

# Influence des facteurs environnementaux sur la technique d'hybridation interspécifique chez le blé dur

S. AYED<sup>1\*</sup>, Z. CHAMEKH<sup>2</sup>, O. AYED-SLAMA<sup>2</sup>, H. AMARA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Université de Carthage, Pôle Régional de Recherche Développement Agricoles du Nord Ouest Semi Aride-Kef, Tunisie

<sup>2</sup>Laboratoire de Génétique et d'Amélioration des Céréales de l'Institut National Agronomique de la Tunisie

\*Corresponding author: ayedsourour@yahoo.fr

**Abstract** - In this study, durum wheat x maize cross is used as an alternative for haploid plants production. This method is based on embryos *rescue*. The objective of this study was to analyze the influence of environmental factors in durum wheat crossed with maize on the basis of three parameters: percentage of developed ovaries, of embryos and of regenerated haploid plants. Four Tunisian durum wheat genotypes namely Jenah khotifa, Biskri, Karim and Razzek used as female parent were crossed with a maize genotype (Pioneer 37Y15) used as male parent. Results showed a significative difference between the two cropping season 2007-2008 and 2008-2009 for all parameters studied. Percentage of developed ovaries and embryos formed recorded about 45.33 % and 7.35% for the cropping season 2007-2008 and 29.15% and 6.35% for 2008-2009 cropping season 2007-2008. Genotypes Jeneh khotifa (47.5% and 9.7%) followed by Biskri (42.1% and 4.7%) showed the best percentage of developed ovaries, of embryos. A positive correlation were noted between percentage of developed ovaries and embryos developed (0.67\*\*) and between percentage of developed ovaries and haploid plants regenerated (0.69\*\*).

**Keywords:** durum wheat, *in vitro*, maïs, regeneration

**Résumé** - Dans cette étude, la technique d'hybridation interspécifique blé dur x maïs a été adoptée comme une alternative pour la production de lignées haploïdes. Cette méthode repose sur le sauvetage *in vitro* d'embryons immatures. A cet effet, quatre génotypes de blé dur Jenah Khotifa et Biskri, Karim et Razzek, utilisés comme parent femelle, sont croisés avec un génotype de maïs (Pioneer 37Y15) utilisé comme parent mâle. Les croisements interspécifiques ont été effectués durant les deux années successives (2007-2008 et 2008-2009) pour déterminer l'effet des facteurs environnementaux tels que la température et/ou l'humidité pendant la phase de nouaison et de la formation des embryons. Trois paramètres ont été mesurés à savoir le taux de nouaison, d'embryogenèse et de régénération des plantules haploïdes. Les résultats obtenus ont montré une différence significative entre les deux années d'expérimentation pour tous les paramètres mesurés. Les taux de nouaison et d'embryogenèse des 4 génotypes passent de 45,33 %, 7,35% pour la première année à 29,15%, 6,35% pour la deuxième année. Les génotypes Jeneh khotifa (47,5%, 9,7%) suivi de Biskri (42,1%, 4,7%) ont montré les taux de nouaison et d'embryogenèse les plus élevés. Une corrélation positive a été notée entre le taux de nouaison et le taux d'embryogenèse (0,67\*\*) ainsi que entre le taux d'embryogenèse et le taux de régénération de plantes haploïdes (0,69\*\*).

**Mots clés:** blé dur, *in vitro*, maïs, régénération

## 1. Introduction

Le blé dur occupe une place importante dans le système alimentaire Tunisien. Toutefois, cette culture se heurte encore à un certain nombre de contraintes notamment l'instabilité de la production liée aux fluctuations climatiques engendrées par deux stress majeurs: la sécheresse et la salinité. La sélection variétale par les méthodes conventionnelles reste un processus relativement lent compte tenu du fait que la création variétale chez une espèce autogame, nécessite plusieurs années d'autofécondation pour l'obtention d'un taux d'homozygotie acceptable. L'utilisation de nouveaux outils biotechnologiques basées en l'occurrence sur l'utilisation de la culture *in vitro* des tissus qui vise la création d'un nouveau matériel génétique à savoir les lignées haploïdes doublées (HDs) obtenues soit par culture *in*



