

Embryogenèse somatique et régénération des plantules à partir des embryons immatures chez trois cytotypes de *B.distachyon* : Effet du génotype et du milieu de culture

R. HAMMAMI^{1*}, E. FRIERO², N. JOUVE², J.M. GONZALEZ²

¹Institut National de la Recherche Agronomique de Tunis (INRAT), Rue HédiKarray, 2049 Ariana Tunis-Tunisie

²Département de Biomédecine et Biotechnologie Campus Universitaire- Ctra Madrid-Barcelone km33.600 Université Alcalá de Henares 28871 Alcalá de Henares Madrid Espagne.

*Corresponding author: rifkahammami82@gmail.com

Abstract - In this work the *in vitro* culture response of six population samples of *Brachypodium distachyon* (two by each one of the cytotypes of $2n = 10$, $2n = 20$; $2n = 30$) has been analyzed. Immature zygotic embryos were seeded for callus induction in nine culture media (BR1 to BR9), that were different to each other in the growth regulator 2,4- dichlorophenoxyacetic(2.4-D), Dicamba or Picloran and their concentration (1, 2 ou 4 mg/l), with four repetitions with 20 embryos per treatment. Results were subsequently analyzed using an ANOVA test for the following variables: TC= total calluses number/total embryos number; CC= compact calluses number/total calluses number; SC= soft calluses number/total calluses number. A very different response among them; as much for the number as for the type of callus developed, has been observed, based on the genotype and culture medium used. Thus, the samples with $2n=30$ chromosomes gave rise to a greater number of the total calluses and embryogenic callus. The culture mediums that induced the best response were those that contained 2.4-D in all the concentrations tested. The obtained calluses were distributed in four repetitions and they were seeded in the regeneration media containing N-benzyl-aminopurine BAP (0.5 mg/l) and were transferred to a chamber growth with a photoperiod of 14h light and a constant temperature of 22 °C. After a month, the number of developed buds (green or albinos) was counted and were estimated the following variables: TSV = total number of buds (green or albinos)/total number of calluses; TSVC= number of green buds/total number calluses; SCC = number of green buds from compact calluses/total number of compact callus; SSC = number of green buds from soft calluses/total number of soft calluses; total green buds/total immature embryos (R). The ANOVA test for each one of the variables revealed significant differences between the populations. The study of the variable R, that summarizes the response of the *in vitro* culture, has allowed classifying the six populations based on its aptitude for the regeneration of plants from the *in vitro* culture of immature embryos. Thus, two populations of $2n = 30$ chromosomes, Bd238 and Bd341 were those of the best behavior, whereas the populations Bd160 and 'Zulema' with $2n = 10$ chromosomes, showed the lowest response.

Keywords: *Brachypodiumdistachyon*, immature embryos, somatic embryogenie, cytotype, regeneration.

Résumé - On se propose d'étudier la réponse à la culture *in vitro* des embryons immatures de six populations de *Brachypodiumdistachyon* sélectionnées en vue de leurs dotations chromosomiques : $2n=10$, $2n=20$ et $2n=30$. Les embryons immatures ont été cultivés dans neuf milieux d'induction de la callogenèse allant de BR1 à BR9, les milieux de culture se distinguent uniquement par le régulateur de croissance : l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2.4-D), Dicamba ou Picloran, et leurs concentrations dans les différents milieux de culture (1, 2 ou 4 mg/l). Dans un premier temps, Les génotypes testés ont été évalués pour leur aptitude à l'induction de l'embryogenèse somatique, pour cela quelques paramètres ont été pris en considération : le taux de la callogenèse, Nombre^o totale de cals/Nombre total des embryons cultivés (TC) ; Nombre total de cals compactes/n^ototal de cals (CC) et nombre total de cals friables /n^ototal de cals (SC). Au cours de la première phase de la culture *in vitro* l'analyse de la variance «ANOVA» appliquée aux variables analysées a montré des différences hautement significatives ($p<0.001$) entre les différents cytotypes. Cette variabilité génétique a mis en évidence les performances



des populations Bd238 et Bd341 ($2n=30$) en termes d'induction de la callogenèse et de la production des cals embryogènes. De même, nous avons conclu que l'auxine 2,4-D favorise la formation des cals compacts indépendamment de sa concentration dans le milieu d'induction. Les cals obtenus ont été repiqués dans un milieu de régénération (G1) contenant le 6-benzylaminopurine BAP (0.5 mg/l) et ont été maintenus dans une chambre de culture à une photopériode de 14/24h de lumière et à une température constante de 22°C. Pour étudier l'évolution des cals dans le milieu de régénération nous avons calculé les variables suivantes : n° total des plantules (vertes et albes)/ n° total des cals (TSV), n° total des plantules vertes/ n° total des cals (TSVC), n° total des plantules vertes à partir des cals compacts/ n° total des cals compacts (SCC), n° total des plantules vertes à partir des cals friables (Soft)/ n° total des cals friables (SSC) et n° total des plantules vertes / n° total des embryons (R). L'analyse de la variance et le test LSD appliquée à toutes ces variables ont montré des différences hautement significatives ($p<0.001$) entre les différents génotypes testés et a révélé que le matériel végétal étudié est doté d'une large base génétique.

