'hormones à cette étape du processus. Pourtant, si l'on considère que l'embryogenèse et la germination des embryons sont deux processus ayant une base physiologique différente, on pourrait penser que leur régulation hormonale diffère elle aussi. Ainsi, il pourrait s'avérer utile d'explorer différents milieux de régénération.

### **1.3 Hypothèse et objectifs**

Bien que le processus d'embryogenèse gamétique ait été décrit dans plus d'une centaine d'articles scientifiques au cours des 30 dernières années, les processus biologiques qui rendent possible cette embryogenèse et l'obtention éventuelle de plantes haploïdes demeurent encore mal connus. C'est probablement pourquoi il existe toujours certaines limitations à l'application de la CMI, notamment chez les orges de printemps à six rangs, dont les principales sont une faible fréquence d'induction de l'embryogenèse, des problèmes morphogénétiques survenant lors de la régénération, et la grande proportion de plantes albinos obtenues (Lörz et al., 1988; Kasha et al., 2001; Datta, 2005; Lu et al., 2008; Torp and Andersen, 2009).

Nous posons comme première hypothèse générale qu'il est possible d'améliorer l'efficacité de la culture de microspores isolées chez les orges de printemps à six rangs en optimisant des étapes-clés de ce processus. Conséquemment, l'objectif général des travaux de cette thèse est de développer un protocole plus efficace de CMI pour la production de HD chez les orges de printemps à six rangs. Ce travail se décline en deux grands volets où nous avons décidé d'évaluer l'impact de différents paramètres de la CMI chez ce matériel. Le premier chapitre de résultats de la thèse rapporte des travaux visant l'optimisation de certains facteurs physiques, tandis que le chapitre suivant portera sur l'effet de différents régulateurs de croissance utilisés en CMI chez les orges de printemps à six rangs.

Authors: Patricio Esteves and François Belzile<sup>1</sup>

Title:

## **Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: I-Optimization of key physical factors\***

\*: En date de novembre 26, 2013, ce manuscrit a été accepté pour publication en Plant Cell Reports, avec révisions mineures.

Département de phytologie, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation  
Pavillon Paul-Comtois  
2425, rue de l'Agriculture  
Local 3236  
Université Laval  
Québec (Québec) G1V 0A6  
CANADA

(1): Corresponding author.

Email: [francois.belzile@fsaa.ulaval.ca](mailto:francois.belzile@fsaa.ulaval.ca)

Telephone: (+1) 418 656-2131 ext. 5763

Fax: (+1) 418 656-7176

## **Abstract**

Doubled haploid (DH) plants are completely homozygous individuals that can be generated in just a few months via androgenesis *in vitro*. DHs are useful tools in genetic research and in plant breeding. Isolated microspore culture (IMC) is the most efficient way to produce DHs, but a strong genotype dependency imposes limitations to its wide application. Six-row, spring barley genotypes are considered as particularly recalcitrant due to a low frequency of embryogenesis and a high rate of albinism. Seeking to develop an efficient IMC protocol for this type of barley, we explored four important factors: 1) the harvest stage of immature spikes, 2) the type of pretreatment applied, 3) the osmotic potential in the induction medium, and 4) the plating density of microspores. This work was first performed using four barley genotypes: two typical six-row spring cultivars (ACCA and Léger), a two-row spring (Gobernadora) and a two-row winter (Igri) cultivar. First, by optimizing the harvest stage for each genotype we obtained a 2-4-fold increase in the yield of embryogenic microspores. Second, two pretreatments (0.3 M mannitol for two days, or a combination of cold and heat over 15 days) both performed significantly better than the commonly used cold pretreatment (28 days at 4 °C). Third, an induction medium containing mannitol (32 g/l) doubled green plant regeneration. Fourth, a plating density of  $10^6$  microspores/ml yielded the highest number of green regenerated plants. Our most important findings were then confirmed using sets of F1s from a six-row, spring-type breeding program.

---

## **Keywords**

barley, isolated microspore culture, doubled-haploids, pretreatments, albinism, plating density.

---

## **Key Message**

An improved isolated microspore culture protocol alleviating the recalcitrance typically observed in six-row spring barley was developed by optimizing four physical key factors to increase embryogenesis and reduce albinism.

---

## Introduction

Doubled-haploid (DH) plants are perfectly homozygous genotypes that can be obtained in a single generation through the reprogramming of microspores to become embryos, and subsequently plants, instead of pollen grains. The change in cellular morphogenetic fate is achieved via physiological manipulations of the microspores, which will launch its parthenogenetic development leading to multicellular structures, closely resembling normal embryos, and capable of becoming normal plants (Forster and Thomas, 2005). The plant regeneration process is called microspore embryogenesis (Olmedilla, 2010), and it is based on the exposure of microspores to a stress phase followed by *in vitro* culture under a specific hormonal regime. Microspores are haploid cells, but as a result of either a spontaneous or a chemically-induced doubling of the haploid genome during the course of regeneration, a very important fraction of the regenerated plants will be diploid, and therefore 100% homozygous, fertile, and will breed true.

Doubled haploids are coveted by plant breeders since they reduce by several years the time required to obtain genetically fixed lines, and thus shorten the duration of the breeding cycle (Rajcan *et al.*, 2011). Doubled haploid production has been readily adopted in crops such as barley, wheat and rapeseed where it can be efficiently performed (Forster *et al.*, 2007; Dunwell, 2010). For example, in recent years, it has been estimated that half of the European registered barley cultivars were derived from DHs (Forster *et al.*, 2007). Moreover, they also attract considerable interest in genetics and genomics since they can be exploited to construct genetic maps, locate genes of agronomic and economic importance, identify markers for trait selection and increase plant breeding efficiency (Forster and Thomas, 2005; Chan, 2010).

Among several existing methods to produce DHs in barley, it is the isolated microspore culture (IMC) method that is considered the most efficient (Davies and Morton 1998; Kasha *et al.*, 2001; Li and Devaux, 2005). For instance, IMC is reported to yield a 5- to 200-fold increase in plant regeneration over anther culture (Hoekstra *et al.*, 1992; Davies and Morton 1998). IMC is suitable for producing important numbers of DHs, as illustrated by Li and Devaux, who regenerated between 3.6 and 287 green plants per 100 anthers from 6 barley cultivars (Li et Devaux, 2005). Also, using the highly responsive winter-type cultivar Igri in IMC, other authors regenerated 9.4 and up to 50 green plants per anther (Olsen, 1991; Hoekstra *et al.*, 1993). However, usually large differences in green plant regeneration can be observed depending on the genotype (Li et Devaux, 2005; Weyen, 2009). Thus, while Davies reports up to 1,000 green plants per processed spike for some winter-type genotypes, for spring-type barleys the rate was only 10-20 green plants per spike (Davies, 2003).

It is well recognized that IMC does not always prove productive, and that some critical factors still hinder its generalized use in barley (Li and Devaux, 2003; Datta, 2005). The two main limitations of

IMC are the genotype-dependent response in terms of capacity to regenerate plants (Lu *et al.*, 2008; Torp and Andersen, 2009), and the high frequency of albino (achlorophyllous) plants that are sometimes regenerated almost exclusively from some genotypes (Weyen, 2009). Six-row barleys typically produce a high proportion of albino plants compared to two-row types (Cistué *et al.*, 1999; Marchand *et al.*, 2008), and spring-type barleys have also been found to be less responsive than winter types (Devaux and Kasha, 2009). Considered jointly, six-row spring-type barleys are thus the least productive in IMC.

As six-row spring-type barley cultivars are predominant in Eastern Canada, we wished to develop a highly efficient IMC protocol adapted to DH production in this generally recalcitrant type of barley. To try to overcome the limitations encountered in such materials, we decided to proceed with a step-wise experimentation aimed at evaluating and optimizing the following physical factors identified as having a great impact on the success of IMC (Atanasov *et al.*, 1995; Kasha, 2001; Rajcan *et al.*, 2011; Olmedilla, 2010): 1) the staging of microspores at the moment of harvesting the tillers from donor plants, 2) the pretreatment of microspores before isolation, 3) the osmotic potential of the induction medium, and 4) the plating density of microspores on the induction medium. Throughout this work we first performed exploratory experiments using four barley cultivars (both two-row and six-row, winter- and spring-types) and subsequently validated our findings using six-row, spring barley F1s genotypes, the plant materials used for DH production in our plant breeding program.

## **Materials and methods**

### *Plant material and growth conditions*

Four barley cultivars were used during the exploratory work: Igri (two-row, winter), Gobernadora (two-row, spring) and two six-row spring cultivars, ACCA and Léger. A single seed was sown in 19.4 x 17.8 cm (1 Gal) pots filled with a pasteurized soil-mix (4:1:1:1 soil: Pro-mix®: perlite: sand), and plants were grown in a glasshouse with temperature regulation (18 °C/14 °C day/night) and supplemental light (sodium vapour lamps, 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at canopy level). To trigger flowering in Igri, 2-days after germination in Petri dishes, seedlings were vernalized for 1 month at 4 °C. In validation experiments, F1 plants (all six-row, spring) from the breeding program at Université Laval were used. These were grown under the same conditions as described above. A list of F1 barley genotypes and their pedigree used in this work is provided in the Online resource 1.

### *General procedure for microspore isolation and culture*

For each genotype, immature spikes were harvested at the mid- to late-uninucleate stage of microspore development, except during the course of an experiment aiming to examine the relationship between internode distance and microspore yield (see below). Typically, sets of 3-6 tillers at the same stage were harvested, immediately wrapped in aluminum foil and subjected to pretreatment. With the exception of the experiments exploring alternative pretreatments (see below), the standard “Cold” pretreatment was used (as per Huang and Sunderland, 1982). This involved incubating the tillers at 4 °C in the dark for 28 days. Upon completion of the pretreatment, spikes were extracted from the tillers and surface sterilized (20 % bleach for 5 minutes followed by 3 rinses with sterile water). Next, microspores were isolated from spikes using a microblender chamber (Model 8575, Eberbach, Mich., USA) containing 20-25 ml of cold mannitol (0.3 M). A Waring blender was operated for 15–25 s at low speed to homogenize the spikes. The debris was separated from the microspores by filtering through a 100 µm sieve. Microspores remaining in the chamber were resuspended in fresh mannitol solution (0.3 M) before collecting them by centrifugation at 1500 rpm (300 x g) for 4 minutes. This operation was repeated twice in order to purify the microspores. Next, microspores were resuspended in a 20 % (w/v) maltose solution, transferred to a 15 ml tube and overlaid with 0.65 ml of 0.3 M mannitol. After centrifugation at 900 rpm (110 x g) for 15 minutes, the resulting band of microspores was collected from the interface and transferred to a new tube. Five ml of mannitol (0.3 M) solution were added and the resulting solution was centrifuged at 1500 rpm for 3 minutes. Finally, microspores were resuspended with 200 µl of modified IMI liquid culture medium of the same composition of modified IMI of Li and Devaux (2001) (see below), but without agar. After counting the cells with a haemocytometer under a light-microscope, microspore density was adjusted to 10<sup>6</sup> cells/ml.

After isolation, 100 µl of the microspore suspension were plated on 5-cm Petri dishes containing 3 ml of solid induction medium. The induction medium used was a modified IMI medium (Li and Devaux, 2003) in which the cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) was replaced by thidiazuron (TDZ; SIGMA P6186) at 0.3 mg/l and the auxin Dicamba (DIC, SIGMA 5417) was added at a concentration of 0.6 mg/l. Also, arabic gum and arabinogalactan proteins (Sigma-Aldrich CAS number G9752 and 10830 respectively) were added at a concentration of 50 mg/l. For plant regeneration, the same basic IMI medium was employed, except that it was modified to contain only 30 g/l of maltose, and a different hormonal composition: 0.1 mg/l of meta-topoline (GoldBio T0941-500) and 0.1 mg/l indoleacetic acid (IAA). To prepare the solid media, a liquid phase containing all of the components except for the agar was prepared at 2X concentration, sterilized by filtration and mixed in equal volume with an autoclaved 2X agar solution (Difco-bacto agar, used at a final concentration of 7.5 g/L).

### *Modified procedures for optimization experiments*

#### Impact of harvest stage on microspore yield

The relationship between the internode distance and the yield in isolated microspores per spike was explored. Tillers were harvested at various stages defined by the distance (in cm) between the ligules of the flag leaf and the penultimate leaf. Sets of 3-6 spikes from the same genotype were harvested at the same stage ( $\pm 1$  cm) and pretreated for 28 days at 4 °C in the dark. Microspores were isolated as described above and microspore yield was measured as the total number of microspores isolated per spike. A minimum of 20 samples were tested per genotype, covering a span of around 10 cm for each genotype.

#### Impact of pretreatments: exploratory experiment

Three pretreatments were compared: 1) storage of harvested tillers for 28 days at 4 °C in the dark (“Cold” pretreatment); 2) storage of tillers for 14 days at 4 °C in the dark before exposing them to 32 °C for 14 hours (“14-14” pretreatment); and 3) immature spikes extracted from the tillers, surface sterilized, and placed in sterile mannitol solution (0.3 M) at 26 °C for 48 h (“M30” pretreatment, modified from Li and Devaux, 2001). For this experiment, the harvesting of tillers was done at the optimal stage for each genotype, and the modified induction medium (with TDZ and DIC), the modified regeneration medium (with meta-topoline and IAA) and a microspore plating density of  $10^6$  microspores/ml were used.

#### Impact of pretreatments: validation experiment

A set of four six-row, spring-type F1s was employed in order to validate the results obtained in preliminary experiences described above. The microspore culture protocol consisted in harvesting the tillers at their optimized stage, and in testing all 3 pretreatments. Each pretreatment was applied once to each genotype, and data analysis was performed considering each genotype as a block. This led us to test treatment effects on a diverse set of experimental materials. With such an experimental plan, we sacrificed the possibility of testing for interactions between treatments and genotypes, which we justify by the fact that we are not interested in specific genotypic responses but rather in assessing a “mean” performance for each of the three pretreatments. Finally, the use of F1s allowed for a more adequate assessment of the performance of each pretreatment in a standard DH production context.

#### Impact of osmotic potential of the induction medium

Two levels of osmotic potential of the induction medium were compared: a medium supplemented with either 0 or 32 g/l of mannitol. For this experiment, the harvesting of tillers was done at the optimal stage for each genotype, the M30 pretreatment was used and isolated microspores were

plated at  $10^6$  microspores/ml on modified induction (with TDZ and DIC) and regeneration (with meta-topoline and IAA) media.

#### Impact of microspore density at plating

Four different plating densities of microspores were compared: 2.5, 5.0, 10.0 and  $20.0 \times 10^5$  microspores/ml. After isolation and counting, the microspores were re-suspended in liquid induction medium at each of these densities, and 0.1 ml aliquots were dispensed on top of Petri dishes containing solid media so that a 'bi-layered' induction medium resulted. For each density evaluated the same total number of microspores was plated ( $2 \times 10^5$ ), such that the number of Petri dishes of each treatment varied (respectively 8, 4, 2 and 1). In all cases, the microspores were isolated from the same set of harvested and blended spikes. All other parameters were held constant: optimal harvesting stage of tillers, Cold pretreatment, modified induction medium (with TDZ, DIC and mannitol) and regeneration medium (with meta-topoline and IAA). The total number of green and albino plants was recorded for each aliquot of  $2 \times 10^5$  microspores.

#### *Experimental design and data analysis*

In each experiment, a randomized complete block design was used with a minimum of 3 replicates for each genotype and treatment. In every case, each set of harvested tillers and its isolated and plated microspores represented one replicate. Unless stated otherwise, the variables recorded included the number of green regenerated plants and the number of albino plants. Data were analyzed using XLSTAT (Version Pro, 2012.06.02, Addinsoft), and we performed two-way ANOVAs and Fisher's LSD protected-test for multiple comparisons ( $\alpha \leq 0.05$ ).

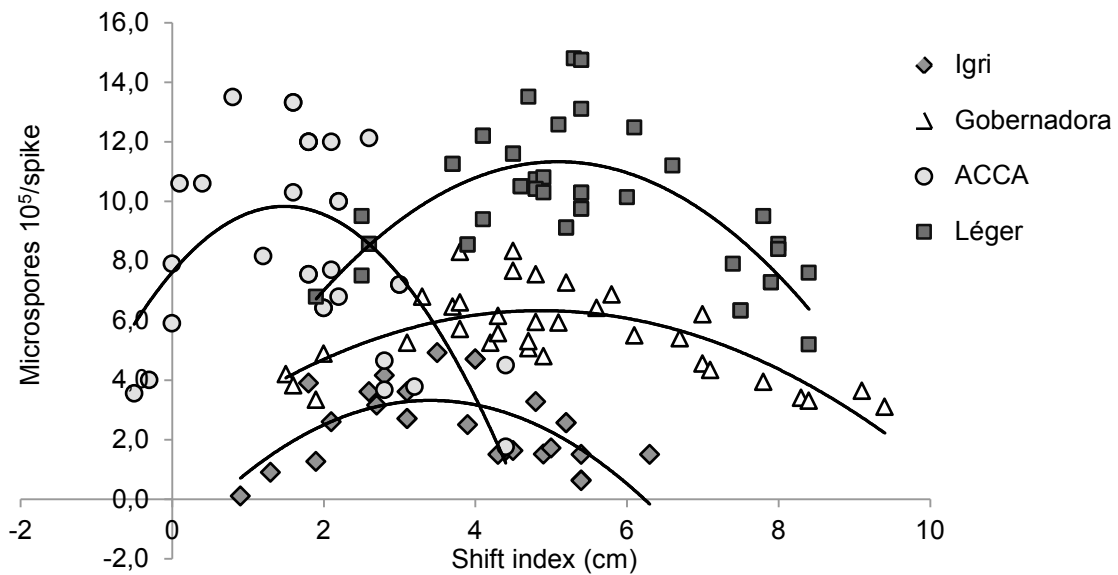
## **Results**

#### *Impact of harvest stage on microspore yield*

Tillers of each of the four cultivars were harvested along a range of internode distances and, following pretreatment, the number of isolated microspores was determined and expressed as the number of microspores per spike. As shown in Figure 1, mean microspore yield per spike varied between cultivars and was affected by the internode distance at harvest. Microspore yield was maximized at a fairly different internode distance for each cultivar. In the case of the cultivar ACCA, peak yields were attained when tillers were harvested at an internode distance of 1.7 cm. In Léger, the other six-row cultivar, the optimal internode distance was much greater (5.1 cm). Optimal harvest conditions for the two-row cultivars Igri and Gobernadora were intermediate at 3.6 cm and 4.9 cm, respectively. Whereas the impact of a sub-optimal internode distance was not too great on



some cultivars (Igri and Gobernadora), shifting the stage of harvest by a few cm from the optimum caused a sharp decline (as much as a 5- to 6-fold decrease) in the number of microspores obtained in other cultivars such as ACCA and Léger. Unsurprisingly, the six-row cultivars (ACCA and Léger) both showed a higher maximum (between 10 and 12 x 10<sup>4</sup> microspores/spike) compared to the two-row cultivars (Igri and Gobernadora) in which the maximal number of microspores peaked at 3 and 6 x 10<sup>4</sup>, respectively. Overall, this suggests that the harvest stage can have a very significant impact on the number of microspores isolated per spike, and that this optimal stage varies quite considerably from one cultivar to the other.