*in vitro* de cellules gamétophytiques mâles (Androgenèse) et femelles (Gynogenèse) soit par hybridations interspécifiques et/ou intergénériques (Slama-Ayed et al. 2010 ; Ayed et al. 2012). Malgré la diversité de méthodologies d'haplodiploïdisation, l'hybridation interspécifique blé dur x maïs reste une méthode efficace offrant l'avantage de contourner le problème d'albinisme particulièrement rencontré suite à la culture *in vitro* d'anthers ou de microspores isolées (Slama-Ayed et Amara 2007; Slama-Ayed et al. 2015). Cette technique se base sur le phénomène de sauvetage d'embryons immatures par culture *in vitro* afin d'éviter leur dégénérescence rapide par manque de réserves dû à l'absence d'endosperme (Inagaki et al. 1997; Ushiyama et al. 2006, Ayed et al. 2011a). Le croisement blé dur x maïs repose également sur le phénomène d'élimination sélective du stock chromosomique du parent mâle qui se déroule pendant les premiers stades de développement de l'embryon dû, soit à la désynchronisation des cycles mitotiques des deux espèces soit à l'inactivation du génome étranger par celui de l'hôte (Picard et al. 1994; Genaud et al. 2006). Les plantes produites par cette technique sont normalement haploïdes (n), généralement identiques aux plantes mères mais stériles. Il est possible de rétablir la fertilité par un doublement, spontané ou artificiel, du stock chromosomique pour passer à l'état diploïde (2n). Cependant, la technique d'hybridation interspécifique blé dur x maïs reste peu maîtrisée chez le blé dur essentiellement au niveau de la régénération des plantes haploïdes et dépendante de plusieurs facteurs notamment les environnementaux liés au développement de la plante mère (Sharmeen et al. 2005; Ushiyama et Yoshida 2008). Dans ce cadre s'insère ce travail de recherche qui vise l'étude de l'effet des facteurs environnementaux liés à la plante mère sur le taux de régénération des plantes haploïdes issues de la technique d'hybridation interspécifique blé dur x maïs.

## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1. Matériel végétal

Quatre génotypes de blé dur (*Triticum durum*,  $2n=4x=28$ ) à savoir Jeneh khotifa et Biskri, Karim et Rezzak (parent femelle) ainsi qu'un génotype de maïs (*Zea mays*,  $2n=2x=20$ ) (parent mâle) ont été utilisés dans ce travail de recherche.

### 2.2. Description du site d'expérimentation

Durant les deux années d'expérimentation, les génotypes de blé dur ont été semés, dans une serre grillagée, en ligne dans des parcelles élémentaires, en plein champ à l'Institut National Agronomique de Tunisie (INAT), constituées de 5 lignes de deux mètres chacune espacée de 20 cm. Une distance de 30 cm sépare chaque parcelle. Deux dates de semis échelonnées d'un mois ont été effectuées. Un désherbage chimique par un herbicide anti-dicotylédone des céréales ainsi qu'un apport en azote à raison de 150 Kg/ha appliqué au stade 3 feuilles, 5 à 6 feuilles et au stade 2 nœuds (Ayed et al. 2011b). Les génotypes de maïs sont cultivés en contre saison dans une serre vitrée à INAT dans des pots remplis de terre mélangée de terreau (1/3, 2/3). Afin d'assurer la synchronisation entre la date de floraison du blé dur avec celle du maïs, nous avons réalisé 5 dates de semis échelonnées avec un décalage d'une semaine entre les différentes dates (Tableau 1).