Les six populations ont été classées selon leur réponse globale à la culture *in vitro* des embryons immatures (variable R). Par ailleurs, les deux populations Bd238 et Bd341 avec $2n=30$ chromosomes ont manifesté les meilleurs comportements avec un nombre de plantules/embryon estimé à 2.21 et 0.47 respectivement tandis que la population Bd160 et la variété 'Zulema' ($2n=10$) ont montré de très faibles taux de régénération des plantules.

Les résultats concernant la production laitière des lapines, montrent une quantité de lait plus importante au niveau du lot E₁ avec un pic de 237,17g. Cette production est significativement plus élevée comparativement aux deux autres groupes (le lot C = 163,95g et le lot E₂ = 158,21g). De plus il y a une forte corrélation entre la quantité de lait produite et la quantité de lait consommée par les lapereaux. Les résultats ont montré aussi qu'au niveau du lot E₁ : la mortalité à la naissance est plus faible que les autres lots, la mortalité des lapereaux avant sevrage est la plus faible (2,1%) et le poids des lapereaux au sevrage le plus élevé ($549,95g \pm 36,12$); alors que celui enregistré dans le cas du lot C est de $444,34g \pm 26,02$ et celui du lot E₂ est de : $497,15g \pm 22,17$.

Mots clés: *Brachypodium distachyon*, embryons immatures, embryogenèse somatique, cytotype, régénération.

1. Introduction

Les céréales tels que le blé, l'orge, le maïs, le riz, le sorgho et d'autres de la famille des *Poacées* (anciennement *Graminées*) fournissent à l'échelle mondiale l'essentiel de la nutrition humaine et animale. Au sein de cette famille, l'espèce *Brachypodium distachyon* est proposée comme une plante modèle depuis 2001 par Draper *et al.*, (2001). En effet, la notion de plante modèle s'est commencée par la découverte de *Arabidopsis thaliana* au début des années 1980. Cette petite dicotylédone de la famille des *Brassicacées*, de cinq chromosomes a servi comme système modèle des espèces végétales pendant des décennies (Bevan *et al.*, 2010). Son petit génome (environ 120Mb) entièrement connue s'est avéré utile pour la quantité et la qualité des marqueurs qui a fourni et qui ont permis de décortiquer plusieurs mécanismes génétiques complexes chez d'autres espèces (Catalan *et al.*, 2012). Cependant, des différences fondamentales biologiques et métaboliques entre *Arabidopsis thaliana* et la tribu des *Triticeae* limite son rôle comme plante modèle des céréales de climat tempéré (Brkljacic *et al.*; 2011, Zombori *et al.*, 2011). Par ailleurs, en 2010, *Brachypodium distachyon* a livré les secrets de son génome grâce à un consortium international (International *Brachypodium* Initiative 2010). La connaissance de ce génome, la disponibilité d'outils génomiques (Kellogg *et al.*, 2015) et la constitution de ressources ont rapidement hissé *B. distachyon* au rang de plante modèle. Le nouveau système modèle ouvre des perspectives scientifiques majeures autour d'enjeux essentiels comme l'amélioration et la génomique végétale comparative (Kellogg *et al.*, 2015). En outre, l'étude du génome de *Brachypodium distachyon* a prouvée une grande colinéarité et syntenie avec celui du riz et du sorgho, témoignant ainsi de l'origine commune récente de ces trois plantes (Salse *et al.*, 2010).

Les avancées de *B. distachyon* ont bénéficiées de sa petite taille (20 à 30 cm) et du cycle biologique relativement court sous conditions contrôlées (8 à 10 semaines). En plus, cette espèce se satisfait de conditions de cultures simples qui facilitent son maintien et sa production en serre (Draper *et al.*, 2001; Opanowicz *et al.*, 2008). En plus de toutes ces caractéristiques désirables une espèce modèle devrait avoir une bonne réponse à la culture *in vitro* pour des travaux ultérieurs de transformation

génétique par *Agrobacterium* ou par méthode biolistique (Bablak et al., 1995). Celle-ci réside dans sa capacité à produire des cals embryogènes et de régénérer par la suite des plantules (Hammami et al., 2011a). Chez les blés différents organes furent évalués pour l'induction des cultures régénérables : embryons matures ou immatures, inflorescences, anthères, feuilles... (Maddock et al., 1983 ; Barcelo et al., 1991 ; Barakat, 1994). En effet, les meilleurs résultats pour l'induction des cals embryogènes et la régénération des plantes chez les céréales sont obtenues à partir des embryons immatures (González et al., 2001 ; Kilinic, 2004 ; Sener et al., 2008). Ces derniers sont considérés comme la meilleure source de tissus régénérables et représentent jusqu'à maintenant le matériel de choix pour la manipulation génétique des céréales (Rubio et al., 2005). Plusieurs auteurs ont suggéré que les embryons immatures ou les cals initiées d'eux constituent les tissus cibles pour l'introduction d'ADN par méthode de transfert directe ou via *Agrobacterium* (Alves et al., 2009 ; Rubio et al., 2005).