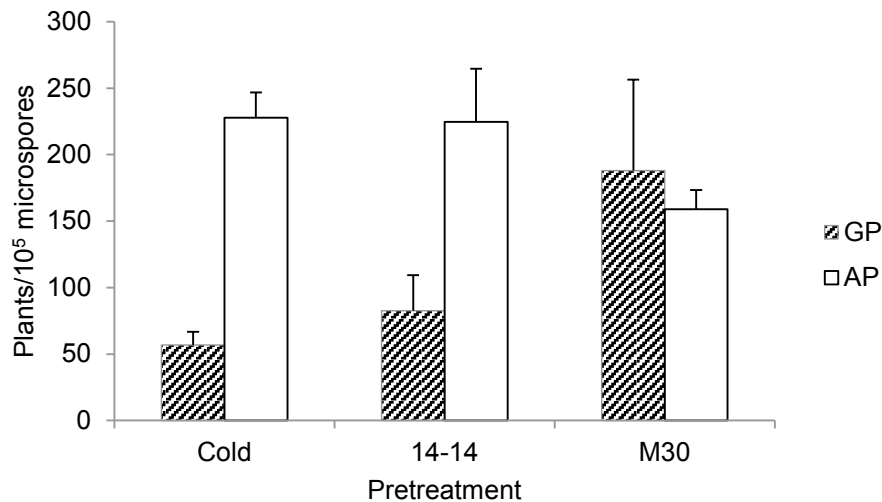


**Fig. 2.1** Relationship between the internode distance at the time of harvest and the number of isolated microspores per spike for four barley cultivars

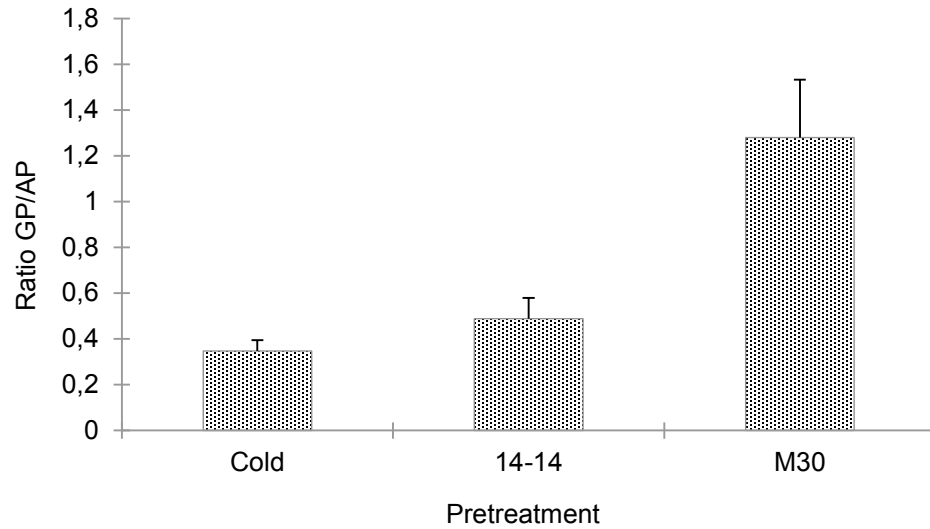
### Comparison of three pretreatments

#### A) Exploratory experience

Three different pretreatments were used to induce embryogenesis on microspores of four barley cultivars, and significant differences were observed between them regarding the number of green plants produced per  $10^5$  microspores. As illustrated in Figure 2, averaged over all four cultivars, the M30 pretreatment produced significantly more green plants than the Cold pretreatment (188.2 vs. 56.9 GP/ $10^5$  microspores,  $P < 0.01$ ) or the 14-14 treatment (188.2 vs. 82.7 GP/ $10^5$  microspores,  $P = 0.03$ ). The number of albino plants obtained with each of the three pretreatments was not statistically different ( $P > 0.10$ ). Thus, the improvement in green plant production displayed by the M30 pretreatment seemed to come mostly from a better green/albino plant ratio, which was shown to be nearly two times higher than the one observed for the 14-14 pretreatment ( $P < 0.01$ ), and almost three times higher than the one of the Cold pretreatment ( $P < 0.001$ ) (Figure 3).



**Fig. 2.2** Impact of three pretreatments on plant regeneration from four barley cultivars. The mean and standard error (bar) are shown for the number of green plants (GP) or albino plants (AP) derived from  $10^5$  microspores. The experience was repeated three times for each of the four cultivars



**Fig. 2.3** Impact of three pretreatments on the green/albino ratio achieved during isolated microspore culture of four barley cultivars. The experience was repeated three times for each cultivar

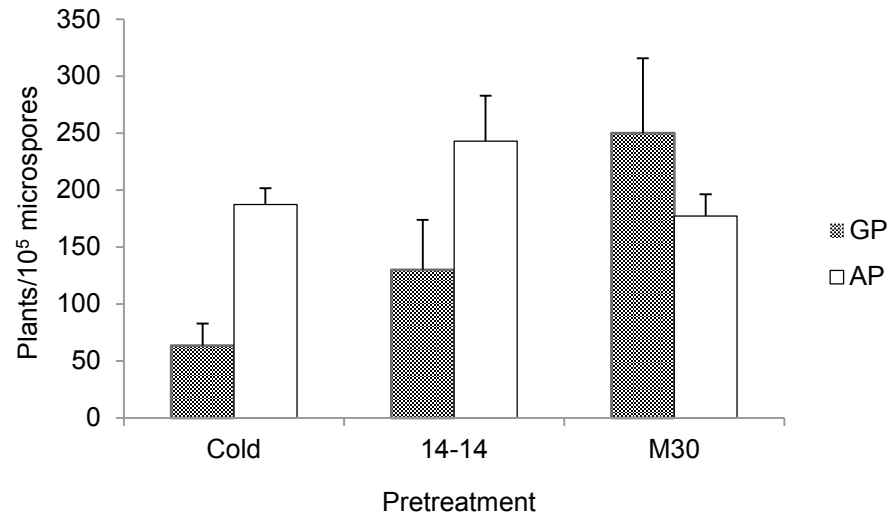
The data gathered during the course of this experiment also allowed us to estimate the yield expressed as the number of isolated microspores per spike, and this measure also showed important and significant differences between pretreatments (Table 1). In fact, the M30 pretreatment yielded nearly half the number of isolated microspores per spike when compared to either of the other two pretreatments ( $P < 0.01$ ). This means that, when considering the number of green plants produced per spike, the M30 and 14-14 pretreatments were similar and not statistically different ( $P > 0.10$ ) (Table 1). At the same time, however, our results indicated that the number of microspores required to obtain one green plant is very different for each pretreatment. This suggests that the capacity of the microspores to regenerate green plants was best preserved when using the M30 pretreatment.

**Table 2.1:** Impact of three pretreatments on the success of DH production in four barley cultivars. Number of microspores per spike (Microspores  $\times 10^5$ /spike), green plant production per spike (GP/spike), and number of microspores required to produce one green plant (Microspores/GP). Values in columns followed by a different letter are significantly different

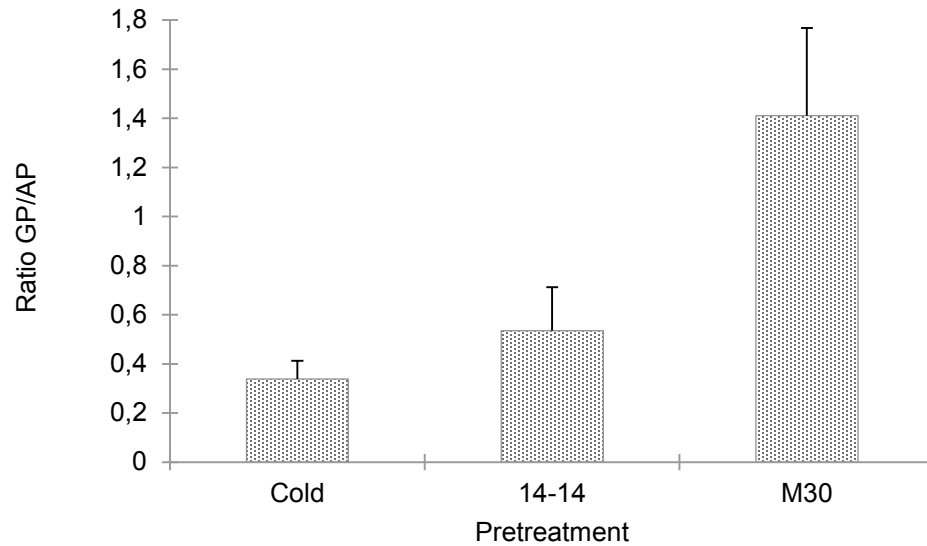
Pretreatment	Microspores $\times 10^5$ / spike	GP/ spike	Microspores/ GP
Cold	1.33 <i>a</i>	51.7 <i>b</i>	2,573 <i>a</i>
14-14	1.30 <i>a</i>	68.7 <i>a</i>	1,892 <i>a</i>
M30	0.66 <i>b</i>	70.5 <i>a</i>	936 <i>b</i>

#### B) Validation experiment

A validation of these trends was conducted on a set of four F1 plants (all six-row, spring) and provided results similar to those that were observed in the preliminary study. Indeed, the number of green plants produced per  $10^5$  microspores was significantly higher ( $P < 0.05$ ) when the M30 pretreatment was employed, whereas no difference was observed in terms of the production of albino plants (Figure 4). Again, the improvement in green plant production could be explained by a higher GP/AP ratio displayed by the M30 pretreatment ( $P < 0.025$ ) (Figure 5). As can be seen in Table 2, the yield in microspores/spike observed for the M30 pretreatment was lower than the one observed for the 14-14 pretreatment ( $P = 0.018$ ), but it was similar to that of the Cold pretreatment ( $P = 0.296$ ). Yet, the production of green plants/spike was highest for the M30 and 14-14 pretreatments, both of them nearly doubling the efficiency of the Cold pretreatment. Finally, as observed previously on the cultivars, the number of microspores required to produce one green plant was lowest with the M30 pretreatment. All in all, the results from the validation experiment performed on F1s are in solid agreement with those observed in the preliminary study using cultivars.



**Fig. 2.4** Impact of three pretreatments on plant regeneration from four F1-genotypes. The mean and standard error (bar) are shown for the number of green plants (GP) or albino plants (AP) derived from 10<sup>5</sup> microspores



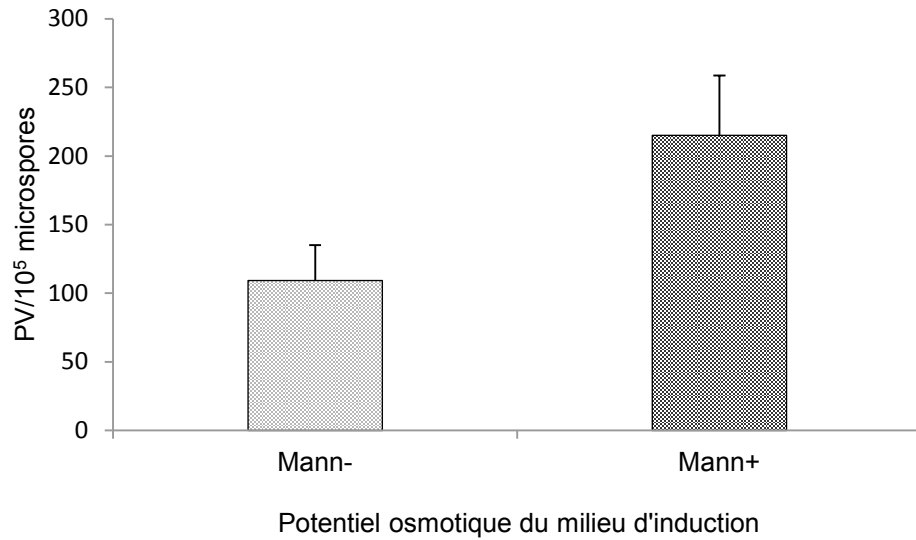
**Fig. 2.5** Impact of three pretreatments on the green/albino ratio achieved in isolated microspore culture of four F1s

**Table 2.2:** Impact of three pretreatments on the success of DH production using four F1s. Number of microspores per spike (Microspores  $\times 10^5$ /spike), number of green plants per spike (GP/spike), and number of microspores required to produce one green plant (Microspores/GP). Values in columns followed by different letters are significantly different

Pretreatment	Microspores $\times 10^5$ / spike	GP/ spike	Microspores/ GP
Cold	0.5 <i>ab</i>	35.3 <i>b</i>	1,379 <i>a</i>
14-14	0.8 <i>a</i>	71.7 <i>a</i>	1,090 <i>a</i>
M30	0.3 <i>b</i>	65.4 <i>a</i>	494 <i>b</i>

*Impact of osmotic potential in the induction medium*

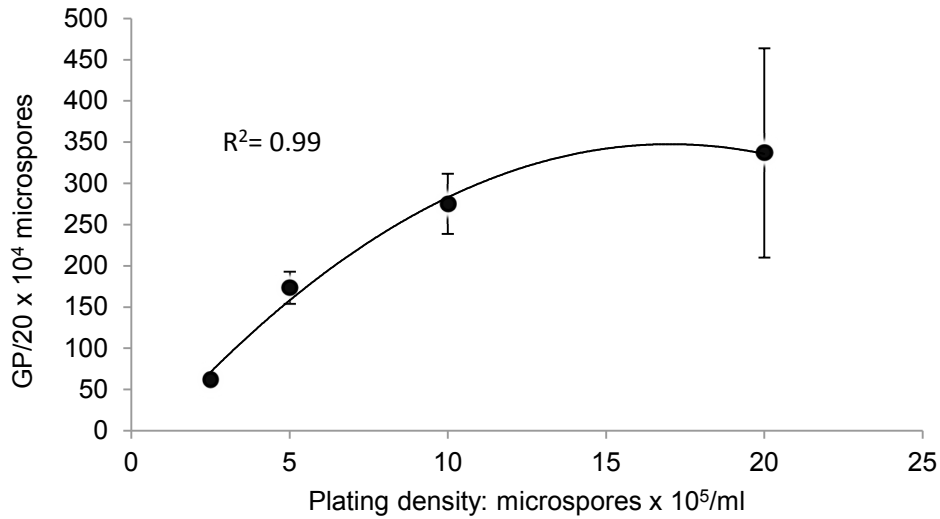
The effect of the osmotic potential in the induction medium was measured by simultaneously plating microspores isolated from the same set of spikes onto two different induction media supplemented with either 0 or 32 g/L of mannitol. As shown in Figure 6, a significant difference was observed in terms of the number of green plants regenerated per  $10^5$  plated microspores. Averaged over all four genotypes, the mannitol-containing induction medium almost doubled the number of green plants obtained.



**Fig. 2.6** Impact of increasing the osmotic potential of the induction medium. The mean and standard error (bar) are shown for the number of green plants produced by  $10^5$  microspores (GP/ $10^5$  microspores) when the induction medium was supplemented with 0 or 32 g/l of mannitol

*Impact of microspore density at plating*

We compared the number of green plants obtained from plating a constant number of microspores ( $2 \times 10^5$ ) isolated from the same sets of tillers at four different densities ranging from 2.5 to  $20.0 \times 10^5$  microspores/ml. As shown in Figure 7, a very strong density response was observed in this experiment. At the lowest plating density, eight petri dishes plated at a density of  $2.5 \times 10^5$  microspores/ml regenerated a total of 62 green plants. Instead, when the same number of microspores was plated in only one Petri dish (corresponding to a density of  $20.0 \times 10^5$  microspores/ml), the greatest mean number of green plants (337) was obtained. When comparing this optimal plating density with the lowest density used in this experiment a 5.6-fold difference in the total number of green plants was obtained. Thus, in order to maximize the efficiency of green plant production, our results indicate an optimal plating density is between 10.0 and  $20.0 \times 10^5$  embryogenic microspores/ml for these barley genotypes.



**Fig. 2.7** Impact of plating density of microspores on the number of green plants produced. Each point represents the mean value of four cultivars, each repeated three times for the set of four plating densities. The mean total number of green plants produced by the same number ( $2 \times 10^5$ ) of microspores at each density is presented

## Discussion

### 1. Impact of harvest stage on microspore yield

In this work, we have shown that the internode distance can be used as an easily measured trait to identify the optimal stage at which to harvest spikes from various barley genotypes. Also, we observed that barley cultivars could vary substantially in their phenology, as the internode distance leading to the largest number of isolated microspores ranged between as little as 1.7 cm and as much as 5.1 cm. It is well established that the reprogramming of the microspore by application of a stressful pretreatment will only prove successful during a specific stage of microspore development (Olmedilla, 2010) and that a differential density gradient can be used to isolate microspores at such a “responsive” stage (Wenzel *et al.* 1975; Bedinger and Edgerton, 1991). Therefore, the optimal harvest time can be thought of as the one that maximizes the yield of microspores obtained after centrifugation. Because of the observed variability in microspore yield from one genotype to another, we suggest a rough but systematic estimation of the optimal harvest stage. To our knowledge, this is the first report illustrating the quantitative relationship between the internode distance and the yield in viable microspores.



## 2. Comparison of three pretreatments

In the present work, we compared the productivity of three pretreatments in terms of the number of green plants obtained either per  $10^5$  microspores or per spike on a set of four cultivars as well as on a representative set of F1s. In our view, these two measures provide a better understanding of the impact of these pretreatments on the various components leading to the production of green plants. Such dual measurements are only possible in isolated microspore culture as, in anther culture, no indication of the “state” of the microspores after pretreatment is obtained because the microspores are in the anthers.

A first observation is that the Cold pretreatment was the least productive of the three, as it produced significantly fewer green plants per spike both with the cultivars (51.7) and the F1s (35.3). Similarly, the number of isolated microspores required to obtain a green plant was highest (2,573 and 1,379, respectively) with this pretreatment, confirming the comparatively low productivity of this treatment. Both alternative pretreatments (14-14 and M30) proved equally more productive in terms of green plants per spike. Interestingly, however, this increased productivity was achieved by different means. Indeed, the 14-14 pretreatment yielded significantly more isolated microspores (2-fold using cultivars and 2.7-fold with F1s) than the M30 pretreatment. This was counteracted by a similar increase in the number of microspores needed to produce a green plant (2-fold in both experiments).