**Tableau 1:** Dates de semis des génotypes de blé dur et de maïs testés pour les 2 campagnes agricoles 2007/2008 et 2008/2009

Campagne	Date de semis (Maïs)	Date de semis
2007- 2008	Date 1: 6 Novembre	Date 1: 20 Novembre
	Date 2: 21 Novembre	Date 2: 20 Décembre
	Date 3: 08 Décembre	
	Date 4: 24 Décembre	
	Date 5: 10 Janvier	
2008-2009	Date 1: 18 Novembre	Date 1: 2 Décembre
	Date 2: 03 Novembre	Date 2: 04 Janvier
	Date 3: 18 Décembre	
	Date 4: 04 Janvier	
	Date 5: 18 Février	

Le croisement interspécifique réalisé entre le blé dur et le maïs a pour principal objectif la production des haploïdes de blé dur. Pour réussir un tel croisement entre ces deux espèces relativement éloignées, nous avons effectué des semis échelonnés dans le temps afin de pouvoir assurer une parfaite coïncidence de floraison des deux espèces.

Les cumuls de pluviométrie enregistrés durant les deux années d'expérimentation étaient respectivement de 587,7 mm et 567 mm. Les températures maximales, minimales et moyennes à la surface du sol ainsi que l'humidité relative mesurées depuis le semis jusqu'aux périodes de récolte des caryopses sont résumées dans le tableau 2.

**Tableau 2:** Données climatiques de la station de l'INAT durant les deux années d'expérimentation (2007-2008 et 2008-2009)

Mois	Année	Novembre	Décembre	Janvier	Février	Mars	Avril	Mai	Juin
<b>Pluviométrie (mm)</b>	2007-2008	65,9	122,7	11,9	17,5	84	2,9	32,8	0,0
	2008-2009	24,5	19,2	161,9	67,6	36,9	164,2	13,5	0,0
<b>Température maximale</b>	2007-2008	19,3	16,3	16,9	16,6	18,8	23,3	25,7	29,8
	2008-2009	21,4	15,1	13,8	13,1	15,2	17,4	23,8	26,6
<b>Température minimale</b>	2007-2008	11,8	10,7	8,9	7,8	9,7	13,4	15,8	18,1
	2008-2009	13,6	7,8	6,9	6,9	7,2	9,8	14,2	15,2
<b>Température moyenne</b>	2007-2008	14,7	12,6	12,9	7,8	13,3	18,1	20,7	23,9
	2008-2009	17,5	10,7	10,4	3,9	11,2	13,6	19	20,9
<b>Humidité relative</b>	2007-2008	67,2	74,1	73,3	69,3	64,9	59,6	64,3	58,0
	2008-2009	61,8	70,1	72,1	63,2	61,5	69,7	59,1	53,2

(Source : Centre de Gestion des Ressources en eau de l'INAT)

### 2.3. Méthodologie

La castration des fleurs de blé est faite lorsque les épis sont encore enveloppés dans la gaine et les barbes dépassaient la gaine d'environ 5 à 6 cm en moyenne. Ce stade morphologique de l'épi correspondant au stade cytologique binucléé pour la majorité des microspores (Ayed et al. 2012). Après castration, l'épi est protégé par un sachet conçu à cet effet pour maintenir le maximum d'humidité et pour éviter la pollinisation accidentelle.

Lorsque les stigmates du blé sont réceptifs, le pollen de maïs récolté est déposé à l'aide d'un pinceau sur les stigmates des fleurs de blé préalablement castrées. La viabilité du pollen a été déterminée avant la pollinisation par une observation microscopique des grains de pollen de maïs en présence du carmin acétique de Belling à 1% (Ayed et al. 2012). Par la suite, l'épi est protégé par le même type de sachet utilisé après castration. Après la pollinisation, une injection de Dichlorophenoxyacétique (2,4-D) a été faite au niveau de la cavité de la tige située au dessus du dernier entre nœuds. Cette injection est effectuée, à l'aide d'une seringue stérile de 20 ml, à partir d'une solution à 100 mg/l de 2,4-D, à raison de 0,5 ml. Après l'injection, les épis de blé dur pollinisés sont pulvérisés avec une solution d'acide gibbérellique ( $GA_3$ ) à 75 mg/l (Ayed et al. 2011). Les épis de blé dur préalablement castrés puis pollinisés avec le pollen de maïs sont maintenus sur la plante mère dans les conditions de culture en plein champ jusqu'à la formation des embryons.