En accord avec les travaux de Evans et al., (1981), l'aptitude à l'induction de l'embryogenèse somatique à partir des embryons immatures est fortement influencée par la composition du milieu de culture et précisément par la concentration de l'auxine (Mathias & Simpson, 1986 ; Carman et al., 1987b ; He et al., 1986). Chez les graminées, l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) est le régulateur de croissance le plus utilisé pour l'induction des embryons somatiques. D'autres auxines synthétiques telles que le Picloran, l'acide 2-benzothiazoleacétique et l'acide parachlorophénoxyacétique ont montré aussi des résultats satisfaisants (Kilinic, 2004 ; Sener et al., 2008).

Antérieurement à ce travail, nous avons testé la réponse à la culture *in vitro* des embryons immatures d'une collection de 23 populations autochtones espagnoles de *B. distachyon* et deux variétés commerciales 'Ibros' et 'Zulema' dans deux milieux de culture MS et MSm (Murashige et Skoog, 1962) distingués uniquement par le type de sucre ajoutée au milieu d'induction de la callogenèse (Hammami et al., 2011a). Les résultats de ce travail ont montré que la collection des génotypes testés est caractérisée par une large diversité génétique de manière que la collection est composée par quelques populations complètement récalcitrantes et d'autres qui ont manifestées une bonne réponse à la culture *in vitro* (Hammami et al., 2011a).

La présente étude a comme but d'évaluer la capacité d'embryons immatures chez six populations de *B. distachyon* choisis selon leurs dotations chromosomiques (deux populations ayant $2n=10$, deux populations avec $2n=20$ et deux populations ayant $2n=30$) à induire la callogenèse et particulièrement à produire des cals embryogènes et à régénérer des plantules. Autour de cet objectif principal s'articulent des études complémentaires: i) l'incidence de la composition chromosomique des génotypes testés. ii) l'incidence de la composition du milieu d'induction de l'embryogenèse somatique en testant l'effet des différentes auxines et leurs concentrations dans les milieux de culture. iii) la réceptivité des cals dans le milieu de régénération et leur performance à produire des plantules.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel végétal

Des embryons immatures ont été utilisés qui proviennent de cinq populations sylvestres de *Brachypodium distachyon* différenciées par leur nombre de chromosomes: Bd160 et la variété commerciale 'Zulema' avec $2n=10$; Bd114 et Bd115 ayant $2n=20$; Bd238 et Bd341 ($2n=30$). Les populations étudiées ont été collectées suite à plusieurs prospections effectuées durant cinq ans dans différentes régions du territoire espagnol. La variété 'Zulema' a été obtenue par domestication et sélection Massal à partir d'une population sylvestre. Elle est inscrite dans le catalogue officiel des variétés européennes depuis 2005 et commercialisée par l'entreprise AgrosaSemillas S.A, comme plante protectrice des régions affectées par l'érosion éolienne et hydrique. Le tableau n°1 indique l'origine géographique de chaque population de *Brachypodium distachyon*.

Tableau n°1 : Origine géographique des cinq populations de *B. distachyon* et la variété 'Zulema' 5 (Bd3113)

| Population | localisation | Altitude (m) | 2n |
|------------------|-------------------|--------------|----|
| Bd-160 | Bonillo | 1025 | 10 |
| Zulema' (Bd3113) | Segóbriga | 850 | 10 |
| Bd-114 | Baeza | 750 | 20 |
| Bd-115 | Alcaráz | 910 | 20 |
| Bd-238 | Casarabonela | 550 | 30 |
| Bd-341 | Cañaveral de León | 530 | 30 |

2.2. Induction de l'embryogenèse somatique à partir des embryons zygotiques immatures de six populations de *Brachypodium distachyon* :

Les embryons sont obtenus à partir des caryopses en formation 15 à 25 jours après l'anthèse. A ce stade l'embryon mesure entre 0.4 à 0.7 mm. Cet intervalle de taille est estimé optimal pour stimuler la callogenèse. D'abord les caryopses immatures débarrassés de leurs glumes et glumelles sont désinfectés par trempage et agitation dans une solution 1:5 Domestos™ (détergent contenant de l'eau de javel) durant 20 minutes. Suivent quatre à cinq rinçages à l'eau distillé stérile sous une hotte à flux laminaire horizontal. Puis Les embryons désinfectées sont sectionnés à l'aide des pinces stériles sous une loupe stéréoscopique. Les explants sont placés face scutellaire vers le haut sur le milieu de culture solide dans des boîtes à Pétri de 9 cm de diamètre. L'ensemencement se fait à raison de dix embryons par boîte de Pétri.