A second observation pertains to the proportion of green plants produced by the various pretreatments. Using the Cold and 14-14 pretreatments, the ratio of green:albino plants was typically 0.5 or less, which means that less than one third of all regenerated plants were green. In stark contrast, in both experiments, the M30 pretreatment yielded more green than albino plants, such that between 55 and 60% of all regenerated plants were green. Thus, although the M30 and 14-14 pretreatments lead to the production of a comparable number of regenerated plants from a set number of microspores (data not shown), a greater proportion of these microspores were able to regenerate green plants following the M30 pretreatment. It is hypothesized that the greater proportion of green plants provided by the M30 pretreatment might reflect a better maintenance of the structural integrity and function of the proplastids and chloroplasts.

Such effects of pretreatments on the green plant/albino plant ratio have also been reported in previous work. For example, Li and Devaux (2001) managed to improve the androgenic response of seven recalcitrant barley cultivars in anther culture by incubating whole spikes in 0.30 M mannitol (4 days at 26°C). Similarly, Cistué *et al.* (1999) reported a 3- to 10-fold increase in the number of regenerated green plants from two recalcitrant genotypes following incubation of anthers on solid media supplemented with 0.70 M mannitol (4 days at 25°C). Oleszczuk *et al.* (2006) found that pretreatment of spikes in mannitol (24 h at 32°C) was beneficial in terms of green plant production. In contrast, however, Hou *et al.* (1993) concluded that a mannitol pretreatment (3 days at 25°C) performed no better than the Cold pretreatment regarding green plant production of the genotypes

they used. In all of the above work, the reference pretreatment was Cold, which suggests that replacing a prolonged exposure to cold with a shorter exposure to osmotic stress and/or heat is generally conducive to an increase in the production of green plants. The same conclusion was reached by Caredda et al. (1999) when comparing Cold and mannitol stress pretreatments in anther culture of cv. Igri. They reported that, contrary to Cold, a mannitol pretreatment has a positive effect on plastid physiology in the microspores, enabling them to enter a differentiation process, stopping its disappearance and allowing them to effectively multiply. In addition, deletions in the nuclear and plastid DNAs have been observed during androgenesis in barley when a Cold pretreatment is used, suggesting that plastid totipotency is not fully restored after this pretreatment (Dunford and Walden 1991; Mouritzen and Holm 1994).

Considering the number of green plants produced per spike, both the M30 and the 14-14 pretreatments constituted an improvement over the Cold pretreatment. Is one preferable to the other? Depending on the logistics and facilities of a laboratory as well as on the planning of the operations, it may be easier to adopt one than the other. For example, if the production of spikes is limiting (due to limited greenhouse or cabinet space), it will prove difficult to use the M30 pretreatment, as it must be initiated on many spikes simultaneously. In contrast, with the 14-14 pretreatment, spikes can be placed at 4°C to initiate the pretreatment over a period of a couple of days thereby offering greater flexibility in this regard. If human resources are limiting at the regeneration stage, e.g. due to seasonality in the DH production, the M30 pretreatment may be preferred because it will lead to the highest efficiency in labor, as a greater proportion of transferred embryos will produce green plants.

### *3. Impact of the osmotic potential of the induction medium*

The addition of mannitol (32 g/L) to the induction medium resulted in a 2-fold increase in the production of green plants. Similarly, Dunwell (1985) considered barley as a 'high osmotic requiring' species and increases in the production of green plants in barley anther culture have been reported by many authors (Sorvari and Schieder, 1987; Hoekstra et al., 1993; Wojnarowicz et al., 2004). To the best of our knowledge, however, this is the first report of the benefits of an increased osmotic potential in the induction medium in barley isolated microspore culture.

### *4. Impact of the plating density of microspores*

When different densities of microspores were assayed, we observed a dramatic effect on productivity, such that 5.5-fold more green plants were obtained from a set number of microspores ( $2 \times 10^5$ ) at the highest plating densities ( $1-2 \times 10^6$  microspores/ml) compared to the lowest plating density ( $2.5 \times 10^5$  microspores/ml). In previous studies, a wide range of optimal plating densities have been reported:  $2 \times 10^4$  (Hoekstra et al., 1993),  $>5 \times 10^4$  (Davies and Morton, 1998),  $8-12 \times 10^4$  (Li and Devaux, 2001), and  $1.2-2.4 \times 10^5$  (Castillo et al., 2000) microspores/ml. These numbers are

not directly comparable, however, as optimal density was determined based on the number of embryos (Hoekstra *et al.*, 1993; Davies and Morton, 1998), the number of regenerated green plants (Li and Devaux, 2001), or other more complex parameters such as the number of green plants derived from  $10^3$  viable microspores (Castillo *et al.*, 2000).

## **Summary**

In this work, we have explored a number of factors that affect the productivity of double haploid production in barley via isolated microspore culture. Even if each factor individually increased the number of green plants obtained by only a few fold, the combined use of each of these optimized parameters ended up being quite sizeable. Using such “optimal” conditions in our experiment comparing the three pretreatments on four F1 plants, we obtained on the order of 60-70 green plants per spike. As multiple spikes are typically used in a single experiment, a few hundred green plants can be obtained from a single F1 plant with six-row spring barley. This represents a tremendous increase in efficiency when compared to anther culture in which a similar set of materials typically yielded 2-3 green plants per spike (Marchand *et. al.*, 2008).

## **Acknowledgments**

The financial support of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and of La Coop Fédérée are acknowledged. The authors wish to thank Isabelle Clermont, Martine Jean and Suzanne Marchand for their assistance and constructive comments, as well as B. Legge (AAFC Brandon) for providing seeds of some of the cultivars used here.

### Supplementary Table 2.1

Online Resource 1: F1 Genotypes used in validation experiments of the pretreatments comparison in barley IMC

Validation of pretreatments experiments

Family code    Cross

2905    23CFQ.07.01 / Synabelle

2914    21FHD-164 / Océanik

2918    21FHD-172 / Océanik

2924    23CFQ.07.01 / 21FHD-164

## Literature cited

- Atanassov A, Zagorska N, Boyadjiev P, Djilianov D (1995) In Vitro production of haploid plants. *World J Microb Biot* 11:400-408
- Bedinger PA, Edgerton MD (1991) Developmental staging of maize microspores reveals a transition in developing microspore proteins. *Plant Physiol* 92:474-479. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.92.2.474>
- Caredda S, Devaux P, Sangwan RS, Clément C (1999) Differential development of plastids during microspore embryogenesis in barley. *Protoplasma* 208:248-256.
- Castillo AM, Valdés MP, Cistué L (2000) Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. *Euphytica* 113:1-8. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1003937530907>
- Chan SWL (2010) Chromosome engineering: power tools for plant genetics. *Trends in Biotechnology* Vol 28: No 12. doi 10.1016/j.tibtech.2010.09.002
- Cistué L, Ramos A, Castillo AM (1999) Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars. *Plant Cell Tiss Org Cult* 55:159-166
- Datta SK (2005) Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. *Curr Sci India* 89(11):1870-1878
- Davies PA (2003) Barley isolated microspore culture (IMC) protocol. In: Maluszynski M et al. (eds) *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual*. Springer The Netherlands
- 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
- Devaux P, Kasha KJ (2009) Overview of Barley Doubled Haploid Production. In: Touraev A et al (eds) *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, Springer Science+Business Media BV
- Dunford R, Walden RM (1991) Plastid genome structure and plastid-related transcript levels in albino barley plants derived from anther culture. *Curr Genet* 20:339-347. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00318524>
- Dunwell JM (1985) Haploid cell cultures. In: Dixon RA (ed) *Plant Cell Culture: A Practical Approach*. IRL Press, Banberry
- Dunwell JM (2010) Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnol. J.* 8:377-424. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x
- Forster BP, Heberle-Bors E, Kasha KJ, Touraev A (2007) The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Sci* 12:368-375. doi:10.1016/j.tplants.2007.06.007
- Forster BP, Thomas WTB (2005) Doubled haploids in genetics and plant breeding. In Janis J (ed) *Plant Breed Rev* 25:57-88. John Wiley & Sons
- Hoekstra S, van Bergen S, van Brouwershaven IR, Schilperoort RA, Wang M (1997) Androgenesis in *Hordeum vulgare* L.: Effects of mannitol, calcium and abscisic acid on anther pretreatment. *Plant Sci* 126:211-218
- Hoekstra S, van Zijderveld MH, Heidekamp E, van der Mark E (1993) Microspore culture of *Hordeum vulgare* L.: the influence of density and osmolality. *Plant Cell Rep* 12:661-665
- Hoekstra S, van Zijderveld MH, JD Louwerse, Heidekamp F, van der Mark F (1992) Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. *Plant Sci*, 86:89-96
- Hou L, Ullrich SE, Kleinhofs A, Stiff CM (1993) Improvement of anther culture methods for doubled haploid production in barley breeding. *Plant Cell Rep* 12:334-338

Huang, B. and N. Sunderland (1982): Temperature-stress pretreatment in barley anther culture. *Annals of Botany*, London, Vol. 49: 77-88.

Jähne A, Lörz H (1995) Cereal microspore culture. *Plant Sci* 109:1-12

Jähne-Gartner A, Lörz H (1999) Protocols for anther and microspore culture of barley. *Methods Mol Biol: Plant Cell Culture Protocols* 111:269–279. doi 10.1385/1-59259-583-9:269

Kao KN, Saleem M, Abrams S, Pedras M, Horn D, Mallard C (1991) Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods. *Plant Cell Rep* 9:595-601

Kasha KJ, Simion E, Oro R, Yao QA, Hu TC, Carlson AR (2001) An improved in vitro technique for isolated microspore culture of barley. *Euphytica* 120:379-385

Kruczowska H, Pawlowska H, B Skucińska (2002) Influence of anther pretreatment on the efficiency of androgenesis in barley. *J. Appl. Genet.* 43(3):287-296

Li H, Devaux P (2001) Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. *Plant Cell Rep* 20:475-481. doi 10.1007/s002990100368

Li H, Devaux P (2003) High frequency regeneration of barley doubled haploid plants from isolated microspore culture. *Plant Sci* 164:379-386. doi:10.1016/S0168-9452(02)00424-7

Li H, Devaux P (2005) Isolated microspore culture over performs anther culture for green plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Acta Physiol Plant* 27:611-619

Lu R, Wang Y, Sun Y, Shan L, Chen P, Huang J (2008) Improvement of isolated microspore culture of barley (*Hordeum vulgare* L.): the effect of floret co-culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* 93:21-27. doi 10.1007/s11240-008-9338-4

Marchand S, Fonquerne G, Clermont I, Laroche L, Huynh TT, Belzile FJ (2008) Androgenic response of barley accessions and F1s with *Fusarium* head blight resistance. *Plant Cell Rep* 27:443–45. doi 10.1007/s00299-007-0477-6

Mouritzen P, Holm PB (1994) Chloroplast genome breakdown in microspore cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) occurs primarily during regeneration. *J Plant Physiol* 144:586-593. [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)82141-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(11)82141-3)

Oleszczuk S, Sowa S, Zimny J (2006) Androgenic response to preculture stress in microspore cultures of barley. *Protoplasma* 228:95-100. doi 10.1007/s00709-006-0179-x

Olmedilla A (2010) Microspore Embryogenesis. In: Pua E-C, Davey MR (eds) *Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives: Volume 2*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi 10.1007/978-3-642-04670-4\_2,

Olsen LF (1991) Isolation and cultivation of embryogenic microspores from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Hereditas* 115:255-266. doi 10.1111/j.1601-5223.1992.tb00568.x

Rajcan I, Boersma JG, Shaw EJ (2011) *Plant Genetic Techniques: Plant Breeder's Toolbox. Comprehensive Biotechnology (Second Edition), Volume 4*. Elsevier

Sorvari S, Schieder O (1987) Influence of Sucrose and Melibiose on Barley Anther Cultures in Starch Media. *Plant Breeding* 99:164—171. doi 10.1111/j.1439-0523.1987.tb01167.x

Torp AM, SB Andersen (2009) Albinism in Microspore Culture. In: Touraev, A et al. (eds) *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, Springer Science+Business Media B.V.

Touraev A, Vicente O, Heberle-Bors E (1997) Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Sci (Reviews)*, 2(8):297-302

Wenzel G, Hoffmann F, Potrykus I, Thomas E (1975) The Separation of Viable Rye Microspores from Mixed Populations and Their Development in Culture. *Molec gen Genet* 138:293-297

Weyen J (2009) Barley and wheat doubled haploids in breeding. In: A. Touraev *et al.* (eds) *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Springer Science+Business Media BV

Wojnarowicz G, Caredda S, Devaux P, Sangwan R, Clément C (2004) Barley anther culture: assessment of carbohydrate effects on embryo yield, green plant production and differential plastid development in relation with albinism. *J Plant Physiol* 161:747–755

Ziauddin A, Marsolais A, Simion E, Kasha KJ (1992) Improved plant regeneration from wheat anther and barley microspore culture using phenylacetic acid (PAA). *Plant Cell Rep* 11:489-498

Authors: Patricio Esteves, Isabelle Clermont, Suzanne Marchand and François Belzile<sup>1</sup>

Title:

## **Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley:**

### **II-Exploring novel growth regulators to maximize embryogenesis and reduce albinism\***

\*: En date de novembre 26, 2013, ce manuscrit a été accepté pour publication en Plant Cell Reports, avec révisions mineures.

Département de phytologie, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation

Pavillon Paul-Comtois  
2425, rue de l'Agriculture  
Local 3236  
Université Laval  
Québec (Québec) G1V 0A6  
CANADA

(1): Corresponding author.

Email: [francois.belzile@fsaa.ulaval.ca](mailto:francois.belzile@fsaa.ulaval.ca)

Telephone: (+1) 418 656-2131 ext. 5763

Fax: (+1) 418 656-7176



## **Abstract**

Doubled haploid (DH) plants are coveted in plant breeding and in genetic studies since they are rapidly obtained and perfectly homozygous. In barley, DHs are produced mainly via androgenesis, and isolated microspore culture (IMC) constitutes the method offering the greatest potential efficiency. However, IMC can often be challenging in some genotypes because of low yield of microspores, low regeneration and high incidence of albinism. Six-row, spring-type barleys, the predominant type grown in Eastern Canada, are considered recalcitrant in this regard. Our general objective was to optimize an IMC protocol for DH production in six-row spring barley. In particular, we explored the use of alternative hormones in the induction medium (thidiazuron and dicamba), and in the regeneration medium (meta-topoline). This optimization was performed on two typical six-row spring (ACCA and Léger), a two-row spring (Gobernadora) and a two-row winter (Igri) barley cultivar. When 6-benzyl-aminopurine (BAP) was replaced by a combination of thidiazuron and dicamba in the induction medium, a 5.1-fold increase ( $P < 0.01$ ) in the production of green plants resulted. This increase was mainly achieved by a reduction of albinism. Moreover, a 2.9-fold increase ( $P < 0.01$ ) in embryo differentiation into green plants was obtained by using meta-topoline instead of BAP in the regeneration medium. Together, these innovations allowed us to achieve a substantial improvement in the efficiency of IMC in this recalcitrant type of barley. These results were later successfully validated using sets of F1s from a six-row, spring barley breeding program.

---

## **Keywords**

barley, isolated microspore culture, plant regeneration, doubled-haploids, meta-topoline, thidiazuron

---

## **Key Message**

Two alternative cytokinins, thidiazuron and meta-topoline, were tested in isolated microspore culture on recalcitrant barley genotypes (six-row, spring), and green plant regeneration was improved substantially.

---

## Introduction

When exposed to stress and cultured *in vitro*, microspores can deviate from their developmental fate, the formation of pollen, to form parthenogenetic embryos. Even if microspores are haploid cells, an important fraction of the resulting embryos will have doubled their haploid genome thus giving rise to doubled-haploid (DH) plants. Doubled-haploid plants are 100% homozygous and, when they are derived from the microspores of a heterozygous plant (e.g. an F1), each line represents a unique product of genetic recombination. In the context of a breeding program or genetic analysis, the fixation of lines is achieved in single generation.

Isolated microspore culture (IMC) is a highly productive method to obtain DH plants via androgenesis (Devaux and Kasha, 2009; Mirzaei et al., 2011; Asif, 2013). It allows for the isolation huge numbers of uniformly treated microspores which rapidly develop into thousands of embryos many of which will develop into regenerated plants. In barley, IMC has been reported to offer the highest potential for DH production (Li and Devaux, 2005). However, even though great progress has been made over the years, a certain number of constraints still hinder a generalised use of IMC in breeding programs. Among these limitations, perhaps the most notable is an important genotype-dependency of green plant regeneration (Devaux and Kasha, 2009). Six-row, spring barley genotypes are considered as generally recalcitrant to androgenesis because of a high rate of albinism and a low frequency of embryogenesis (Cistué et al., 1999; Marchand et al., 2008). Most work conducted to develop a productive IMC protocol in barley has been performed using two-row, often winter-type cultivars (Hunter, 1988; Ziauddin et al., 1992; Hoekstra et al., 1993; Weyen, 2009). Given the observed recalcitrance in six-row, spring genotypes, one can only conclude either that these protocols are not optimal for this type of barley or that these suffer from some intrinsic incapacity to adopt the path of embryogenesis. We hypothesize the former, i.e. that six-row spring barleys could benefit from the development of a specific protocol.

Several *in vitro* morphogenetic processes are largely determined by the content and balance of plant growth regulators (Schulze, 2007). In microspore culture, most protocols published to date have used either a cytokinin alone or in combination with an auxin (Hunter, 1988; Hoekstra et al., 1997; Cistué et al., 1999). The most widely used growth regulators in such work have been the cytokinin BAP (IUPAC N-(phenylmethyl)-7H-purin-6-amine) used alone or in combination with the auxin 2,4-D (IUPAC 2-(2,4-dichlorophenoxy)acetic acid). In recent years, however, various compounds with growth regulating activities have managed to improve the response of recalcitrant genotypes in various tissue culture applications. Investigations in wheat and barley revealed that the auxin dicamba (IUPAC 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid) was more suitable for somatic embryogenesis and exhibited a higher frequency of regenerants than 2,4-D (Carman et al, 1987; Mendoza and Kaeppler, 2002; Halamkova et al., 2004). Similarly, thidiazuron (TDZ) (IUPAC 1-

phenyl-3-(thiadiazol-5-yl)urea) is believed to be the best synthetic cytokinin for the regeneration of numerous plant species due to its efficient role in plant cell and tissue culture (Guo et al., 2011). According to Huetteman and Preece (1993) there is substantial evidence that TDZ is perhaps the most potent cytokinin for the establishment and proliferation *in vitro* of difficult to propagate woody species. TDZ also showed a remarkable regenerative ability in leguminous plants known to be recalcitrant (Lakshmanan and Taji, 2000). Finally, the cytokinin meta-topoline (mT) (IUPAC 6-[3-hydroxybenzylamino]purine) (Strnad, 1997; Dolezal, 2010) has been reported to be superior to BAP in stimulating morphogenesis *in vitro* of recalcitrant species (Wojtania, 2010). These results suggest that different chemical forms of plant growth regulators could prove useful in overcoming the recalcitrance of six-row, spring barley genotypes in IMC.