Après 18 jours, les embryons immatures sont prélevés par dissection du caryopse sous conditions stériles et mis en culture dans des boîtes de Pétri à raison de 10 embryons/boîte sur le milieu Gamborg B5, modifié par l'addition d'Agar à raison de 7 g/l et sans l'auxine synthétique 2,4-D (Gamborg et al. 1968). Les plantules régénérées, au stade 3 à 4 feuilles, sont transplantées après habillage sur un substrat stérilisé formé d'un mélange de 2/3 sable et 1/3 de tourbe.

### 2.4. Les paramètres mesurés

Pour toute l'étude effectuée trois paramètres ont été mesurés:

- **Taux de nouaison (%)** correspondant au rapport entre le nombre de fleurs nouées et le nombre de fleurs initialement pollinisées;
- **Taux d'embryogenèse (%)** correspondant au rapport entre le nombre d'embryons formés et le nombre de fleurs nouées;
- **Taux de régénération de plantes haploïdes (%)** correspondant au rapport entre le nombre de plantes haploïdes régénérées et le nombre de fleurs nouées. \*

### 2.5. Analyses statistiques

L'analyse de la variance de chaque paramètre est assurée par la procédure (ANOVA) calculée par le logiciel SPSS 16.0. La comparaison des moyennes a été établie par le test Duncan à 5%.

### 3. Résultats et discussion

La réponse des 4 génotypes testés au croisement intergénérique blé dur x maïs a été évaluée en fonction du taux de nouaison, d'embryogenèse et de régénération des plantes haploïdes pour les deux années d'expérimentation 2007-2008 et 2008-2009. L'analyse de la variance montre une différence hautement significative pour tous les paramètres mesurés au cours des deux années d'essai et pour ces quatre génotypes de blé dur testés (Tableau 3).

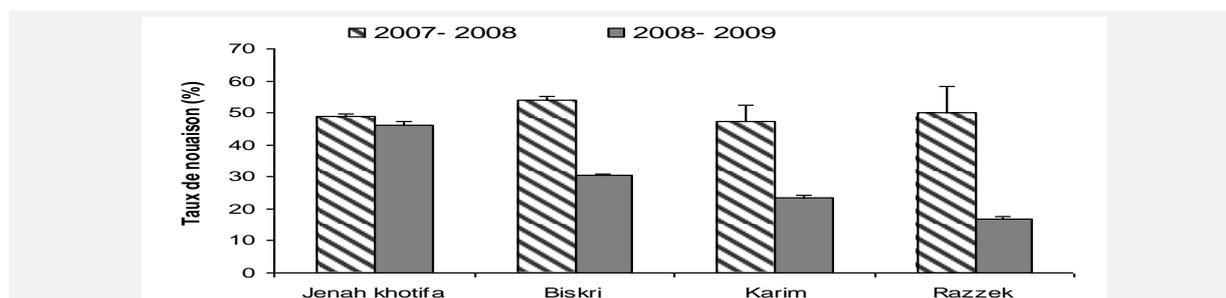
**Tableau 3:** analyse de la variance (carrés moyens et test f) relative aux trois paramètres testés

Sources de variation	ddl	Taux de nouaison	Taux d'embryogenèse	Taux de régénération
Année	1	1570,9**	5,9**	45,7**
Génotype	3	625**	34,8**	46,25**
Année x génotype	3	148,9**	8,3**	16,9**