Les milieux utilisessont ceux de *Murashige et Skoog*, (1962) supplémentés de trois régulateurs de croissance : l'auxine 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) BR1, BR2 et BR3, Picloran (BR4, BR5 et BR6) et Dicamba (BR7, BR8 et BR9) à des concentrations croissantes (1mg/l, 2 mg/l et 4 mg/l, respectivement).

Nous avons opté pour quatre répétitions de 20 embryons chacune pour chaque milieu et génotype. Les boites étaient scellées au parafilm. Pour induire les cals, les cultures étaient incubées à l'obscurité dans une étuve à 25°C.

Le nombre des cals compacts ou embryogéniques caractérisés par leur consistance solide et par leur structure globulaire superficielle était le premier paramètre recherché. De même nous avons comptabilisé le nombre de cals friables (soft) distingués par leur apparence duveteuse ou lisse.

L'aptitude à la callogenèse est évaluée tenant compte les paramètres suivants :

A partir des données obtenus nous avons calculé les variables suivantes : N°cals totales/N°total embryons cultivés (TC) ; N°cals embryogènes/N°total cals (CC) ; N°cals spongieux (Soft) /N°total cals (SC). Nous avons procédé par une analyse de variance pour chaque variable déterminée (TC, CC et SC). Préalablement au calcul de la variance nous avons transformé les données avec $\text{arc sen}\sqrt{x}$, dont le but de normaliser la distribution. Egalement, nous avons utilisé le test statistique LSD (Différence Significative Minimale) pour comparer les moyennes des populations cultivées dans un milieu proprement dit.

2.3. Régénération des pousses vertes :

Les cals obtenus durant la phase d'induction des cals ont été distribués en quatre répétitions et repiqués dans un milieu de régénération appelé (G1). Ce milieu était presque identique à ceux d'induction de la collagénèse sauf qu'il contient le régulateur de croissance BAP (6- benzylaminopurine) à une concentration de 0.5 mg/l. Les cals en régénération sont soumis à une photopériode de 14h/24 de lumière et à une température constante égale à 22°C.

Après quatre semaines dans ces conditions de culture constantes nous avons déterminé le nombre des pousses formées (vertes et albinos) pour chaque type de cals ensuite les variables suivantes ont été calculées : n° plantules totales (vertes + albinos)/ n°total cals (TSV) ; n°plantules vertes /n°total de cals (TSVC) ; n°total des plantules vertes à partir des cals compacts /n°total de cals compacts (SCC) ; n°total des plantules vertes à partir des cals friables /n°total de cals friables(SSC) ; n°total des plantules vertes/n°total des embryons immatures (R). Nous avons réalisé une analyse de variance pour chaque variable estimée dans la phase de régénération. Préalablement à l'ANOVA nous avons normalisé les valeurs obtenues par l'application de la transformation suivante : TSV : $\text{arc sen}\sqrt{x}/10$, TSVC : $\text{arc sen}\sqrt{x}/10$, SCC : $\text{arc sen}\sqrt{x}/10$, SSC : $\text{arc sen}\sqrt{x}/10$, R : $\text{arc sen}\sqrt{x}/10$.

3. Résultats

3.1. Evaluation de l'aptitude à la callogénèse

Le nombre total des embryons immatures provenant des cinq populations de *B. distachyon* et de la variété commerciale 'Zulema' cultivé dans les neuf milieux d'induction des cals embryogènes est estimé à 4.400 embryons. Les observations effectuées après quatre semaines de culture ont permis de distinguer des cals compacts, entièrement (Fig 1a) ou partiellement nodulaires (Fig 1b), qualifiés d'embryogènes, et d'autres non embryogènes ou friables qui sont d'aspect translucide et mucilagineux (Fig 1c). Au cours de ce travail, nous avons observé que le taux total de callogénèse des embryons immatures sectionnés est élevé chez toutes les populations testées indépendamment de la composition du milieu d'induction utilisé. L'induction des cals est mesurée par le taux d'explants ou des embryons immatures ayant produit des cals, après quatre semaines de la culture *in vitro*. La figure n°2 indique le pourcentage de callogénèse observé chez les génotypes testés. Les pourcentages varient de 55.60% chez la population Bd114 ($2n=20$) jusqu'au 94.61% chez Bd341 ($2n = 30$). Les valeurs observées chez le reste des populations sont inclus dans cet intervalle.