Additionally, one can think of IMC as having two distinct phases that may require different culture conditions. During the first phase, an induction medium seeks to nurture the isolated microspores and favor embryogenesis. In a second phase, the resulting embryo-like structures (ELs) are transferred to a regeneration medium during which germination takes place and plants can be recovered. Although the hormonal composition of the induction medium has been the focus of much work, the composition of the regeneration media used in androgenesis has only rarely been addressed in the literature, even if it has been shown to affect the percentage of green plant regeneration and the quality of the regenerated plants (Castillo et al., 2000). Furthermore, as the genetic basis for green plant regeneration seems to be different from that governing embryo formation (Knudsen et al., 1989), it is conceivable that these two phases require different hormonal regimes for optimal performance.

The focus of our work has been to improve the efficiency of IMC in six-row, spring barley. In a companion paper, we report the optimization of various key physical factors of our IMC protocol, including the harvest stage, pretreatment, microspore plating density and the osmotic potential of the induction medium. In the work reported here, we have sought to improve the efficiency of IMC in this type of barley by exploring key chemical factors, e.g. the use of alternative plant growth regulators in both the induction and the regeneration phase. The improvements reported here have been progressively integrated in DH production work conducted in our lab and has provided testing and validation ground for our improved protocols.

## **Material and Methods**

### **Plant materials and growth conditions**

To develop an improved induction medium, we performed a first series of experiments using four barley genotypes: the two-row, winter cultivar Igri, the two-row, spring cultivar Gobernadora, and two six-row, spring cultivars, Léger and ACCA. In a second series of experiments, eight six-row spring F1s were used to compare our most-productive induction medium with the control. To compare the performance of different regeneration media, we used a set of five six-row spring F1s. A list of all barley genotypes and their pedigree (for F1 plants) used in this work is provided in Online Resource 1.

Igri seedlings were vernalized by germinating seeds on moistened filter paper in Petri dishes and keeping them at 4 °C for 4 weeks in the dark. A single seed was sown in 19.4 x 17.8 cm (1 Gal) pots filled with a pasteurized soil-mix (4:1:1:1 soil: Pro-mix<sup>®</sup>: perlite:sand). Growth conditions were set at 18 °C/14 °C (day/night), 30-60% RH, and supplemental light (sodium vapor lamps, 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at canopy level) was provided. Watering was performed two times a day, and 0.5 g of a commercial fertilizer (20:20:20) was applied to each pot four times a week during the whole growing season.

### **Microspore culture**

Immature spikes were harvested at the mid- to late-uninucleate stage of microspore development. Typically, sets of 3-6 tillers at the same stage were harvested, immediately wrapped in aluminum foil and subjected to pretreatment. Pretreatment was performed by incubating sets of 4-6 disinfected spikes in a sterile mannitol solution (0.3 M) and stored for 2 days at 26 °C in the dark. Upon completion of the pretreatment, spikes were extracted from the tillers and surface sterilized (20% bleach for 5 minutes followed by 3 rinses with sterile water). Microspores were isolated from the spikes using a Waring microblender chamber (Model 8575, Eberbach, Mich., USA) containing 20-25 ml of cold buffer (mannitol 0.3 M). The blender was operated for 15–25 s at low speed to homogenize the spikes. The debris was separated from the microspores by filtering through a 100  $\mu\text{m}$  sieve. The microblender chamber was rinsed with fresh 0.3 M mannitol in order to recover remaining microspores, before collecting them all by centrifugation at 1,500 rpm (300 x *g*) for 4 minutes. This operation was repeated twice in order to wash the microspores. Microspores were then purified by resuspending them in a 20% (w/v) maltose solution overlaid with 0.65 ml of 0.3 M mannitol. After centrifugation at 900 rpm (110 x *g*) for 15 minutes, the resulting band of microspores was collected from the maltose-mannitol interface and transferred to a new tube. Five ml of mannitol (0.3 M) buffer was added and the resulting solution was centrifuged at 1,500 rpm for 3 minutes. Next, microspores were resuspended with 200  $\mu\text{l}$  of liquid induction culture medium and, after counting the cells with a haemocytometer under a light microscope, microspore density was adjusted to  $10^6$  cells/ml.

Finally, 100 µl of the liquid induction medium containing the microspores were plated on 5-cm Petri dishes containing 3 ml of solid induction medium (a bi-layered induction medium system was employed). To prepare the solid media, a liquid phase containing all of the components except for the agar was prepared at 2X concentration, sterilized by filtration and mixed in equal volume with an autoclaved 2X agar solution (Difco-bacto agar) to achieve a final concentration of 7.5 g/L. A detailed composition of all culture media used in this work is provided in Online Resource 2. The Petri dishes containing the microspores were kept in the dark at 28 °C for 12-15 days, until well-formed ELSs were observed. Then, Petri dishes were exposed to light 16/24 h ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) during 2-3 days, until ELSs showing small green sectors were transferred to regeneration media.

### **Induction media**

The IMI induction medium (Li and Devaux, 2003) was modified to contain 50 mg/l of both arabic gum and arabinogalactan proteins (Sigma-Aldrich, G9752 and 10830 respectively), as well as 32 g/l of mannitol. The experiments exploring the hormonal composition of induction media were carried out in two phases. In the first, two cytokinins were used singly: 1.0 mg/l of BAP (as a control) or 0.1, 0.3 or 1.0 mg/l of TDZ (SIGMA, P6186), for a total of four different treatments. In a second phase, 1.0 mg/l of BAP was compared to 0.3 mg/l of TDZ supplemented with 0.1, 0.3 and 1.0 mg/l of dicamba (SIGMA, D5417). In all experiments, a set of isolated microspores was split equally among the different treatments. The resulting ELSs were transferred to a regeneration medium again based on the IMI medium but without addition of arabic gum, arabinogalactan proteins or mannitol. The hormonal composition was modified to contain 0.1 mg/l IAA (2-(1H-indol-3-yl)acetic acid) (SIGMA I2886) and 0.1 mg/l of meta-topoline. After 20 days on regeneration medium, the number of green and albino regenerated plants on each Petri dish was determined.

### **Regeneration media**

As above, the regeneration media used in this work shared the salts, vitamins and organic compounds of the IMI medium but without addition of arabic gum, arabinogalactan proteins or mannitol. The first of these regeneration media (IMR) contained 0.2 mg/l BAP and 0.2 mg/l IAA, while the second (RMT) contained 0.1 mg/l of meta-topoline and 0.1 mg/l IAA. Five six-row, spring F1 genotypes were used to compare these regeneration media in three regards: 1) the number of green ELSs formed from a constant number of microspores; 2) the number of green plants that successfully germinated from such ELSs and 3) the total number of green plants regenerated from a constant number of microspores. A single preparation of isolated microspores was spread on multiple Petri dishes containing the induction medium described above with 0.3 mg/l of TDZ and 0.6 mg/l of dicamba. After 12-15 days on induction media, well-developed ELSs were transferred from each induction plate to one of the two regeneration media, in equal and random fashion. These Petri dishes were sealed with a double-layer of Parafilm© and exposed to light in a growth chamber

(22 +/- 2 °C, photoperiod of 16 hours of light/day, light intensity of 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , relative humidity varying between 20-50 %). Fifteen days later, the number of green ELSs was determined on each Petri dish, and these were transferred to a hormone-free germination medium containing the same basic salts, vitamins and organics of IMR but in which maltose was reduced to 20 g/l as recommended by Kasha (2001). Another 15 days later, the number of green plants was counted.

### **Evolution of DH production efficiency**

DH production was performed using ~30 F1s (all six-row spring) per year over a 10-year period (2003-2013). The protocols used can be divided into 5 phases: 1) AC as per Marchand et al. (2008); 2) IMC as per Li and Devaux (2001); IMC with modified induction media (TDZ and Dic at 0.3 and 0.6 mg/l, respectively); IMC with modified regeneration media (mT and IAA at 0.1 mg/l each); 5) IMC with modified media and optimized handling of the microspores (Esteves et al., companion paper).

### **Data analysis**

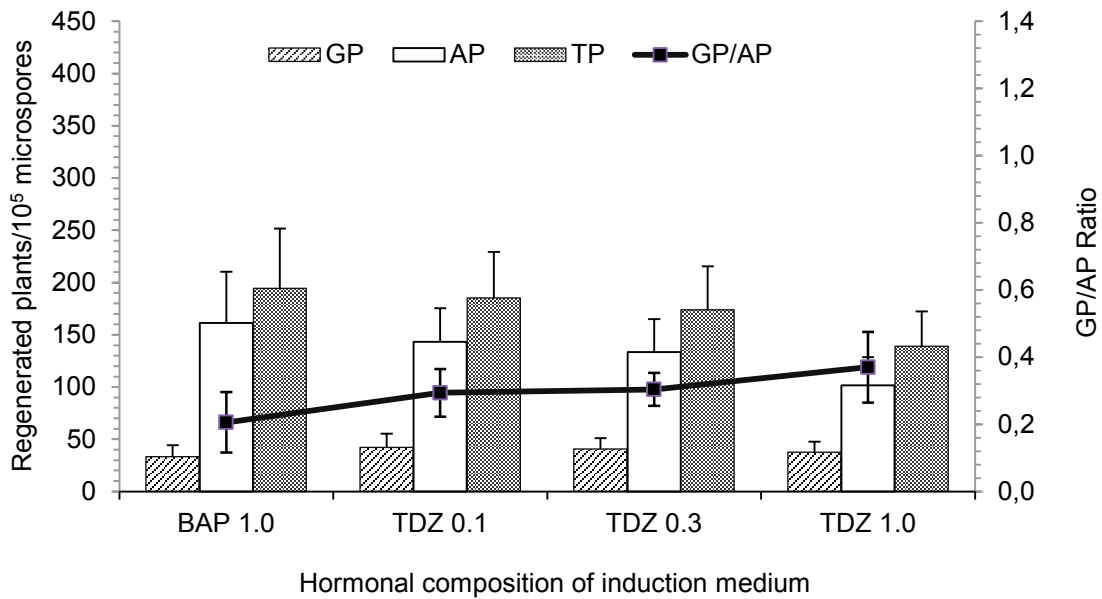
For the optimization work on induction media done using four cultivars, a minimum of three replicates (each replicate corresponding to a single preparation of isolated microspores) were used for each of the genotypes. In the experiments performed using F1 plants, each F1 genotype was considered as a block and each treatment was applied only once to each genotype allowing us to assess a “mean” performance (across multiple F1s) for each of the treatments. The resulting data were analysed as a randomized complete block using XLSTAT (Version Pro, 2012.06.02, Addinsoft). We used two-way ANOVA and Fisher’s LSD protected-test for multiple comparisons ( $\alpha < 0.05$ ).

## **Results**

### **Hormonal composition of the induction medium**

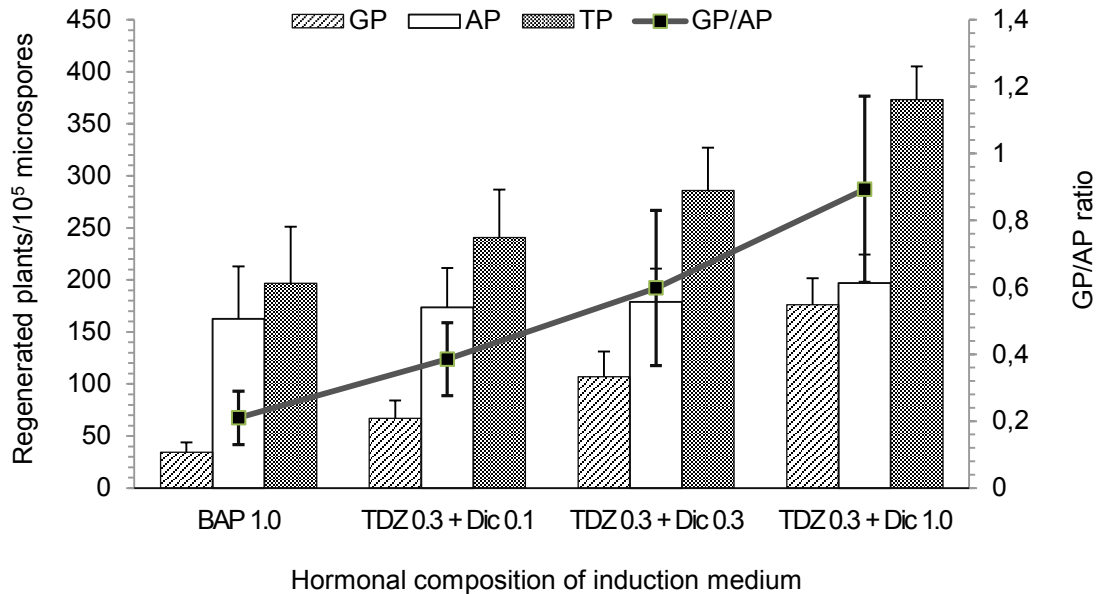
In the first phase of this research, we wished to examine the impact of using an alternative type of cytokinin, TDZ, instead of the commonly used BAP. Induction media with three concentrations (0.1, 0.3 and 1.0 mg/l) of TDZ were compared to 1.0 mg/l of BAP on four barley cultivars. All four treatments produced a similar number ( $P = 0.95$ ) of green plants per  $10^5$  microspores (Figure 1). Similarly, the total number of plants obtained was not statistically different ( $P = 0.158$ ). Although there seemed to be a trend towards a reduction in the mean number of albino plants produced with increasing concentrations of TDZ, the observed differences were not statistically significant ( $P = 0.057$ ). In addition, the green plant/albino plant ratio was not significantly different among

treatments ( $P = 0.184$ ). These results suggest that the substitution of BAP by TDZ, when only a cytokinin is used and at these concentrations, did not significantly affect the production of either green or albino plants.



**Fig. 3.1** Effect of four hormonal regimes on plant regeneration: BAP (1.0 mg/l) or TDZ (0.1, 0.3 or 1.0 mg/l) were used in the induction medium. The means and standard errors (bars) are for the four barley cultivars used. GP: green plants; AP: albino plants; TP: total plants; GP/AP: ratio of green to albino plants

In a second phase, we explored the impact of the combined use of TDZ and an auxin in the induction medium. To this end, we combined 0.3 mg/l of TDZ and the auxin dicamba at three concentrations (0.1, 0.3 and 1.0 mg/l). In this case, the number of regenerated green plants increased consistently, and significantly, with increasing concentrations of dicamba (Figure 2). Averaged over the four barley cultivars, all three induction media including dicamba produced significantly more green plants than the BAP control. Relative to the control, the TDZ (0.3 mg/l) + dicamba (1 mg/l) treatment produced greater than five times more green plants on average (176.1 vs 34.2 green regenerated plants, respectively;  $P < 0.001$ ), whereas, the number of albino plants produced did not change significantly (197.1 vs 163.2;  $P = 0.249$ ). Thus, the observed increase in the total number of plants (373.2 vs 196.8;  $P < 0.001$ ) could be almost entirely ascribed to an increase in the production of green plants.



**Fig. 3.2** Effect on plant regeneration of the replacement of the cytokinin BAP by TDZ combined with three levels of the auxin dicamba in the induction medium. The means and standard errors (bars) are for the four barley cultivars used. GP: green plants; AP: albino plants; TP: total plants; GP/AP: ratio of green to albino plants

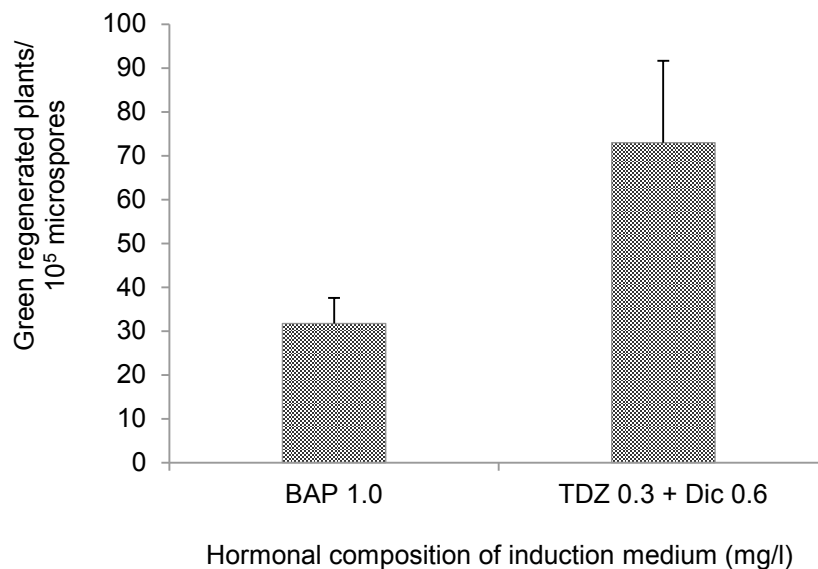
As can also be seen in Figure 2, the green/albino plant ratio increased dramatically from 0.22 for the control treatment up to 0.89 for the TDZ 0.3 mg/l + dicamba 1.0 mg/l treatment ( $P < 0.001$ ). Since the mean number of albino plants was not significantly different among all the treatments, clearly, it is the increasing number of green regenerated plants, associated with the addition of increasing concentrations of the auxin, that allowed the green/albino plant ratio to increase significantly. The beneficial impact of these modified induction media on green plant production is clearly illustrated in Figure 3.