\*\* Significatif au seuil 1%

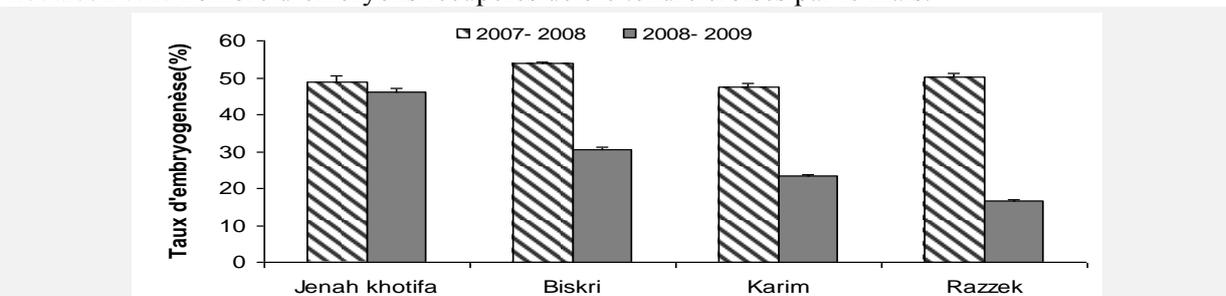
La Figure 1 montre que le taux de nouaison des 4 génotypes passe de 45,33 % pour la première année à 29,15% au cours de la seconde année d'expérimentation. Quant au comportement des génotypes au cours des deux années d'essai nous avons noté une classification mettant en tête le génotype Jeneh khotifa (47,5%) suivi de Biskri (42,1%). Les génotypes Karim et Rezzak ont présenté les taux de nouaison les plus faibles avec des taux respectifs de 23,9% et 35,2%.

Il ressort également que ce même paramètre varie pour un génotype d'une année à l'autre. Toutefois, une stabilité de réponse au croisement avec le maïs pour le génotype Jeneh khotifa a été notée.



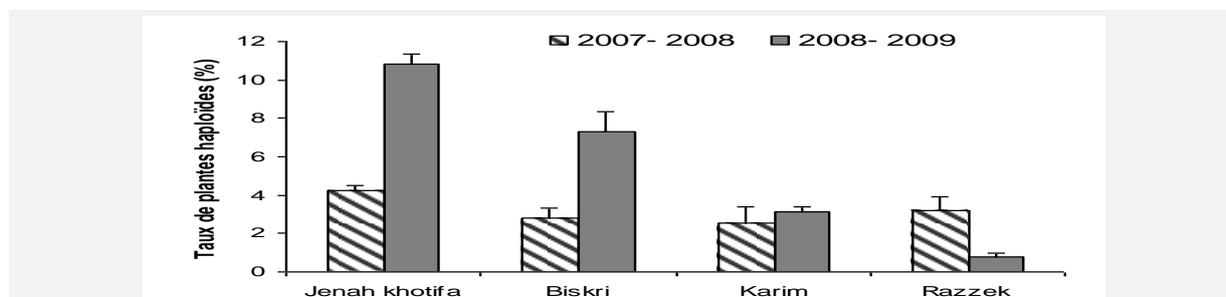
**Figure 1:** Taux de nouaison des 4 génotypes de blé dur testés (Jeneh khotifa, Biski, Karim et Rezzak) durant les 2 années d'expérimentation 2007/2008 et 2008/2009

L'analyse statistique réalisée sur le taux d'embryogenèse a montré des différences significatives entre les 4 génotypes testés. Le taux moyen d'embryogenèse passe de 9,7% pour Jeneh khotifa, suivi de 7,9% pour le génotype Biskri à 4,7% pour le génotype Karim. Le taux d'embryons formés, pour tous génotypes confondus, est de 7,35 % pour la première année et 6,35 % pour la deuxième année (Figure 2). Le génotype Jeneh khotifa a pu donner les meilleurs taux de nouaison et d'embryogenèse. Toutefois, Oury et al. (1993) ont signalé qu'il n'y a pas toujours une bonne adéquation entre le taux de nouaison et le nombre d'embryons récupérés de blé tendre croisés par le maïs.