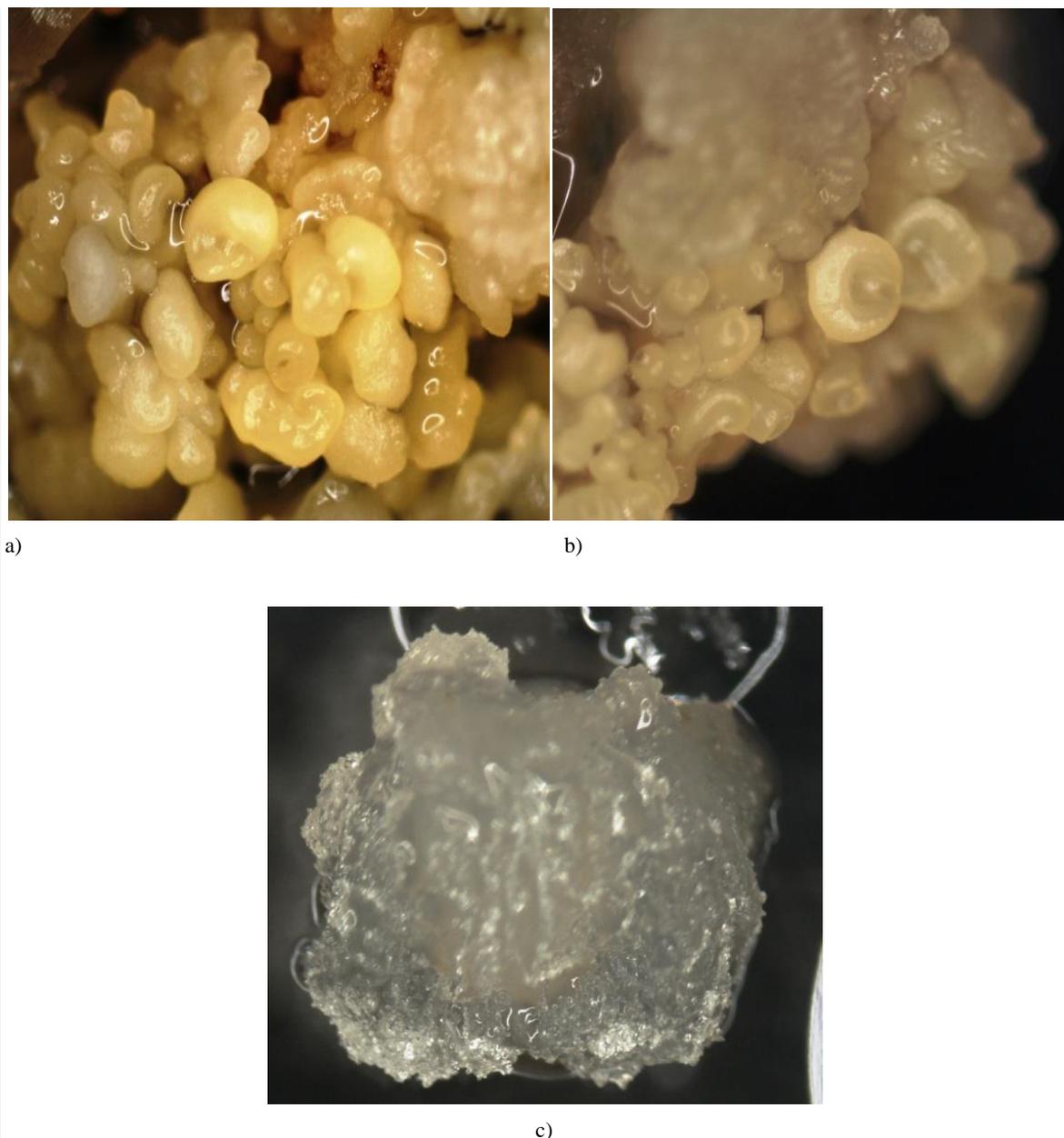


Figure n°1 : Induction des cals chez les 5 populations de *B. distachyon* et la variété 'Zulema' : a) Cal entièrement compacte (Bd114) ; b) Cal partiellement compacte (Bd 238) et c) Cal friable (Bd160)