**Fig. 3.3** Effect of hormonal composition of induction media on green plant regeneration. Aliquots of the same lot of isolated microspores of cv. Gobernadora were plated onto: (A) 1.0 mg/l of BAP, (B) 0.3 mg/l TDZ and 0.3 mg/l DIC, (C) 0.3 mg/l TDZ and 1.0 mg/l DIC



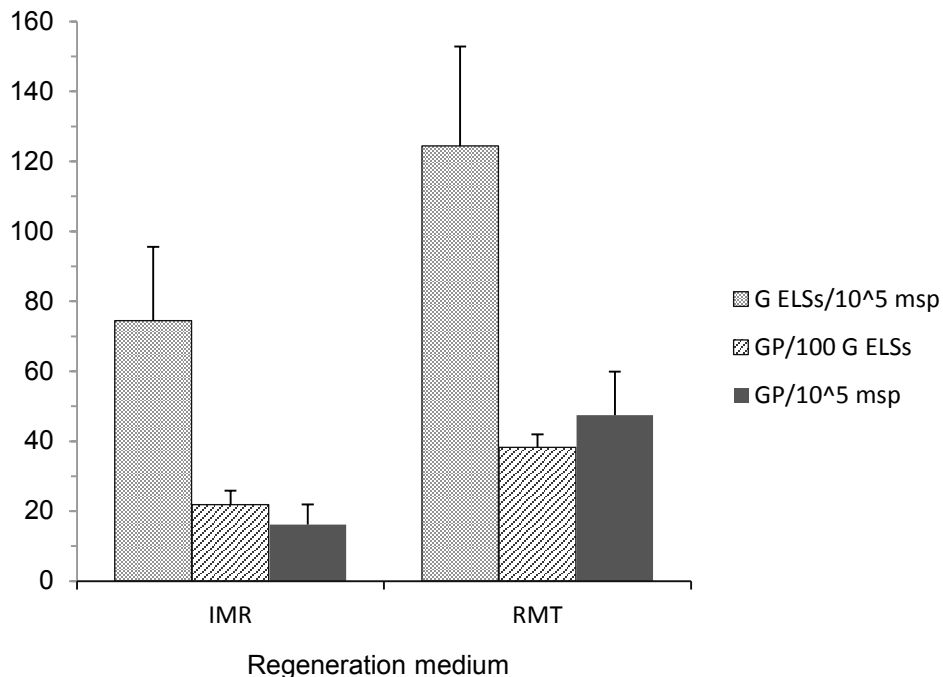
We then sought to verify if this markedly improved production of green plants was specific to the set of cultivars used (of which two were six-row, spring) or could also be observed in a broader set of six-row, spring barley genotypes normally used in breeding programs, i.e. F1 hybrids. Microspores from eight different six-row, spring F1s were cultured in each of two induction media differing in nothing but their hormonal composition: the standard 1.0 mg/l of BAP versus a 0.3 mg/l TDZ + 0.6 mg/l dicamba formulation derived from the previous results. We decided to use an intermediate concentration of dicamba (0.6 mg/l) because green plants obtained at the lower auxin concentration (0.3 mg/l) had a superior appearance to the ones developed at the higher concentration (1.0 mg/l), a qualitative aspect not captured in the numerical data presented in Figure 2 (data not shown). Results from this validation experiment confirmed our previous results on cultivars. As can be seen in Figure 4, a greater than two-fold increase in green plant production (73.0 vs 31.8 green plants per  $10^5$  microspores;  $P = 0.024$ ) was seen, and the appearance of these green plants was very good (not shown). These data confirm our earlier finding that a combination of TDZ and dicamba leads to a significantly increased production of green plants in IMC in six-row, spring barley.



**Fig. 3.4** Comparison of the number of green plants produced per  $10^5$  microspores on two induction media differing in their hormonal composition. The means and standard errors (bars) are for eight six-row, spring F1s

### Hormonal composition of the regeneration medium

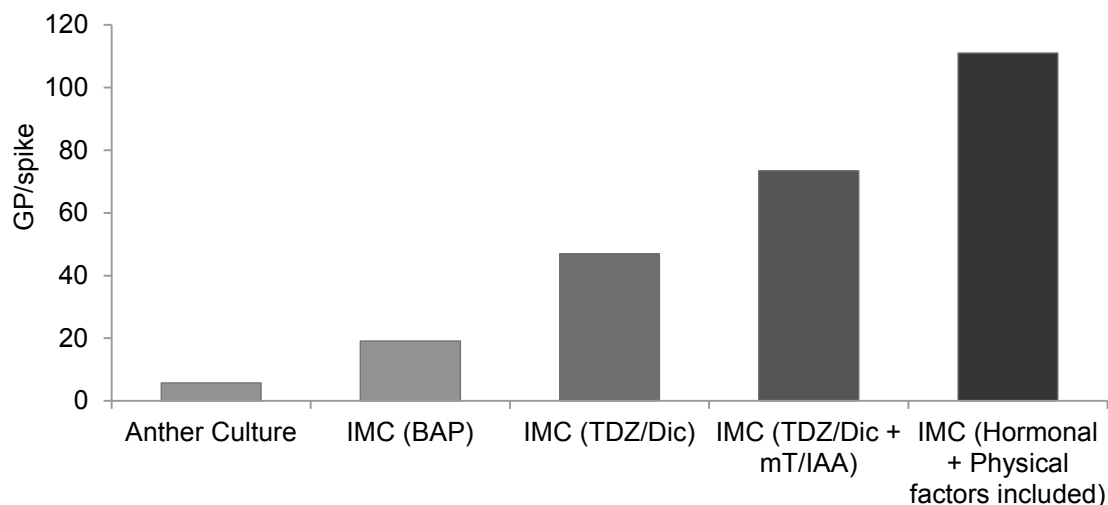
We then focused our attention on the composition of the regeneration medium and compared the widely used IMR medium (0.2 mg/l BAP and 0.2 mg/l IAA) and the RMT medium, newly developed here, and containing 0.1 mg/l of meta-topoline and 0.1 mg/l of IAA. As can be seen in Figure 5, 67 % more (124.4 vs 74.4;  $P = 0.023$ ) green ELSs were obtained from  $10^5$  microspores when ELSs formed on the same induction medium were transferred onto RMT medium compared to IMR medium during regeneration. The successful transition from a green ELS to a green plant (on a hormone-free germination medium) was also seen to be favored by the use of the RMT regeneration medium. As shown in Figure 5, a 75% improvement (38.2 vs 21.8 green plants per 100 green ELSs;  $P < 0.01$ ) in the germination of ELSs was observed under these conditions. Among this set of six-row, spring F1s, the proportion of green ELSs becoming green plants went from 22% on the IMR medium to 38% on the RMT regeneration medium. When these two components of green plant production were considered jointly, the RMT medium lead to a 2.9-fold increase (47.5 vs 16.2 green plants per  $10^5$  microspores;  $P = 0.003$ ) in green plant regeneration compared to the IMR medium.



**Fig. 3.5** Comparison of the efficiency of androgenesis on two regeneration media. The number of green embryo-like structures regenerated from  $10^5$  microspores (G ELSs/ $10^5$  msp), the number of green plants obtained from 100 green embryo-like structures (GP/ 100 ELSs), and the number of green plants obtained from  $10^5$  microspores (GP/ $10^5$  msp) were measured. The means and standard errors (bars) were obtained for five six-row, spring F1s

### Improvement in the efficiency of DH production in six-row spring barley

To gain some perspective on the progress achieved in our DH production in six-row spring barley, we examined the efficiency of this production in five different phases: anther culture (AC), IMC (BAP), IMC (TDZ/Dic), IMC (TDZ/Dic + mT/IAA), IMC (Hormonal + Physical factors) (see Materials and Methods for details). The mean efficiency obtained with AC was 5.7 green plants per spike (Figure 6). When AC was replaced by IMC (BAP), a 3.3-fold increase in efficiency was achieved (19.2 green plants per spike). The replacement of BAP by a combination of TDZ and dicamba increased the efficiency another 2.4-fold, to 47 green plants per spike. Next, the switch to a regeneration medium containing mT and IAA raised the efficiency a further 1.5-fold, to a mean of 73 green plants per spike.



**Fig. 3.6** Impact of hormones and physical factors in HD production efficiency. To the left, anther culture: mean number of green plants per spike (GP/spike) obtained over 5 years with pre-selected 6-row, spring F1 genotypes. IMC (BAP): IMC using the same culture protocol. IMC (TDZ/Dic): using modified hormonal composition of the induction medium. IMC (TDZ/Dic + mT/IAA): using modified hormonal composition of the induction and regeneration media. IMC (Hormonal + Physical factors included): mean efficiency when also modified physical key factors of the protocol were adopted (for details, see text)

## Discussion

### Hormonal composition of the induction medium

In the literature, the hormonal formulation of the induction medium has seldom been considered as an important factor in microspore embryogenesis (Devaux and Pickering, 2005). Recently, Olmedilla (2010) even stated that, in most species, hormones are not essential to induce microspore embryogenesis. Our results paint a somewhat different picture in regards to IMC in six-row, spring barley where we have found that the combined use of both a cytokinin and an auxin proved very effective, allowing us to obtain more than 50 green plants per spike on a very broad set of F1s of this type. At this level of efficiency, a single F1 plant can be used to obtain a few hundred DH lines for breeding or for genetic mapping studies.

The first phase of this research dealt with the replacement of the cytokinin BAP (1.0 mg/l) by the cytokinin TDZ in the IMI induction medium (Li and Devaux, 2003). No significant differences were found in terms of plant regeneration (green, albino and total plants) at 0.1 to 1.0 mg/l TDZ. From this, we can conclude that even at a 10-fold lower concentration, TDZ proved as effective in promoting embryogenesis and regeneration from barley microspores as BAP. Increased concentrations of TDZ did not, however, lead to a concomitant increase in regeneration. It has been hypothesized that this activity at low concentrations might be due to the persistence of TDZ in plant tissues (Mok and Mok, 1985). There are very few published articles on the matter and, to the best of our knowledge, this is the first and only successful report of the use of TDZ in androgenesis in cereals. Ouédraogo et al. (1998) and Kiviharju et al. (2005) added TDZ as a supplement in induction media in anther culture of barley and oat, respectively, and found no benefits or even a reduction of the regeneration efficiency in relation to their controls. On the other hand, successful reports of the use of TDZ in androgenesis exist for some other species like clementine (Germana and Chiancone, 2003), and in gynogenesis for cucumber (Moqbeli et al., 2013) and Peace lily, *Spathiphyllum wallisii*, (Eekhaut et al., 2001). These findings are similar to results reported in other areas of plant *in vitro* culture, such as micropropagation and plant regeneration via organogenesis, where TDZ was effective at much lower concentrations than other cytokinins in woody species (reviewed in Huetteman and Preece, 1993) and in sponge gourd, *Luffa cylindrica* (Sujatha et al., 2013).

In a second phase of this research, a significant improvement in the number of green plants was obtained when TDZ was combined with dicamba, an auxin. Indeed, we found that at a fixed concentration of TDZ (0.3 mg/l), the stimulation of green plant regeneration correlated with increasing concentrations of the auxin in the range 0.1-1.0 mg/l. This could indicate that, under the conditions of the first experiment, where no synthetic auxin was included in the induction medium, the amount of auxin (limited to endogenous production by embryos) could have acted as a limiting factor for green plant regeneration. In the range used in this study (0.1-1.0 mg/l), we did not

observe an optimum for this auxin-stimulated response of plant regeneration, as the number of green plants obtained was highest at the highest dose of auxin (1.0 mg/l dicamba). We did note, however, that at this level of dicamba some detrimental effects (i.e., hyperhydria or vitrification) seemed to be more important during regeneration and early development of plants.

In barley IMC, an auxin-mediated stimulation of green plant regeneration was also obtained by Ziauddin et al. (1992). Indeed, these authors managed to triple the number of regenerated green plants by adding 1-10 mg/l of the auxin phenylacetic acid (PAA) to their induction medium (FHG medium; Hunter, 1988) containing 1 mg/l of BAP. In contrast, the same authors reported that in barley anther culture, the addition of PAA had no effect. Also in barley anther culture, Ouédraogo et al. (1998) observed a decrease in green plant regeneration when 2 mg/l of PAA were used in combination with 1 mg/l of BAP in the induction medium. This might suggest that cultured microspores and anthers respond differently to the addition of an auxin to the induction medium. This could be due to endogenous levels of auxins in barley anther tissue that may already be high, and exogenous auxins either have no effect or may actually be inhibitory, as has been shown in maize by Tsay et al. (1981). Accordingly, Kasha et al. (2003) recommended some experimentation when using supplemental auxin, since plant growth can apparently affect the endogenous levels and thus the requirement for auxin.

In our work, the most productive combination of TDZ and dicamba (instead of BAP alone) in the induction medium lead to almost doubling the total number of plants (373.2 vs 196.8;  $P < 0.001$ ). As only a very slight (and not significant) increase in the number of albinos was observed (197.1 vs 162.6;  $P = 0.249$ ), most of this increase could be attributed to a marked increase in the production of green plants (176.1 vs 34.2;  $P < 0.001$ ). As a result, the ratio of green to albino plants increased dramatically (4.1 fold). To our knowledge, this is the first report of a substantial reduction in the proportion of albinos in cereal androgenesis among recalcitrant genotypes that is attributed to changes in the auxin/cytokinin ratio in the induction medium. It remains to be determined whether the same kind of improvement would be seen using other types of auxin-cytokinin combinations. Although it is well known that cytokinins are involved in the control of chloroplast biogenesis and function (Zubo et al., 2008), the role played by the auxin/cytokinin ratio in increasing the proportion of green regenerated plants is not clear and would deserve further research.

### **Hormonal composition of the regeneration medium**

The replacement of BAP by meta-topoline in the regeneration medium also proved beneficial. A 2.9-fold increase in the number of green plants regenerated from the same number of microspores cultivated on an identical induction medium was obtained. This advantage is attributable, on the one hand, to an increase of 60% in the number of ELSs that developed a green sector indicating the acquisition of photosynthetic capacity. A second component contributing to improved regeneration

of green plants was the 73% increase in the number of embryos germinating successfully to form green plants on the RMT medium. Indeed, 38% of green ELSs resulted in plants when transferred from the RMT medium, which compared to 22% on the IMR medium. The latter is very similar to the results of Li and Devaux (2003), in which 19.8% of transferred embryos yielded green plants among three barley cultivars. Similarly, using a single cultivar (Reinette) on six different regeneration media, Castillo et al. (2000) reported that between 12 and 20% of transferred embryos developed into green plants. Thus, the regeneration medium developed in this work proved very conducive to obtaining green plants, even on relatively recalcitrant materials.

How can this be explained? Compared to BAP, meta-topoline was shown to be translocated faster in plant tissues, which prevents its localized accumulation (Kaminek et al., 1987). This may be an explanation for the reduced callusing that was observed when it was used in micropropagation and organogenesis *in vitro* (Wojtania, 2010). Our observations are in agreement with this, as in regenerating barley microspore-derived embryos, callusing and hyperhydria also diminished on the RMT medium, and a higher proportion of green ELSs became healthy-looking, green plants.

### **Increasing the efficiency of DH production step by step**

Over the last decade, the progressive implementation of a succession of improvements to our DH production protocols in six-row spring barley have led to an almost 20-fold increase in efficiency. A first component (3.3-fold increase) came with the transition to IMC. This improvement could possibly be explained by an “enrichment effect” whereby isolated microspores are selected for viability (through gradient centrifugation) and are directly exposed to the hormonal stimuli of the induction medium (Wenzel *et al.* 1975; Bedinger and Edgerton, 1991). Two additional steps forward were achieved by substituting BAP with alternative growth regulators in the induction (2.4-fold increase) and the regeneration (1.5-fold increase) media. These novel hormonal formulations both increased embryogenesis and reduced albinism. A final step forward (30% increase) came with the adoption of optimized procedures for harvesting, pretreating and plating of microspores.

Collectively, these increases in efficiency significantly reduced both the number of hours of work and the number of cultivated donor plants necessary to produce 200-300 DHs per F1 genotype. Overall, our ability to obtain a set number of DH barley lines was increased markedly and a few hundred DH lines, per cross, can readily be produced in a single year. Also, the response to androgenesis has been raised very significantly, such that the proportion of F1s that yield a useful number of DH lines is above 90% in our experience. This is in stark contrast with the initial situation we faced in AC, where only a subset (typically less than a third) of F1s responded sufficiently well in androgenesis to produce useful sets of progeny. In the context of a breeding program, these improvements result in a reduction in the cost of DH lines and makes them a more attractive means to expedite the development of new and improved varieties in six-row spring barley.

## **Acknowledgments**

The financial support of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and of La Coop Fédérée are acknowledged. The authors wish to thank B. Legge (AAFC Brandon) for providing seeds of some of the cultivars used here.

### Supplementary Table 3.1

**Online Resource 1:** F1 Genotypes used in validation experiments of the new hormonal formulation for barley IMC media. Induction phase: TDZ + dicamba; regeneration phase: mT + AIA

Induction medium experiments		Regeneration medium experiments	
Family code	Cross	Family code	Cross
2905	23CFQ.07.01 / Synabelle	1105	25CFQ.41.297 / AC Klinck
2909	23CFQ.07.01 / 22HD.41.37	1110	25CFQ.41.136 / 25CFQ.41.297
2914	21FHD-164 / Océanik	1114	UL163 / Myriam
2918	21FHD-172 / Océanik	1120	25CFQ.01.277 / Rhea
2924	23CFQ.07.01 / 21FHD-164	1121	23CFQ.09.92 / Rhea
1205	Synasolis / Océanik		
1218	23CFQ.07.01 / Synasolis		
1221	01FSM.12.342 / Synasolis		



**Online resource 2:** Induction (M8M) and regeneration (RMT) media composition for barley IMC. Values are mg/l. M8M and RMT media are modified from IMI and IMR (Li and Devaux, 2003), respectively.