**Figure 2:** Taux d'embryogenèse des 4 génotypes de blé dur testés (Jeneh khotifa, Biski, Karim et Rezzak) durant les 2 années d'expérimentation (2007/2008 et 2008/2009)

Une grande variabilité génétique a été observée au niveau de la régénération des plantes haploïdes durant les années d'expérimentation. Les taux de plantes haploïdes pour la première et la deuxième année d'essai sont respectivement de l'ordre de 2,75% et 5,51%. Les génotypes Jeneh khotifa, Biski et Karim ont montré les taux de plantes vertes les plus élevés aussi bien pour la année deuxième (10,8%, 7,33% et 3,1% respectivement) que pour la première année (4,21%, 2,82% et 2,53% respectivement). Toutefois, le génotype Rezzak a montré un taux significativement plus faible durant la deuxième année d'essai soit 0,8% (figure 3).



**Figure 3:** Taux de plantes haploïdes chez les 4 génotypes de blé dur testés (Jeneh khotifa, Biski, Karim et Rezzak) durant les 2 années d'expérimentation (2007/2008 et 2008/2009)

La production de plantes haploïdes de blé dur étant sous l'influence de 3 processus, la nouaison, la formation d'embryons et la régénération de plantes haploïdes. L'analyse de la corrélation entre les trois paramètres mesurés a mis en évidence que pour l'ensemble des génotypes et durant les 2 années d'expérimentation, ces 3 paramètres sont positivement corrélés (Tableau 4). L'amélioration du taux d'embryogenèse entraînerait l'augmentation de la production de plantes haploïdes (0,69\*\*). Il est important également de signaler que le taux d'embryogenèse est corrélé positivement avec le taux de nouaison (0,67\*\*).

**Tableau 4:** Matrice de corrélation entre les paramètres mesurés

	Taux de nouaison (%)	Taux d'embryogenèse (%)	Taux de régénération (%)
Taux de nouaison (%)	1	0,67**	0,28
Taux d'embryogenèse (%)		1	0,69**
Taux de régénération (%)			1

Les croisements interspécifiques entre le blé dur et le maïs sont effectués dans cet essai durant deux années successives pendant lesquelles les résultats obtenus ont montré un effet hautement significatif des paramètres liés à la nouaison, à l'embryogenèse et à la régénération des plantules haploïdes. La variation observée pourrait être due aux facteurs environnementaux tels que la température et/ou l'humidité pendant la phase de nouaison et de la formation des embryons. D'après les relevés climatiques mensuels, comparativement à la deuxième année d'essai 2008-2009, la première année d'expérimentation 2007-2008 s'est distinguée par un hiver et un printemps plus chauds. En effet, l'année 2007-2008 favorise une nouaison nettement supérieure à celle obtenue après les croisements de l'année 2008-2009. De plus, la période coïncidant avec la nouaison (mois d'Avril) était nettement moins pluvieuse (2,9 mm) et plus chaude (18,1°C) que la deuxième année (164,2 mm et 13,6°C). Toutefois, la période coïncidant avec la formation des embryons (mois de Mai) est caractérisée par une pluviométrie plus importante durant la première année (32,3 mm) que la deuxième année (13,5 mm) ce qui aurait stimulé la formation des embryons.