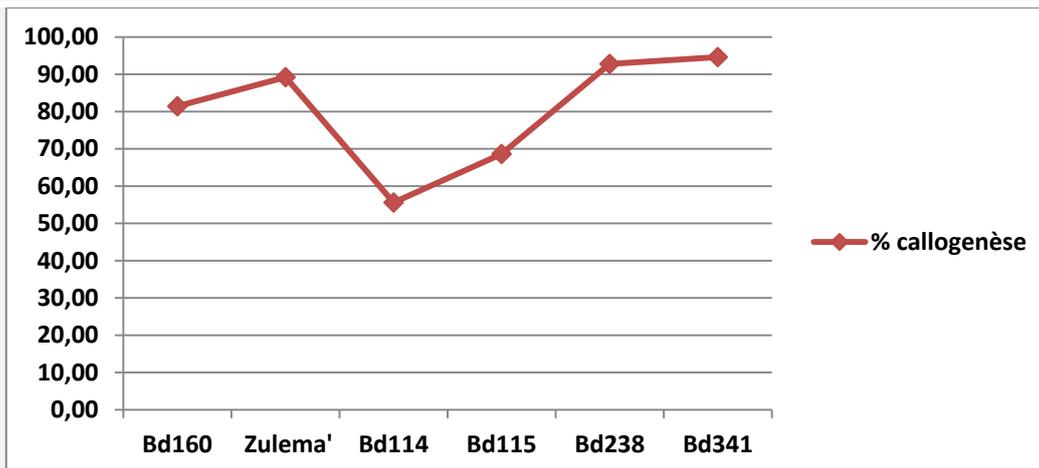


Figure n°2 : Induction de la callogénèse chez les 5 populations de *B. distachyonet* la variété 'Zulema' dans les neuf milieux de culture

La capacité embryogène des cals formés dans l'ensemble des milieux de culture utilisés, est mesurée par le pourcentage des cals embryogènes ([nombre de cals embryogènes/nombre total de cals de la population testée] x 100). L'évaluation de ce paramètre a montré des faibles taux de formation des cals compacts observés chez les génotypes Bd160 et la variété 'Zulema' (2n=10) avec des valeurs égales à 0.17 % et 0.16 % respectivement contrairement aux populations Bd114 et Bd115 (2n=20) qui ont manifesté une très bonne réponse à l'aptitude embryogène qui se traduit par des pourcentages élevés estimés à 60.22% et 53.69%, respectivement (Fig 3).

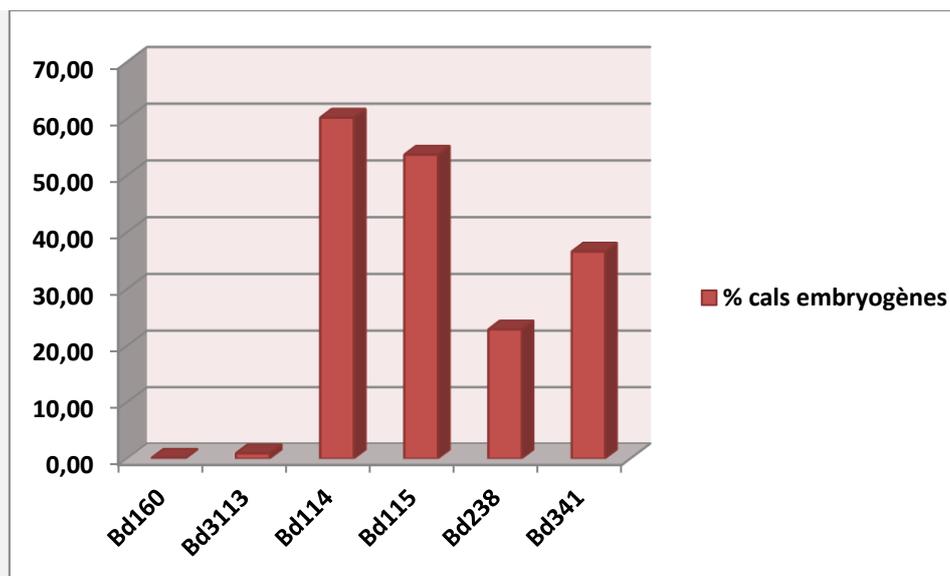


Figure n°3 : Pourcentages des cals embryogènes formés par les 5 populations de *B. distachyonet* la variété 'Zulema' (Bd13113) dans les neuf milieux de culture

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'influence de la composition chimique de chaque milieu d'induction c'est-à-dire l'effet des régulateurs de croissance (2.4 D, Picloran et Dicamba) et leurs concentrations testées (1mg/l, 2 mg/l et 4 mg/l) sur la capacité embryogène des génotypes analysés. Les figures 4, 5 et 6 illustrent bien les pourcentages des cals embryogènes et spongieux formés dans les neuf milieux de culture (BR1 à BR9). Il est à signaler que les milieux d'induction BR1, BR2 et BR3 supplémentés avec 2.4-D (1 mg/l, 2 mg/l et 4 mg/l, respectivement) ont présenté des pourcentages élevés des cals embryogènes e tel est le cas des génotypes Bd115 (2n=20) avec des pourcentages proches de 86%, 72% et 63% respectivement et Bd341 (2n=30) avec des valeurs estimés à 60.88%, 65.71 et 74.29% respectivement.