	M8M Induction -liquid phase-	M8M Induction -solid phase-	RMT Regeneration
<b>AUTOCLAVED PHASE</b>			
Agar noble	-	7,5	7,5
<b>FILTERED PHASE</b>			
<b>Macro-elements</b>			
KNO <sub>3</sub>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 900	1 900	1 900
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	165	165	165
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	170	170	170
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	370	370	370
	440	440	440
<b>Micro-elements</b>			
KI			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,83	0,83	0,83
MnSO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	6,2	6,2	6,2
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	22,3	22,3	22,3
NaMoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	8,6
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
EDTA-ferric salt	0,025	0,025	0,025
	43,0	43,0	21,5
<b>Organics</b>			
Glutamin			
Myo-inositol	500	500	500
Casein, hydrolysed	300	300	300
Thiamin.HCl	500	500	500
Nicotinic acid	10	10	10
Pyridoxin.HCl	1	1	1
Ascorbic acid	1	1	1
Arabic gum	25	25	-
(+)-Arabinogalactan	50	50	50
Mannitol	50	50	50
Maltose	32 000	32 000	-
	60 000	60 000	30 000
<b>Phytohormones</b>			
Dicamba			
Thidiazuron	0,6	0,6	-
Meta-topoline	0,3	0,3	-
Indole-3-acetic acid	-	-	0,1
	-	-	0,1
pH	5,8	5,8	5,8

## References

- Asif M (2013) Progress and Opportunities of Doubled Haploid Production. SpringerBriefs in Plant Science 6, doi 10.1007/978-3-319-00732-8\_5
- Bedinger PA, Edgerton MD (1991) Developmental staging of maize microspores reveals a transition in developing microspore proteins. Plant Physiol 92:474-479. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.92.2.474>
- Carman JG (1987) Improved somatic embryogenesis in wheat by partial stimulation of in vitro oxygen, growth regulator, and desiccation environment. Planta 175:417-424
- Castillo AM, Valdés MP, Cistué L (2000) Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. Euphytica 113: 1-8. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1003937530907>
- Cistué L, Ramos A, Castillo AM (1999) Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars. Plant Cell Tiss Org Cult 55: 159-166
- Devaux P, Kasha KJ (2009) Overview of Barley Doubled Haploid Production. In: Touraev A, Forster BP, Jain SM (eds.) Advances in Haploid Production in Higher Plants, Springer Science + Business Media BV
- Devaux P, Pickering R (2005) Haploids in the improvement of Poaceae In: Palmer CE, Keller WA, Kasha KJ (eds) Haploids in crop improvement II, Springer-Verlag Berlin
- Dolezal K, Bairu M, Mala J, Spichal L, Strnad M, Van Staden J (2010) New cytokinin derivatives for plant biotechnology, agriculture and forestry. Conference presentation, 12<sup>th</sup> IAPB Congress
- Eeckhaut T, Werbrouck S, Dendauw J, Van Bockstaele E, Debergh P (2001) Induction of homozygous *Spathiphyllum wallisii* genotypes through gynogenesis. Plant Cell Tiss Org Cult 67:181-189
- Germana MA, Chiancone B (2003) Improvement of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. microspore-derived embryoid induction and regeneration. Plant Cell Rep 22:181-187. doi 10.1007/s00299-003-0669-7
- Guo B, Bilal Haider A, Zeb A, Xu LL, Wei YH (2011) Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. African Journal of Biotechnology 10(44):8984-9000. doi 10.5897/AJB11.636
- Halámková E, Vagera J, Ohnoutková L (2004) Regeneration Capacity of Calli Derived from Immature Embryos in Spring Barley Cultivars. Biol Plantarum 48(2):313-316
- Hoekstra S, van Zijderveld MH, Heidekamp E, van der Mark E (1993) Microspore culture of *Hordeum vulgare* L.: the influence of density and osmolality. Plant Cell Rep 12:661-665
- Hoekstra S, van Bergen S, van Brouwershaven IR, Schilperoort RA, Wang M (1997) Androgenesis in *Hordeum vulgare* L.: Effects of mannitol, calcium and abscisic acid on anther pretreatment. Plant Sci 126:211-218
- Huetteman A, Preece EJ (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tiss Org Cult 33:105-119
- Hunter CP (1988) Plant regeneration from microspores of barley, *Hordeum vulgare* L. Ph D Thesis. Wye College, Univ London
- Kaminek M, Motyka V, Vankova R (1997) Regulation of cytokinin content in plant cells. Physiol Plantarum 101:689-700
- Kasha KJ, Simion E, Oro R, Yao QA, Hu TC, Carlson AR (2001) An improved in vitro technique for isolated microspore culture of barley. Euphytica 120:379-385

- Kiviharju E, Moisaner S, Laurila J (2005) Improved green plant regeneration rates from oat anther culture and the agronomic performance of some HD lines. *Plant Cell Tiss Org Cult* 81:1–9. doi 10.1007/s11240-004-1560-0
- Knudsen S, Dui IK, Andersen SB (1989) Components of Response in Barley Anther Culture. *Plant Breeding* 103:241-246
- Lakshmanan P, Taji A (2000) Somatic embryogenesis in leguminous plants. *Plant Biol* 2:136-148. doi 10.1055/s-2000-9159
- Li H, Devaux P (2003) High frequency regeneration of barley doubled haploid plants from isolated microspore culture. *Plant Sci* 164:379-386. doi:10.1016/S0168-9452(02)00424-7
- Li H, Devaux P (2005) Isolated microspore culture over performs anther culture for green plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Acta Physiol Plant* 27:611-619
- Marchand S, Fonquerne G, Clermont I, Laroche L, Huynh TT, Belzile FJ (2008) Androgenic response of barley accessions and F1s with Fusarium head blight resistance. *Plant Cell Rep* 27:443–451. doi 10.1007/s00299-007-0477-6
- Mendoza MG, Kaeppler HF (2002) Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryo of wheat (*Triticum aestivum* L.) *In Vitro Cell Dev Biol.* 38:39–45. doi 10.1079/IVP2001250
- Mirzaei M, Kahrizi D, Rezaeizad A (2011) Androgenesis and Spontaneous Chromosome Doubling in *Hordeum vulgare* L. Researches of The First International Conference (Babylon and Razi Universities). *Euphrates Journal of Agriculture Science* 3(9):248-252
- Mok MC, Mok DWS, Armstrong DJ, Shudo K, Isogai Y (1982) Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thidiazuron). *Phytochemistry* 21:1509–11. doi 10.1016/S0031-9422(82)85007-3
- Moqbeli E, Peyvast GH, Hamidoghli Y, Olfati JA (2013) In vitro cucumber haploid line generation in several new cultivars. *AsPac J. Mol Biol Biotechnol* 21(1):18-25
- Olmedilla A (2010) Microspore Embryogenesis. In: Pua E-C, Davey MR (eds.): *Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives: Volume 2*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi 10.1007/978-3-642-04670-4\_2
- Ouédraogo JT, St-Pierre C-A, Collin J, Rioux S, Comeau A (1998) Effect of amino acids, growth regulators and genotype on androgenesis in barley. *Plant Cell Tiss Org Cult* 53:59–66
- Schulze J (2007) Improvements in Cereal Tissue Culture by Thidiazuron: A Review. In: *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* 1(2): 64-79, 2007 Global Science Book
- Strnad M (1997) The aromatic cytokinins. *Physiol Plant* 101:674–688. doi 10.1111/j.1399-3054.1997.tb01052.x
- Sujatha D, Chithakari R, Raghavarhdan L, Prasad B, Gulab Khan R, Sadanandam A, Reuben CT (2013) In vitro plantlet regeneration and genetic transformation of sponge gourd (*Luffa cylindrica* L.). *Afr J Plant Science* 7(6):244-252. doi 10.5897/AJPS12.196
- Tsay HS, Teng YC, Lai PC, Chi NC (1981) The culture of rice anthers of *Japonica X Indica* crosses. *J Agric Res China* 30:133–139
- Wenzel G, Hoffmann F, Potrykus I, Thomas E (1975) The Separation of Viable Rye Microspores from Mixed Populations and Their Development in Culture. *Molec gen Genet* 138:293-297
- Weyen J (2009) Barley and wheat doubled haploids in breeding. In: Touraev A, Forster BP, Jain SM (eds) *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Springer Science+Business Media BV
- Wojtania A (2010) Effect of meta-topolin on in vitro propagation of *Pelargonium × hortorum* and *Pelargonium × hederæfolium* cultivars. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 2:101-106

Ziauddin A, Marsolais A, Simion E, Kasha KJ (1992) Improved plant regeneration from wheat anther and barley microspore culture using phenylacetic acid (PAA). *Plant Cell Rep* 11:489-498

Zubo YO, Yamburenko MV, Selivankina SY, Shakirova FM, Avalbaev AM, Kudryakova NV, Zubkova NK, Liere K, Kulaeva ON, Kusnetsov VV, Börner T (2008) Cytokinin Stimulates Chloroplast Transcription in Detached Barley Leaves. *Plant Physiol* 148:1082–1093. doi/10.1104/pp.108.122275

## 4. Conclusion générale

Ce projet de recherche est né de la nécessité de développer un protocole plus efficace pour obtenir des lignées HD chez les orges de printemps à six rangs, un groupe abondamment reconnu comme récalcitrant en androgenèse (Cistué et al., 1999; Marchand et al., 2008; Weyen, 2009). Au moment où se sont amorcés ces travaux, la culture d'anthères (adapté de Hunter, 1988 et Ouédraogo et al., 1998), était employée pour obtenir des plantes HD dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique de l'orge. Cependant, la productivité en plantes vertes était faible, car une moyenne de cinq plantes vertes/épi était obtenue. Mais cela ne dit pas tout, car une bonne moitié des croisements étaient écartés au terme d'une phase exploratoire du potentiel en culture d'anthères à cause d'une réponse trop basse en régénération, ou bien d'un taux d'albinisme trop élevé. Ainsi, en plus de ne pouvoir s'appliquer qu'à un sous-ensemble de tous les croisements visés, la culture d'anthères nécessitait le recours à de nombreuses plantes-mères de chaque croisement et de nombreux mois de travail pour atteindre l'objectif visé de 200 plantes vertes. Cette faible efficacité avait évidemment un impact important sur le coût de revient de chaque lignée HD produite.

C'est donc dans ce contexte de très faible productivité en culture d'anthères que nous avons décidé d'évaluer la culture de microspores isolées comme méthode alternative, autant pour augmenter la production de HD que son efficacité. Pour ce faire, notre approche expérimentale a consisté à définir les objectifs partiels suivants :

- a) obtenir un grand nombre de microspores d'une excellente qualité,
- b) fournir les conditions de culture qui maximisent leur réponse in vitro,
- c) améliorer la conversion d'embryons en plantes vertes.

Ainsi, nous avons d'abord considéré les objectifs (a) et (b) comme étant associés à la viabilité et à la compétence embryogénique des microspores, lesquelles seraient soumises à l'influence des conditions de prétraitement, d'isolement et d'étalement des microspores,

tandis que l'objectif (c) serait davantage affecté par les conditions de culture in vitro en phases d'induction et de régénération.

Il a été signalé que la difficulté principale pour améliorer un protocole d'androgenèse réside dans le grand nombre de facteurs qui contrôlent et influencent le processus (Wędzony et al., 2009). Dans notre cas, après une revue exhaustive de la littérature, nous avons choisi de travailler sur deux ensembles de facteurs clés à l'égard de leur influence sur l'embryogenèse et la régénération de plantes vertes (Kasha, et al., 2001; Forster et Thomas, 2004; Devaux et Pickering, 2005). Ainsi, dans un premier volet expérimental, les quatre facteurs physiques suivants ont été visés : le stade des microspores à la récolte, le prétraitement, l'osmolalité du milieu d'induction et la densité à l'étalement des microspores. Dans un second volet, nous avons décidé d'étudier l'impact des phytohormones, autant en phase d'induction que de régénération.

Un autre défi considérable que l'on rencontre lors de l'élaboration d'un protocole de culture in vitro, c'est que les nombreux facteurs à optimiser peuvent interagir entre eux. Par exemple, rappelons que dans le cas des phytohormones, les ratios entre ces composés de groupes différents sont parfois aussi importants que les concentrations absolues (Davies, 2010). Cela rend tout travail d'optimisation particulièrement difficile. Un autre défi considérable provient des différences parfois marquées entre les réponses de différents génotypes d'une même espèce. Ainsi, il est important de choisir des génotypes qui sont suffisamment représentatifs pour amorcer un travail d'optimisation. Pour arriver à ces fins, nous avons d'abord réalisé des expériences exploratoires, à une échelle réduite, avec deux cultivars d'orge à deux rangs, l'un d'hiver et l'autre de printemps, et deux cultivars représentatifs des orges de printemps à six rangs. Ensuite, notre approche considérait que les résultats et informations obtenus lors des travaux exploratoires avec les quatre cultivars seraient mis à l'épreuve, par la suite, avec des génotypes F1 d'orges à six rangs de printemps.

En raison de la faible connaissance et compréhension des bases physiologique et moléculaire des mécanismes qui rendent possible la morphogenèse in vitro des végétaux, le développement de protocoles de culture in vitro est souvent considéré comme largement empirique (Chan, 2010; Dunwell, 2010; Soriano et al., 2013). Ce n'est qu'après une très longue série d'expériences que, étape par étape, nous avons réussi à développer le protocole qui a rencontré nos objectifs de départ. Ainsi, après avoir redéfini amplement les conditions expérimentales de départ, nous avons pu à la fois augmenter de façon substantielle la fréquence d'embryogenèse gamétique et réduire considérablement l'incidence de l'albinisme.

Comment se compare l'efficacité de ce protocole de CMI à d'autres protocoles ? Il est plus difficile qu'il n'y paraît de comparer l'efficacité de ce protocole CMI à d'autres protocoles, d'abord parce que le type d'orge employé ici (printemps, à six rangs) a été peu employé dans les travaux publiés antérieurement. Deuxièmement, même lorsqu'un même type d'orge est employé, les génotypes particuliers utilisés peuvent affecter la comparaison. Une première comparaison directe peut être faite avec les travaux de Marchand et al. (2008), car les mêmes génotypes d'orge de printemps à six rangs ont été employés en culture d'anthers. Dans ce travail, les génotypes ACCA et Léger (tous deux à six rangs et de printemps) étaient assez représentatifs des résultats obtenus avec des orges de ce type, avec 0,55 et 1,31 plante verte par épi (respectivement) et une incidence d'albinisme plus faible que la moyenne (à 54,8 % et 71,9 %, respectivement). Dans le présent travail, nous avons obtenu un accroissement de 300 fois du nombre de plantes vertes (166 vs 0,55 plantes vertes/épi) avec ACCA et de 100 fois (130 vs 1,31) pour Léger. En CMI, nous avons trouvé un seul travail où des orges de printemps à six rangs ont été employées. En effet, Kasha et al., 2001 ont utilisé deux génotypes à six rangs de printemps mais n'ont pas rapporté la quantité de plantes vertes obtenues, seulement qu'ils avaient affiché une forte incidence d'albinisme ( $\geq 95\%$ ).

Par ailleurs, le protocole de CMI mis au point ici se compare-t-il bien à d'autres protocoles rapportés sur les génotypes « témoins » employés, c'est-à-dire les orges à deux rangs Igri et Gobernadora ? Le premier se veut un génotype très largement employé en androgenèse

chez l'orge (tant en CA qu'en CMI) et, dans quatorze articles publiés au cours de dernières années, on rapporte des résultats variant entre 106 et 1250, avec une moyenne générale de 400 plantes vertes par épi au moyen de ce cultivar en CMI (Ziauddin et al., 1990; Hunter, 1987; Kuhlman et al., 1991; Ziauddin et al., 1992; Hoekstra et al., 1992, 1993, 1996, 1997, van Bergen et al., 1999; Harwood et al., 1995; Cistué et al., 1995; Mordhorst et Lörz, 1993; Davies et Morton, 1998; Olsen, 1991). Dans ce travail, nous avons obtenu une moyenne de 434 plantes vertes par épi, ce qui représente un résultat assez conforme à ce qui a été rapporté ailleurs. Quant au second génotype, Gobernadora, celui-ci avait montré une incidence très marquée de l'albinisme dans les travaux de Marchand et al. (2008), puisque 99,9 % des plantes obtenues étaient albinos et cela entraînait une très faible productivité en matière de plantes vertes (0,07 plante verte par épi). Avec notre protocole de CMI, nous avons observé une productivité de 103 plantes vertes/épi et un taux d'albinisme fortement réduit (à 65 %).

En prenant un peu de recul, il peut être intéressant de s'interroger sur les impacts relatifs des différentes composantes d'un protocole de CMI qui ont fait l'objet d'une optimisation. Parmi les facteurs physiques (étudiés dans le premier volet), lequel s'est avéré le plus important ? Pareillement, parmi les différents changements qui ont été apportés à la composition des milieux de culture, lequel a contribué le plus à l'augmentation de l'efficacité ? Finalement, entre les facteurs physiques et les phytohormones, lesquels ont eu l'impact le plus marquant lors de ces travaux d'optimisation.

En ce qui a trait à l'optimisation des facteurs physiques, notons d'abord qu'il nous a été possible, à chaque stade de la CMI, d'au moins doubler l'efficacité par rapport au traitement témoin. L'effet de ces différentes améliorations étant multiplicatif, il en aura résulté un accroissement très important de l'efficacité. Néanmoins, à titre individuel, il nous semble que l'impact de la densité d'étalement des microspores s'est avéré particulièrement impressionnant. À lui seul, ce facteur représente le plus haut taux d'amélioration observé puisque l'étalement d'un même nombre de microspores ( $2 \times 10^5$ ) a produit un nombre de plantes vertes 5,6 fois plus élevé en passant d'une densité d'étalement « faible » ( $2,5 \times 10^5$  microspores/ml), une densité pourtant à la limite supérieure de ce que l'on rencontre dans la



littérature, à une densité « élevée » (entre 1 et 2 x 10<sup>6</sup> microspores/ml). Au présent, on ne peut que spéculer à propos des signaux biochimiques de communication intercellulaire impliqués dans la transmission et l'amplification de la réponse embryogénique des microspores en situation de haute densité. Pourtant, on pense que l'élucidation de la nature de ces signaux pourrait permettre de mieux comprendre, voire même de surmonter la récalcitrance à l'androgénèse chez d'autres génotypes, et peut être même d'autres espèces.

Dans le volet portant sur les phytohormones, les nouveaux régimes hormonaux mis au point ont eu des impacts bénéfiques comparables qui se sont traduits par des augmentations très significatives du rendement en plantes vertes. Ici encore, l'effet multiplicatif des améliorations à chacune de deux phases de culture *in vitro* de la CMI, conjugué aux améliorations apportées au volet précédent, s'est traduit par une augmentation très substantielle de la productivité en plantes vertes chez les orges de printemps à six rangs. Nous croyons que la contribution la plus importante de ce travail ait été de démontrer l'intérêt d'explorer une plus grande gamme de composés ayant une activité hormonale. En effet, l'emploi de phytohormones peu ou pas utilisées précédemment en androgénèse nous a permis d'enregistrer des gains significatifs à chaque étape du processus. Il s'agit là d'un champ d'investigation qui reste largement à explorer, vu le peu de travaux rapportés en la matière.

Si l'on considère les deux volets ensemble, il nous semble que c'est l'optimisation des phytohormones qui a eu le plus d'impact sur la régénération de plantes vertes. Si on considère la réduction de l'albinisme comme étant le facteur limitant chez les génotypes récalcitrants à l'androgénèse, l'optimisation des phytohormones a été la modification la plus importante. En utilisant les milieux améliorés, même avec le prétraitement le moins performant (froid), il a été toujours possible de régénérer en moyenne 51,7 et 35,3 plantes vertes par épi, respectivement, sur quatre cultivars et quatre génotypes F1 d'orge de printemps à six rangs.

Au terme de ces travaux d'optimisation, la productivité en plantes vertes a augmenté considérablement au sein de notre laboratoire de production. En effet, l'efficacité obtenue avec notre protocole est telle qu'au terme d'une seule induction regroupant quelques épis d'une même plante-mère, le nombre désiré de plantes vertes (200-250) est obtenu. Ceci permet de simplifier la traçabilité des opérations au labo, tout en réduisant les possibilités d'erreurs des opérateurs.