Des résultats similaires ont été obtenus par Tebini (2000) dans le cas du croisement blé dur x maïs en testant deux saisons de culture différentes (Mars et Mai). Cet auteur a montré que les meilleurs taux de nouaison et d'embryogenèse correspondent aux périodes les plus chaudes. Ce même auteur justifie cet effet par une augmentation mutuelle de la température et de la photopériode. Plusieurs chercheurs ont adopté des conditions contrôlées pour le développement de la plante mère afin d'augmenter le taux de nouaison et de régénération des plantes haploïdes. La croissance s'est effectuée principalement soit dans une serre contrôlée (Brazauskas et Pašakinskienė 2001; Ushiyama et Yoshida 2008) soit dans une

chambre de culture (Ballesteros et al. 2003; Garcia-Liomas et al. 2004). La vigueur des plantes mâles et femelles est influencée par plusieurs facteurs environnementaux, notamment, la photopériode et la température. Ces deux facteurs varient selon les auteurs. Plusieurs températures ont été utilisées chez le blé tendre: 25/15°C et 25/18°C (Inagaki et Mujeeb-Kazi 1995; Sharmeen et al. 2005) avec une photopériode de 16 h. D'autres températures ont été adoptées pour le blé dur et le maïs à savoir 25/15°C, 24/20°C et 20/15°C avec une photopériode de 16 h (Sarraf et al. 1994; Brazauskas et Pašakinskienė 2001; Ushiyama et Yoshida 2008). L'humidité relative joue également un rôle important sur la production des plantes haploïdes par les hybridations interspécifiques. Des travaux réalisés par Ballesteros et al. (2003) ont montré que la substitution de l'humidité relative de 65-85% (jour/ nuit) par 55-65%, a fait augmenter significativement le nombre d'embryons haploïdes (de 2,8 à 5) et de plantes haploïdes par épi (de 0,6 à 3,1) de blé dur issus d'un croisement blé dur x maïs. Cette différence nette entre les deux régimes d'humidité relative utilisés a été expliquée par le fait que l'humidité élevée (65-85%) a provoqué une infection importante par les bactéries au niveau des embryons de l'ordre de 50% alors que ce taux n'est que de 5% à une humidité plus faible (55-65%). D'autres humidités relatives de l'ordre de 60-70% (Inagaki et al. 1997) et 80% (Saïdi et al. 1998; Cherkaoui et al. 2000) ont été utilisées respectivement pour le blé tendre et le blé dur. Inagaki et al. (1997) ont signalé que la formation d'embryons haploïdes à des taux élevés est liée à des conditions environnementales sèches et que la production faible d'embryons coïncide à des périodes pluviales. Ces mêmes auteurs ont constaté que la variation brusque de l'humidité pendant une période courte affecte énormément la formation d'embryons en le diminuant.

#### 4. Conclusion

Les résultats présentés dans ce travail, rapportant sur l'évaluation de l'aptitude au croisement de 4 géotypes parentaux de blé dur, ont montré que les principaux variables du processus de l'haplodiploïdisation dont essentiellement la nouaison, l'embryogenèse et la capacité de régénération des plantes vertes dépendent des facteurs environnementaux qui constituent un facteur déterminant. L'optimisation de ces facteurs pourrait augmenter l'efficacité de la technique d'hybridation interspécifique blé dur x maïs et améliorer notamment le nombre des embryons obtenus.