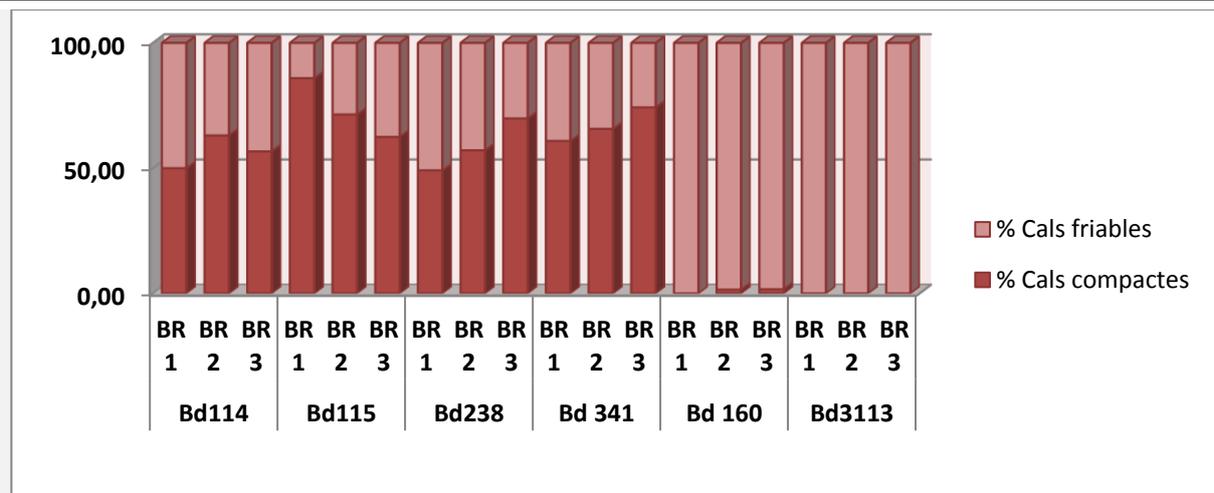


Figure n°4 : Pourcentages des cals embryogènes et friables formés par les 5 populations de *B. distachyonet* la variété 'Zulema' (Bd13113) dans les milieux BR1, BR2 et BR3 supplémenté avec 2.4-D sous 3 concentrations 1 mg/l, 2 mg/l et 4 mg/l, respectivement.

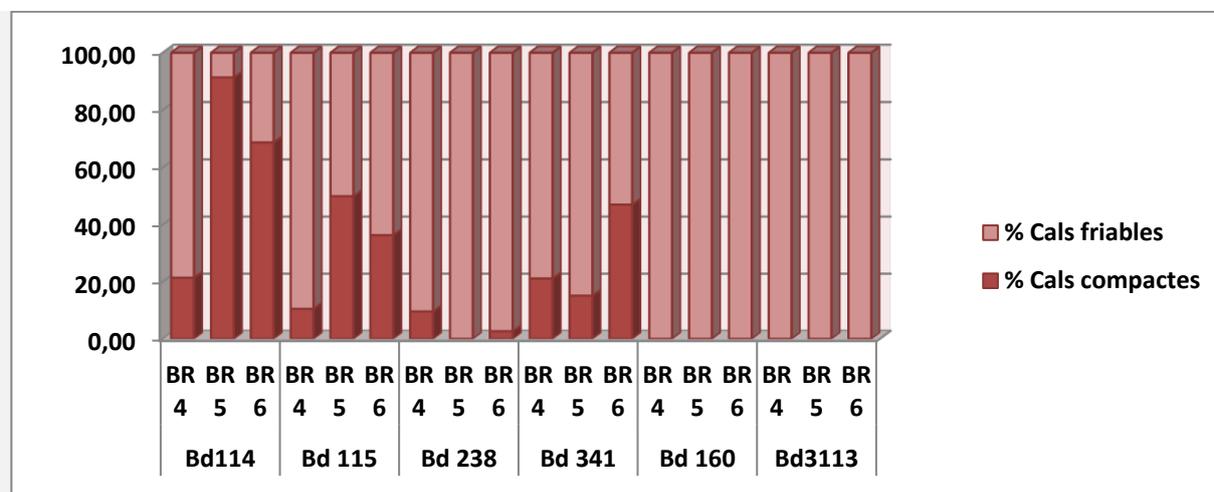


Figure n°5 : Pourcentages des cals embryogènes et friables formés par les 5 populations de *B. distachyonet* la variété 'Zulema' (Bd13113) dans les milieux BR5, BR5 et BR6 supplémenté avec Dicamba sous 3 concentrations 1 mg/l, 2 mg/l et 4 mg/l, respectivement.