Un autre aspect très important de ce travail est son efficacité généralisée sur les orges de six rangs de printemps de notre programme de sélection. Il a été suggéré que des protocoles de CMI devraient être développés au cas par cas (Dunwell, 2010; Soriano et al., 2013), et que rarement un protocole optimisé pour un génotype était optimal aussi pour d'autres (Wędzony et al., 2009). Pourtant, le protocole issu de ces travaux s'est avéré efficace sur plusieurs dizaines de plantes F1 issues de croisement entre parents de type six rangs de printemps. Même si l'on observe encore des écarts de productivité entre les génotypes, la quasi-totalité des plantes F1 employées en CMI ont permis d'obtenir au moins une centaine de plantes vertes et une grande majorité de ces F1 produisent le maximum fixé (I. Clermont, comm. pers.). Ainsi, contrairement à la situation rencontrée antérieurement en culture d'anthères, la CMI nous permet d'obtenir une progéniture HD pour presque tous les croisements jugés « prioritaires » par le sélectionneur.

En résumé, les deux atouts principaux de notre travail sont, d'une part, d'avoir réussi à augmenter de manière très importante la productivité des orges de printemps à six rangs en androgenèse et, d'autre part, d'avoir obtenu une réponse relativement uniforme au sein de ce type d'orge. Sur le plan pratique, les écarts entre les plantes les plus prolifiques et les plus récalcitrantes sont maintenant réduits car on arrête la production à 200 ou 250 plantes vertes par croisement, et le nombre minimal de plantes vertes obtenues est rarement inférieur à quelques dizaines. Pour un programme de production de lignées HD, cela représente une situation très prisée.

Malgré ces importants progrès réalisés par une approche très empirique, il n'en demeure pas moins qu'il reste d'énormes lacunes dans nos connaissances en ce qui a trait aux assises

génétiques et biochimiques des changements importants qui permettent à une microspore de donner naissance à une plante entière. Dans notre laboratoire, des travaux ont été mis en marche sur divers aspects de l'androgenèse tels que les changements épigénétiques qui surviennent au cours de la reprogrammation génétique de la microspore et les altérations génomiques qui causent l'albinisme.

Finalement, nos résultats présentent un grand potentiel pour explorer l'application de ce protocole CMI sur d'autres systèmes biologiques dits « récalcitrants » en androgenèse tel que, par exemple, l'avoine (Sihdu and Davies, 2009), le riz var. Indica (Javed et al., 2012; Silva, 2010), et éventuellement d'autres espèces même plus éloignées. Nos prochains travaux au labo vont aborder expérimentalement l'étude de cette hypothèse en employant le protocole de CMI mis au point au cours de cette thèse sur d'autres espèces cultivées.



## 5. Bibliographie

- Adamczuk A., Siegień I., and I. Ciereszko (2012): Morphogenesis of plants in vitro under stress conditions. In: G. Łaska (ed.) Biological diversity - from cell to ecosystem. Polish Botanical Society - Branch in Białystok, pp. 25-40.
- Ahsan Khan M., and J. Ahmad (2011): In Vitro Wheat Haploid Embryo Production By Wheat x Maize Cross System Under Different Environmental Conditions. Pak. J. Agri. Sci., Vol. 48(1), 39-43.
- Ammirato, P.V. (1983): Embryogenesis. In: Handbook of Plant Cell Culture. Evans, D., Sharp, W.R., Ammirato, P.V. and Yamada, Y. (Eds.) MacMillan, New York. Pp.82-123
- Armstrong C.L. and C.E. Green (1985): Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta*, 164: 207-214.
- Asif, M. (2013): Progress and Opportunities of Doubled Haploid Production. Series: SpringerBriefs in Plant Science, Vol. 6; 75 pp.
- Atanassov A., N. Zagorska, P. Boyadjiev and D. Djilianov (1995): In Vitro production of haploid plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol 11: 400-408.
- Benson E. (2008): Cryopreservation of Phytodiversity: A Critical Appraisal of Theory & Practice. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27:141–219.
- Bingham I.J., A.J. Karley, P.J. White, W.T.B. Thomas and J.R. Russell (2012): Analysis of improvements in nitrogen use efficiency associated with 75 years of spring barley breeding. *Europ. J. Agronomy* 42: 49– 58.
- Blattner F.R. (2009). "Progress in phylogenetic analysis and a new infrageneric classification of the barley genus *Hordeum* (*Poaceae: Triticeae*)". *Breeding Science* 69 (5): 471–480
- Brown D.C.W. and T.A. Thorpe (1995): Crop improvement through tissue culture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11, 409-415.
- Caboche M. (2010): Specificities of plant development - Spécificités du développement des plantes. *C. R. Biologies* 333: 288–289.
- Caredda S., P. Devaux, R. S. Sangwan, and C. Clément (1999): Differential development of plastids during microspore embryogenesis in barley. *Protoplasma* 208: 248-256
- Carman, J.G. (1990): Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 26: 746-753.
- Castillo, A.M., M.P. Valdés and & L. Cistué (2000): Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. *Euphytica* 113: 1–8
- Chan, S.W.L. (2010): Chromosome engineering: power tools for plant genetics. *Trends in Biotechnology*, Vol. 28: No. 12
- Choo T.M., E. Reinbergs and K.J. Kasha (1985): Use of Haploids in Breeding Barley. *Plant Breed Reviews*. Volume 3: 219-251.

- Christianson M.L. (1987): Causal effects in morphogenesis. In: Green C.E., Somers, D.A., Hackett, W.P.& Biesboer D.D. (eds.) Plant Cell and Tissue Culture. Alan R. Liss, Inc. New York, pp. 45-55.
- Cistué L, Vallés MP, Echávarri B, Sanz JM, Castillo AM (2003) Barley anther culture. In: Maluszynski M, Kasha K, Foster B (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants, A Manual. FAO/IAEA Division., Kluwer, DordrechtWien, A Manual; pp 29-35
- Cistué L., A. Ramos, A.M. Castillo and I. Romagosa (1994): Production of large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol. Plant Cell Reports 13: 709-712.
- Cistué, L., A. Ramos & A.M. Castillo (1999): Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 55: 159–166
- Clapham D (1973) Haploid *Hordeum* plants from anther in vitro. Z. Pflanzenzucht. 69: 142-155.
- Cockram J., H. Hones and D.M. O’Sullivan (2011): Genetic variation at flowering time loci in wild and cultivated barley. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization 9(2): 264–267
- COST Action 851 (2006): Gametic cells and molecular breeding for crop improvement. Final Report. Period: from Nov. 2001 to Nov. 2006. [http://w3.cost.eu/fileadmin/domain\\_files/ABFS/Action\\_851/progress\\_report/progress\\_report-851.pdf](http://w3.cost.eu/fileadmin/domain_files/ABFS/Action_851/progress_report/progress_report-851.pdf)
- Datta, S.K. (2005): Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. Current Science, Vol 89 (11): 1870-1878.
- Davies, P. J., (2010). Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! 801pp Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Davies, P.A. and S. Morton (1998): A comparison of barley isolated microspore and anther culture and the influence of cell culture density. Plant Cell Reports 17: 206–210
- de Faria Maraschin S.: Androgenic switch in barley microspores; PhD thesis. Universiteit Leiden, 9 février 2005
- Devaux P, Pickering R (2005) Haploids in the improvement of Poaceae In: Palmer CE, Keller WA, Kasha KJ (eds) Haploids in crop improvement II Springer-Verlag Berlin, p 215-242
- 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: 215-219.
- Devaux, P. (2003): The *Hordeum bulbosum* (L.) method. In: Maluszynski, M., K.J. Kasha, B.P. Forster and I. Szarejko (Eds.), Doubled haploid production in crop plants: A manual. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Boston, London

- Devaux, P. and K.J. Kasha: Overview of Barley Doubled Haploid Production. Chapter 3, in Touraev, Alisher; Forster, Brian P.; Jain, Shri Mohan (eds.) *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 348 pp, Springer Science + Business Media B.V. 2009
- Devaux, P., M. Zivy, A. Kilian and A. Kleinhofs (1996): Doubled haploids in barley. In: Proc. V International Oat Conference and VII International Barley Genetics Symposium. Scoles, G. and B. Rosznagel (Eds.) Univ. of Saskatchewan, Saskatoon, pp. 213–222.
- Dunwell JM (1985) Haploid cell cultures. In: Dixon RA (ed) *Plant Cell Culture: A Practical Approach*. IRL Press, Banberry
- FAOSTAT, septembre 2013: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>
- Ferrie A.M.R., Caswell K.L. (2011). Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell and Tissue Culture*, 104: 301-309.
- Foroughi-Wher, B., G. Mix, H. Caul and H.M. Wilson (1976): Plant production from cultured anthers of *Hordeum vulgare* L. *Z. Pflanzenzuchtg.* 77: 198-204.
- Foroughi-Wehr B., Pickering R. and W. Friedt (1981): Related response of barley cultivars to the "bulbosum-" and anther-culture techniques of haploid production. *Barley Genetics Newsletter*, Vol. 11, II. Research Notes: 54-59
- Forster, B.P. and W.T.B. Thomas (2005) Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed Rev* 25: 57-88
- Forster, E. Heberle-Bors, K.J. Kasha and A. Touraev (2007): The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Sci.* 12: 368–375
- Gallais A. 1990. Quantitative genetics of doubled haploid populations and application to the theory of line development. *Genetics.* 124: 199-206.
- Gamborg O.L. (1986): Protoplasts and plant regeneration in culture. In: Demain A.L., Solomon N.A. (eds.): *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- 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.
- Gauthéret, R. (1939) : Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *C. R. Soc. Biol. Paris* 208: 118–120.
- Germanà M.A. (2011): Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep* 30: 839–857
- Graner, A., Foroughi-Wehr, B., and A. Tekauz (1996): RFLP mapping of a gene in barley conferring resistance to net blotch (*Pyrenophora teres*). *Euphytica*, 91: 229–234
- Grout B.W.W. (1999): Meristem-Tip Culture for Propagation and Virus Elimination. Ch. 11, in: *Methods in Molecular Biology*, Vol 7 11 *Plant Cell Culture Protocols*. R.D. Hall ed., Humana Press Inc, Totowa, NJ.

- Guha, S. and S.C. Maheshwari (1964): In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature (Lond)* 204: 497.
- Guha, S. and S.C. Maheshwari (1966): Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* in vitro. *Nature (Lond)* 212:97-98.
- Haberlandt, G. (1902): Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitz-Ber. Mat. Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien* 111: 69–92.
- He H., He L. and M. Gu (2012): Interactions between nitric oxide and plant hormones in aluminum tolerance. *Plant Signaling & Behavior* 7(4): 469–471.
- Henry Y., P. Vain and J. De Buyser (1994): Genetic analysis of in vitro plant tissue culture responses and regeneration capacities. *Euphytica* 79: 45-58.
- Ho K.M. and K.J. Kasha (1975): Genetic control of chromosome elimination during haploid formation in barley. *Genetics* 81: 263-275.
- Hoekstra, S., M.H. van Zijderveld, E Heidekamp, and E van der Mark (1993): Microspore culture of *Hordeum vulgare* L.: the influence of density and osmolality. *Plant Cell Reports* 12: 661-665
- Hoekstra, S., M.H. van Zijderveld, J.D. Louwerse, F. Heidekamp and F. van der Mark (1992): Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. *Plant Science* 86: 89-96
- 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: 211-218
- Horsley, R.D. and B.L. Harvey. 2011. Barley breeding history, progress, objectives, and technology: North America. In S.E. Ullrich (ed.) *Barley: production, improvement, and uses*. World Agriculture Series. Wiley-Blackwell. A. John Wiley & Sons, Inc. Oxford, UK pp.171-185.
- Houben A., M. Sanei and R. Pickering (2011): Barley doubled-haploid production by uniparental chromosome elimination. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 104: 321–327.
- Huang, B. and N. Sunderland (1982): Temperature-stress pretreatment in barley anther culture. *Annals of Botany, London*, Vol. 49: 77-88.
- Hunter CP (1988) Plant regeneration from microspores of barley, *Hordeum vulgare* L. Ph D Thesis. Wye College, Univ London, London.
- Hussain B., Ahsan Khan M., Qurban A. and S. Shaukat (2012a): Double Haploid Production is the Best Method for Genetic Improvement and Genetic Studies of Wheat. *IJAVMS*, Vol. 6(4): 216-228.
- Hussain S., S. Fareed, S. Ansari, R. Rahman, I. Zareen Ahmad and M. Saeed (2012b): Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J Pharm Bioallied Sci.* 4(1): 10–20.
- Islam S.M.S. and N. Tuteja (2012): Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plant Science* 182: 134– 144.



- Jacobsen, H.J. (1991): Biochemical and molecular studies on plant development in vitro. In: Biswas, B.B. and Harris, J.R. Eds.: Subcellular Biochemistry. Plant Genetic Engineering. New York, Plenum Press, v. 17, p. 265-277.
- Jacquard C., G. Wojnarowicz and C. Clement (2003): Anther culture in burley. In: Double haploid production in crop plants (Maluszynski M., Kasha K., Foster B. eds.), pp 21-27.
- Jähne, A. and H. Lörz (1995): Cereal microspore culture. Plant Sci. 109: 1-12
- Jähne-Gartner, A. and H. Lörz: Protocols for anther and microspore culture of barley. In: Hall, R. D., ed. Plant cell culture protocols (Methods in molecular biology, Vol. III). Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 1999; 269–279.
- Jähne-Gartner, A. and Lörz, H. (1999): Protocols for anther and microspore culture of barley. Methods Mol. Biol.: Plant Cell Culture Protocols, 111, 269–279.
- Jansen M.A.K., H. Booij, J.H.N. Schel and S.C. de Vries (1990): Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. Plant Cell Rep 9: 221–223.
- Javed M.A., A.S. Azman, H. Topik, W. Alina and R.A.W. Baqr (2012): Studies to Investigate the Interactions of Genotypes, Culture Media and Culture Temperatures on Androgenesis in Recalcitrant *Indica* Rice (*Oryza sativa* L.). Jurnal Teknologi 59: 75–79.
- Jestin L. (1992): L'orge. In : A. Gallais and H. Bannerot (éds). Amélioration des espèces végétales cultivées. Paris, INRA Editions, pp. 55-70
- Jimenez, V. M. (2001): Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, vol.13 (2): 196-223.
- Kahani F., F. Bakhtiar, R. Bozorgipour, S. Hittalmani, H.R. Nik Khah and K. Zargari (2012): Production and evaluation of doubled haploid lines of barley via detached-tiller culture method. African Journal of Biotechnology Vol. 11 (22), pp. 6075-6082.
- Kahrizi D., and M. Mirzaei (2012): Induced Androgenic Embryogenesis in Cereals. Chapter 13, In: Embryogenesis, Ken-Ichi Sato (ed.). InTech, 2012.
- Kasha, K.J. and K.N. Kao (1970): High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature 225, 874–876
- Kasha, K.J. and M. Maluszynski: Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. In: Maluszynski M., K.J. Kasha, B.P. Forster & I. Szarejko (eds.), Doubled Haploid Production in Crop Plants - A Manual. Kluwer Academic Publishers Dordrecht/ Boston/ London, pp. 1-4. 2003.
- Kasha, K.J., E. Simion, R. Oro, Q.A. Yao, T.C. Hu and A.R. Carlson (2001): An improved in vitro technique for isolated microspore culture of barley. Euphytica 120: 379-385
- Kögl, F. and Kostermans, D.G.F.R. (1934). Heteroauxin als Stoffwechselprodukt niederer pflanzlicher Organismen. Isolierung aus Hefe. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 228, 113-121

- Kumari M., Clarke H.J., Small I. and Siddique K.H. (2009): Albinism in plants: a major bottleneck in wide hybridization, androgenesis and doubled haploid culture. *Crit Rev Plant Sci* 28:393–409
- Li H. and P. Devaux (2001): Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. *Plant Cell Rep* 20: 475-481
- Li H. and P. Devaux (2005): Isolated microspore culture over performs anther culture for green plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Acta Physiol Plant* 27: 611-619
- Li W-Z., Z-H. Song, J-K. Jing and H. Hu (1995): Effects of mannitol pre-treatment on androgenesis of barley *Hordeum vulgare* L. *Acta Bot Sin* 37: 552–557
- Li, H. and P. Devaux (2003): High frequency regeneration of barley doubled haploid plants from isolated microspore culture. *Plant Science* 164: 379-386
- Lörz H., E. Gobel. And P. Brown (1988): Advances in Tissue Culture and Progress Towards Genetic Transformation of Cereals. *Plant Breed* 100: 1-25
- Lu R., Y. Wang, Y. Sun, L. Shan, P. Chen and J. Huang (2008): Improvement of isolated microspore culture of barley (*Hordeum vulgare* L.): the effect of floret co-culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 93: 21-27
- Maluszynski, M., K.J. Kasha, B.P. Forster and I. Szarejko (2003): Doubled haploid production in crop plants: A manual. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Boston, London
- Maraschin S.F., W. de Priester, H.P. Spaink and M. Wang (2005): Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany* 56, 1711–1726.
- Marchand S., G. Fonquerne, I. Clermont, L. Laroche, T.T. Huynh and F.J. Belzile (2008): Androgenic response of barley accessions and F1s with *Fusarium* head blight resistance. *Plant Cell Rep* (2008) 27: 443–451
- Mathur S. (2013): Conservation of Biodiversity Through Tissue culture. *Research and Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 2(3): 1-6.
- Mikihisa Umehara M., A. Hanada, S. Yoshida, K. Akiyama, T. Arite, N. Takeda-Kamiya, H. Magome, Y. Kamiya, K. Shirasu, K. Yoneyama, J. Kyojuka and S. Yamaguchi (2008): Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature Reviews* Vol 455: 195-201.
- Miller C.O., F. Skoog , M.H. Von Saltza and F.M. Strong (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (5): 1392–1392.
- Mirzaei M., D. Kahrizi and A. Rezaeizad (2011): Androgenesis and Spontaneous Chromosome Doubling in *Hordeum vulgare* L. *Researches of The First International Conference (Babylon and Razi Universities)*. *Euphrates Journal of Agriculture Science* 3 (9): 248-252
- Morel G.M. (1960): Producing virus-free *Cymbidiums*. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 29: 495-497.