#### 5. Références

- Ayed S, Slama-Ayed O et Slim-Amara H (2011 a)** Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Nitrate Silver on the Efficiency of Haploid Production in Durum Wheat × Maize Crosses. *International Journal of Plant Breeding* Vol. 5 (2), 101-105.
- Ayed S, Slama-Ayed O, Jaime A Teixeira da Silva and Slim-Amara H (2011 b)** Effect of Different Factors on Haploid Production through Embryo Rescue in Durum Wheat × Maize Crosses. *International Journal of Plant Breeding*, Vol. 5 (2), 118-121.
- Ayed S, Chamekh Z, Tayachi O, Trifa Y and Slim-Amara H (2012)** Performance of durum wheat (*Triticum durum* L.) doubled haploids derived from durum wheat x maize crosses. *Journal of Plant Breeding and Crop Science* Vol. 4(3), 32-38.
- Ballesteros J, Garcia-Liomas C, Ramirez MC et Martin A (2003)** Low relative humidity increases haploid production in durum wheat x maize crosses. *Plant breeding* 122: 276-278.
- Brazauskas G et Pašakinskienė I (2001)** Genotype effect on wheat haploid production in wheat x maize crosses. *Biologija* 1: 50-52
- Cherkaoui S, Chlyah A et Chlyah H (2000)** Durum wheat x maize crosses for haploid wheat production: Influence parental genotypes and various experimental factors. *Plant Breeding* 119: 31-36
- Gamborg OL, Miner R A et Ojima K (1968)** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- Garcia-Liomas C, Ramirez MC et Ballesteros J (2004)** Effect of pollinator on haploid production in durum wheat crossed with maize and pearl millet. *Plant Breeding* 123: 201- 203.
- Gernand D, Rutten T, Pickering R et Houben A (2006)** Elimination of chromosomes in *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum* crosses at mitosis and interphase involves micronucleus formation and progressive heterochromatinization. *Cytogenetic and Genome Research* 114 (2): 169-174
- Inagaki MN et Mujeeb-Kazi A (1995)** Comparison of polyhaploid frequencies in crosses of hexaploid wheat with maize, pearl millet and sorghum. *Breeding Science* 45: 157-161
- Inagaki MN, Nagamine T, Mujeeb-Kazi A (1997)** Use of pollen storage and detached tiller culture in wheat polyhaploid production through wide crosses. *Cereal Research Communications* 25: 7-13

- Oury FX, Pichon M, Rousset M, Gourdon J et Lagoutte F (1993)** A comparison of 2 haplodiploidization methods in bread wheat: anther culture and interspecific hybridization in maize. *Agronomie* 13 (2): 95-103.
- Picard E, Crambs E et Mihamou-Ziyyat A (1994)** L'haplodiploidisation un outil multiusage pour la génétique et l'amélioration des céréales. Quel avenir pour l'amélioration des plantes. Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris: pp 355-369.
- Sarrafi A, Amrani N et Alibert G (1994)** Haploid regeneration from tetraploid wheat using maize pollen. *Genome* 37: 176-178
- Slama-Ayed O et Slim-Amara H (2007)** Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) through culture of unpollinated ovaries. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 91: 125-133
- Saidi N, Chlyah O, Chlyah H (1998)** Production of green haploid durum wheat plants by pollination of wheat with maize. *Canadian Journal of Botany* 76: 652-656
- Slama- Ayed O, Trifa Y, Ayed S, Slim Amara H, De Buyser J and Picard E (2010)** Production of doubled haploids in Tunisian durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars through unpollinated ovary culture. *Plant Mutation Reports*, Vol. 2 (2), 33-39.
- Slama- Ayed O, Ayed S, Slim-Amara H (2015)** Selection of Tolerant Lines to Salinity Derived from Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) *in Vitro* Culture. *Agricultural Sciences*, Vol. 6, 699-706.
- Sharmeen F, Rahman L, Alam MS, Shamsuddin AKM (2005)** Variation in the induction of haploidy and polyembryony in Spring wheat through wheat x maize system. *Plant tissue culture* 15: 7-14
- Tebini K (2000)** Utilisation de l'hybridation interspécifique par le maïs (*Zea mays* L.) pour la production d'haploïdes doublés de blé dur (*Triticum durum* Desf.). Mémoire de Fin d'Etudes du cycle de spécialisation à l'Institut National d'Agronomie de Tunisie 106 p.
- Ushiyama T, Kuwabara T et Yoshida T (2006)** Effet of Dichlorophenoxyacétic on a efficiency of wheat haploid production by the *Hordeum bulbosum* method. *Plant Prod. Sci.* 9 (3): 206-211.
- Ushiyama T et Yoshida T (2008)** Response to GA and variation of the culm length in doubled haploid lines of wheat. *Plant Prod. Sci.* 11: 217-222.