- MorhHDorst A.P. and H. Lorz (1993): Embryogenesis and development of isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores are influenced by the amount and composition of nitrogen sources in culture media. *Journal of Plant Physiology* 142 (4): 485–492.
- Morrison, R.A. and D.A. Evans (1988): Haploid plants from tissue culture: New plant varieties in a shortened time frame. *Bio/Technology* 6: 684–689
- Morrison, R.A., D.A. Evans and Z.G. Fan (1991): Haploid plants from tissue culture: application in crop improvement. In: *Sub-cellular Biochemistry*, Plenum Press, New York pp 53-72.
- Muñoz-Amatriaín M., J.T. Svensson, A.M. Castillo, T.J. Close and M.P. Vallés (2009): Microspore embryogenesis: Assignment of genes to embryo formation and green vs. albino plant production. *Functional and Integrative Genomics* 9 (3): 311-323.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962), A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–497.
- Murashige, T.: Principles of rapid propagation. In: *Proc. Symp. on Propagation of higher Plants through Tissue Culture. A Bridge between Research and Application*. Feb., 1979, Univ. of Tenn., Knoxville, TN.
- Namasivayam P. (2007): Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 90:1–8.
- Navatel, J.C. (1990) : Intégration des techniques de culture in vitro dans les schémas de certification. *Infos CTIFL* 58: 21-27.
- Nobécourt, P. (1939): Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *Compt. Rendus Soc. Biol. Lyon* 130: 1270–1271.
- Normanly J. (2010): Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a001594.
- Oleszczuk, S., S. Sowa, and J. Zimny (2006): Androgenic response to preculture stress in microspore cultures of barley. *Protoplasma* 228: 95-100
- Olmedilla, A. Chapter 2: Microspore Embryogenesis. In: E-C. Pua and M.R. Davey (eds.), *Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives: Volume 2*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010
- Olsen, L.F. (1991): Isolation and cultivation of embryogenic microspores from barley (*Hordeurn vulgare* L.). *Hereditas*, 115: 255-266
- Ouédraogo J. T., C-A St-Pierre, J. Collin, S. Rioux, A. Comeau (1998): Effect of amino acids, growth regulators and genotype on androgenesis in barley. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 53 (1): 5
- Pickering RA and P. Devaux (1992) Haploid production: Approaches and use in plant breeding. In: *Genetics, Molecular Biology and Biotechnology, Barley*. Ed. by PR Shewry, CAB Internat., Wallingford, pp 511-539.
- Pratap A., A.K. ChouHDary and J. Kumar (2010): In vitro techniques towards genetic enhancement of food legumes – a review. *Journal of Food Legumes* 23(3&4): 169-185.

- Preece J.E. (1995): Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.* 1: 26–37.
- Preece J.E. (2008): Stock Plant Physiological Factors Affecting Growth and Morphogenesis. In: E.F. George, M.A. Hall and G-J. De Klerk (Eds.): *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3rd Edition. Volume 1. The Background.
- Rajcan, I., J.G. Boersma, and E.J. Shaw: *Plant Genetic Techniques: Plant Breeder's Toolbox*. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, Volume 4, 2011, p 133-147. Elsevier.
- Ramage C.M. and R.R. Williams (2002): Mineral nutrition and plant morphogenesis. In *in vitro Cellular & Development Biology*, Gaithersburg, Vol.38:, p.115-124.
- Ramage, R.T. (1987): A history of barley breeding methods. *Plant Breed. Rev.* 5: 95-138.
- Rani V. and S.N. Raina (2000): Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: A critical reappraisal. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 36: 319-330.
- Rhodes C.A., C. E. Green and R.L. Phillips (1986): Factors affecting tissue culture initiation from maize tassels. In: *Plant Sciences*, vol. 46: 225–232.
- Riggs T.J., P.R. Hanson, N.D. Start, D.M. Miles, C.L. Morgan and M.A. Ford (1981): Comparison of spring barley varieties grown in England and Wales between 1880 and 1980. *J. Agric. Sci., Camb.* 97: 599–610.
- Roberts-Oehlschlager S.L. and J.M. Dunwell (1990): Barley anther culture: pretreatment on mannitol stimulates production of microspore-derived embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 20: 235-240.
- Saisho D. and M.D. Purugganan (2007): Molecular Phylogeography of Domesticated Barley Traces Expansion of Agriculture in the Old World. *Genetics* 177: 1765–1776.
- Santner A. and M. Estelle (2009): Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature Reviews*, Vol 459: 1071-1078.
- Santner A., L.I.A. Calderon-Villalobos and M. Estelle (2009): Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Reviews* 5(5): 301-307.
- Schön, C., M. Sanchez, T. Blake and P.M. Hayes (1990): The effect of selection for protein and isozyme loci on quantitative traits in doubled haploid and F2 progeny of a barley cross. *Hereditas* 13: 69–72.
- Shariatpanahi M.E., Bal U., E. Heberle-Bors and A. Touraev (2006): Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiologia Plantarum* 127, 519–534.
- Shen X., F.G.Jr Gmitter and J.W. Grosser (2011): Immature embryo rescue and culture. *Methods Mol Biol.* 710: 75-92.
- Shim, Y.S. and K.J. Kasha (2003): The influence of pretreatment on cell stage progression and the timing of DNA synthesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) uninucleate microspores. *Plant Cell Rep.* 21: 1065-1071.

- Sihdu P.K. and P.A. Davies (2009): Regeneration of fertile green plants from oat isolated microspore culture. *Plant Cell Rep* 28: 571–577.
- Silva T.D. (2010): Indica rice anther culture: can the impasse be surpassed? *Plant Cell Tiss Organ Cult* 100: 1–11.
- Skoog, F., and C.O. Miller (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118–131.
- Snape J.W., E. Simpson, B.B. Parker, W. Friedt and B. Foroughi-Wehr (1986): Criteria for the selection and used doubled haploid systems in cereal breeding programmes. In: Horn W, Jensen C J, Odenbach W, Shieder O (eds) *Genetic manipulation in plant breeding*. Walter de Gruyter, Berlin, pp 217-229.
- Soriano, M., Li H. and K. Boutilier (2013): Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Reproduction* 26: 181–196.
- Szarejko, I. (2003): Anther culture for doubled haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). In: Maluszynski M., K.J. Kasha, B.P. Forster & I. Szarejko (Eds.), *Doubled Haploid Production in Crop Plants - A Manual*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht/ Boston/ London, pp. 35-42.
- Szarejko, I. and K. J. Kasha, (1991): Induction of anther culture derived doubled haploids in barley. *Cereal Res. Commun.* 19 (1–2): 219–237
- Thorpe T., C. Stasolla, E.C. Yeung, G-J. de Klerk, A. Roberts and E.F. George: The Components of Plant Tissue Culture Media II : Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. In: Edwin F. George Merriott, Michael A. Hall and Geert-Jan De Klerk (Eds.): *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3rd Edition; Volume 1. The Background. Springer, Dodrecht, The Netherlands, 2008.
- Torp A.M. and S.B. Andersen: Albinism in Microspore Culture. Chapter 12, in Touraev, Alisher; Forster, Brian P.; Jain, Shri Mohan (eds.) *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 348 pp, Springer Science + Business Media B.V. 2009
- Touraev A., O. Vicente and E. Heberle-Bors (1997): Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Sci. (Reviews)*, August, Vol 2, No. 8: 297-302
- Touraev, A., M. Pfosser and Erwin Heberle-Bors (2001): The Microspore: A Haploid Multipurpose Cell. *Adv Bot Res* 35: 53–109
- Wędzony, M., B.P. Forster, I. Zur, E. Golemiec, M. Szechyńska-Hebda, E. Dubas, and G. Gotębiowska (2009): Progress in doubled haploid technology in higher plants. In: *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. A. Touraev, B.P. Forster, S. Mohan Jain Eds., pp. 1–33, 2009. Springer.
- Wenzel, G., F. Hoffmann, I. Potrykus, and E. Thomas (1975): The Separation of Viable Rye Microspores from Mixed Populations and Their Development in Culture. *Molec. gen. Genet.* 138, 293-297
- Weyen J.: Barley and wheat doubled haploids in breeding. Ch. 15, in: A. Touraev *et al.* (eds.) *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 179. Springer Science + Business Media B.V. 2009.

- Wheatley, W.G., A.A. Marsolais, and K.J. Kasha (1986): Microspore growth and anther staging in barley anther culture. *Plant Cell Reports* 5:47-49
- 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
- Wojnarowicz, G., S. Caredda, P. Devaux, R. Sangwan and C. Clément (2004): Barley anther culture: assessment of carbohydrate effects on embryo yield, green plant production and differential plastid development in relation with albinism. *J. Plant Physiol.* 161: 747–755.
- Yang X. and X. Zhang (2010): Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 29:36–57.
- Zheng M.Y., W. Liu, Y. Weng, E. Polle and C.F. Konzak (2001): Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores treated with inducer chemicals. *Plant Cell Rep.* 20: 685–690
- Ziauddin, A., A. Marsolais, E. Simion and K. J. Kasha (1992): Improved plant regeneration from wheat anther and barley microspore culture using phenylacetic acid (PAA). *Plant Cell Reports* 11: 489-498
- Ziauddin, A., E. Simion, and K.J. Kasha (1990): Improved plant regeneration from shed microspore culture in barley (*Hordeum vulgave* L.) cv. Igri. *Plant Cell Reports* 9: 69-72.

## 6. Annexe

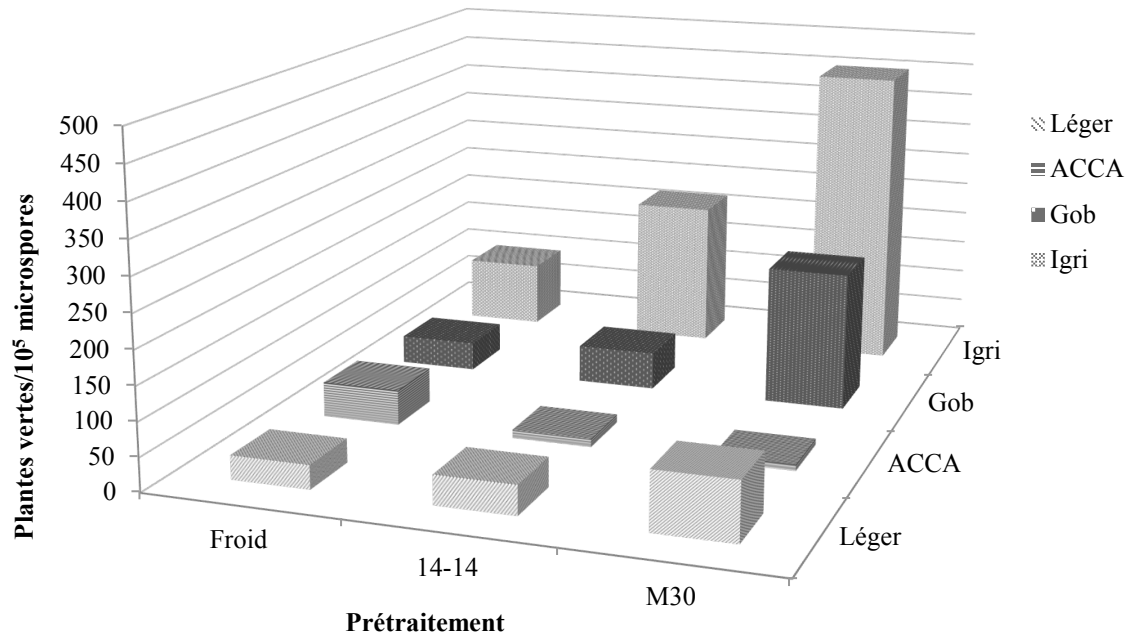
En réponse à la demande des jurés lors de la soutenance, on ajoute dans cette Annexe des analyses statistiques concernant la réponse des génotypes aux différents prétraitements, et à la composition hormonale du milieu d'induction.

### 5.1 Comparaison de trois prétraitements sur quatre cultivars. Variables : Plantes vertes et Plantes albinos obtenues par $10^5$ microspores

**Tableau 5.1** : Décomposition factorielle des Sommes de Carrés (Type III).

Source	DL	Carrés Moyens PV/ $10^5$ microspores	Carrés Moyens PA/ $10^5$ microspores
Prétraitement	2	58 039,8*	12 653,1
Génotype	3	94 654,6***	122 529,6***
Bloc	2	21 404,2	20 759,1
Prétraitement*génotype	6	22 345,7	8 883,4
Prétraitement*bloc	4	13 280,0	6 377,1
Génotype*bloc	6	10 815,3	20 050,0
Erreur	12	11 717,9	10 473,5

\*Significatif à un niveau de probabilité de 0,05; \*\*\* Significatif à un niveau de probabilité de 0,001.



**Figure A.1** : Nombre de Plantes vertes régénérées par  $10^5$  microspores pour les quatre cultivars utilisés lors de l'expérience exploratoire du facteur Prétraitement.

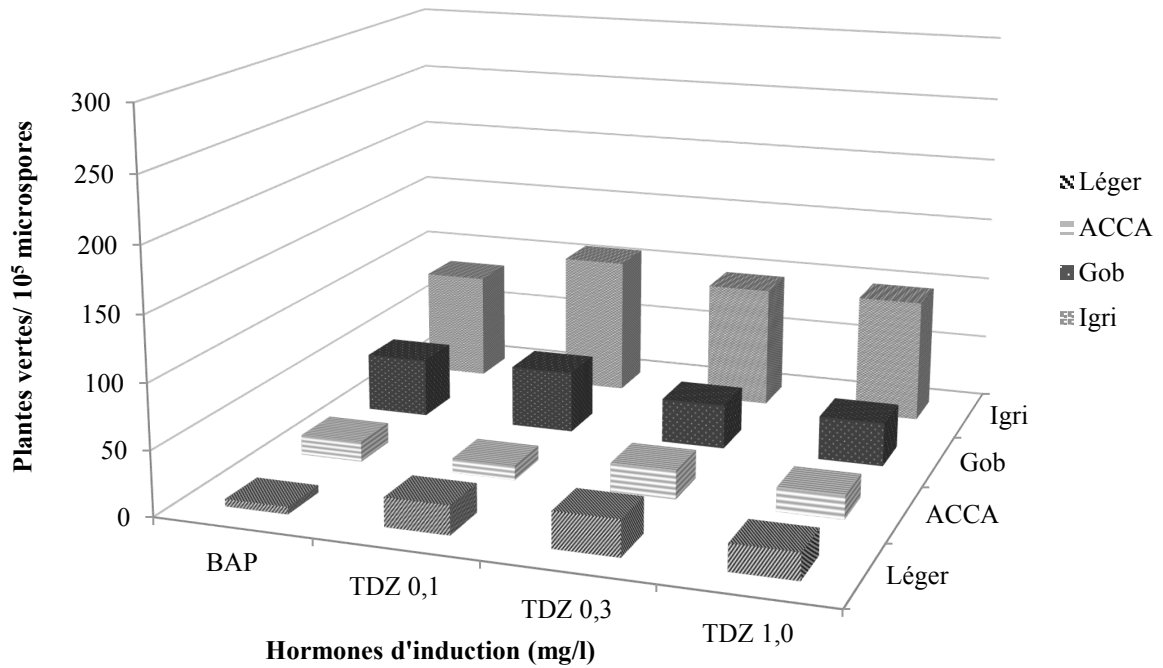
**5.2 Impact des hormones d'induction sur quatre cultivars.**  
**Variable : Plantes vertes/ 10<sup>5</sup> microspores**

**Tableau 5.2 :** Décomposition factorielle des Sommes de Carrés (Type III):

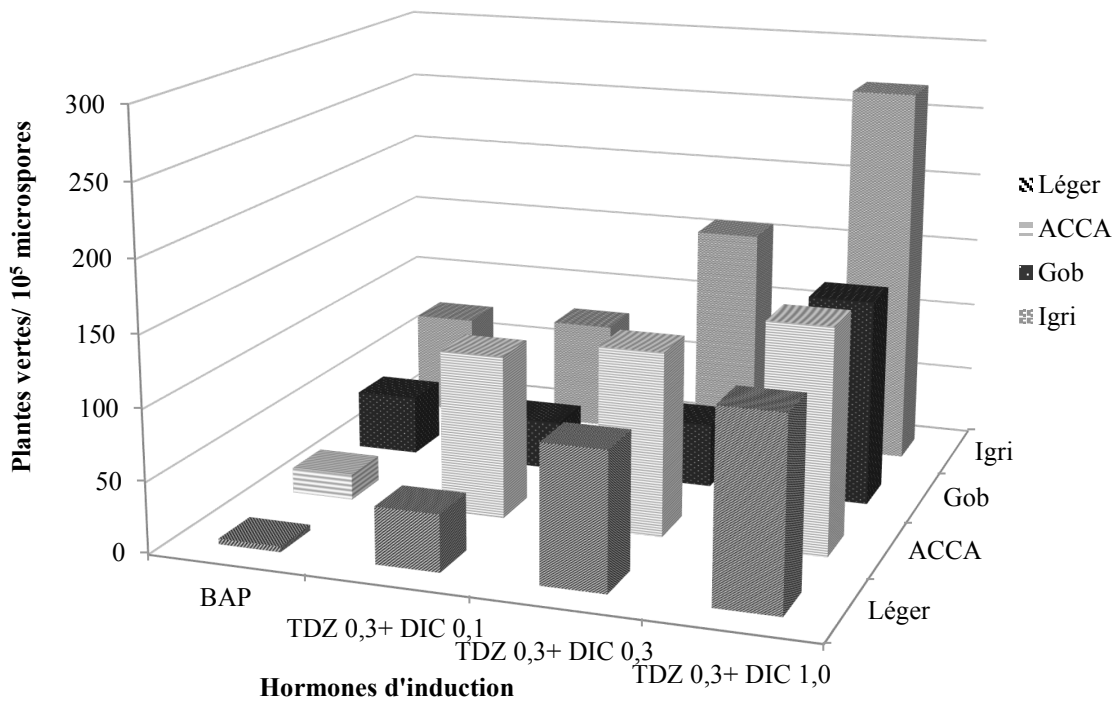
Source	DL	Carrés Moyens BAP vs. TDZ	Carrés Moyens BAP vs. TDZ+DIC
Milieu	3	216,4	44 772,9***
Génotype	3	15 370,1***	16 347,1***
Bloc	2	461,4	31 670,1***
Milieu*génotype	9	189,2	3 227,6***
Milieu*bloc	6	509,9	2 508,4*
Génotype*bloc	6	1 374,4***	7 239,0***
Erreur	18	318,7	882,8

\*Significatif à un niveau de probabilité de 0,05; \*\*\* Significatif à un niveau de probabilité de 0,001.





**Figure A.2** : Plantes vertes régénérées par chaque cultivar au cours de la Phase I de l'expérience exploratoire d'hormones d'induction : comparaison de un niveau de BAP avec trois niveaux de TDZ.



**Figure A.3** : Plantes vertes régénérées par chaque cultivar au cours de la Phase II de l'expérience exploratoire d'hormones d'induction : comparaison de un niveau de BAP avec un niveau de TDZ plus trois niveaux de DIC.