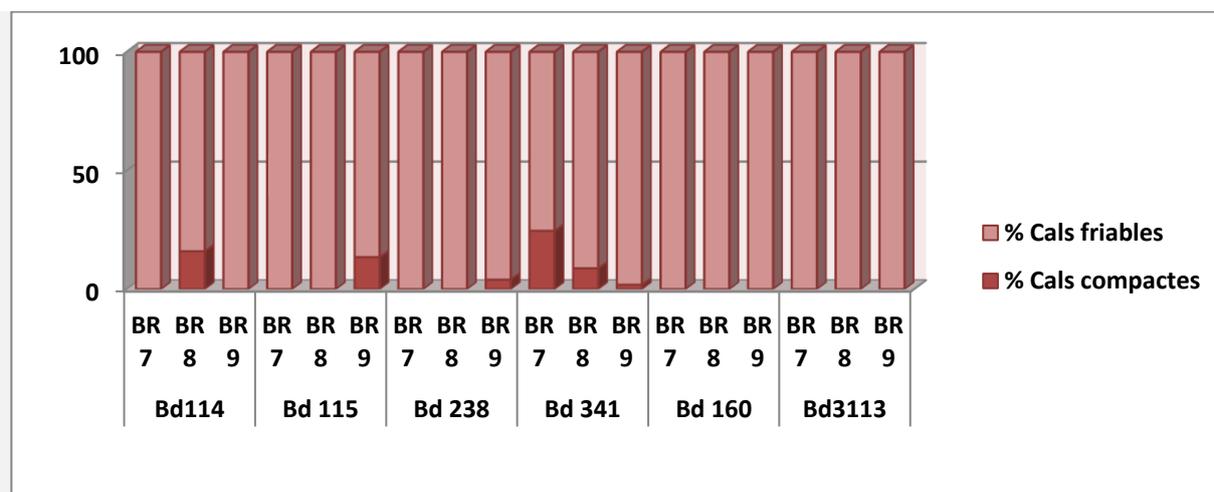


Figure n°6 : Pourcentages des cals embryogènes et friables formés par les 5 populations de *B. distachyonet* la variété 'Zulema' (Bd13113) dans les milieux BR7, BR8 et BR9 supplémenté avec Picloran sous 3 concentrations 1 mg/l, 2 mg/l et 4 mg/l, respectivement.

De même, nous avons observé que les génotypes Bd114 (2n=20), Bd115 (2n=20) et Bd341 (2n=30) ont manifesté des pourcentages acceptables d'induction de la capacité embryogènes lorsqu'ils sont cultivés dans des milieux préparés avec Dicamba (BR5 et BR6) dans deux concentrations différentes (2mg/l et 4 mg/l, respectivement) où le pourcentage des cals compactes s'est élevé à 94% chez la population Bd114 (Fig5). Cependant les comportements des six génotypes étudiés dans les milieux d'induction supplémentés par le régulateur de croissance Picloran (BR7, BR8 et BR9) dans différentes concentrations (1 mg/l, 2mg/l et 4 mg/l) ont confirmé que la composition de ces trois milieux stimule la production des cals friables avec des pourcentages très élevés estimés à 100% chez le génotypes Bd160 (2n=10), et la variété 'Zulema' et des valeurs qui dépassent les 80% chez le reste des cytotypes.

Pour une analyse judicieuse de cette première phase de la culture *in vitro*, nous avons recours à certaines variables : TC [N°cals totales/N°total embryons cultivés], CC[N°calsembryogènes /N°total cals] et SC [N°cals spongieux (Soft) /N°total cals] pour mieux comprendre le rôle de la composition du milieu de culture et le génotype dans le processus de la culture *in vitro* des embryons immatures de *B. distachyon*. L'application de l'analyse de la variance « ANOVA » à ces trois variables en fonction des facteurs génotype, milieu d'induction et l'interaction entre les deux (Tableau 2) a montré des différences hautement significatives ($p < 0.001$). De même le test LSD a permis de grouper les populations de *B. distachyon* selon de leurs compétences dans les milieux d'induction des cals. Pour la variable TC, il est très clair que les populations possédant le même caryotype ont une tendance à se regrouper ensemble ce qui traduit un effet très marqué du génotype (Tableau 3).

Tableau n°2 : Résultats de l'analyse de la variance ANOVA des variables analysées TC, CC et SC

| Variables | Source de variation | dl | Somme des carrés | Moyenne des carrés | Coefficient-F |
|-----------|---------------------|-----|------------------|--------------------|---------------|
| TC | Génotype (G) | 5 | 46802 | 9360 | 35,16*** |
| | Milieu (M) | 8 | 21677 | 2709 | 10,18*** |
| | G X M | 40 | 19913 | 497 | 1,87*** |
| | Résidus | 162 | 43129 | 266 | |
| | Total | 215 | 131523 | | |
| CC | Génotype (G) | 5 | 63824 | 12764 | 47,95*** |
| | Milieu (M) | 8 | 37106 | 4638 | 17,42*** |
| | G X M | 40 | 48010 | 1200 | 4,51*** |
| | Résidus | 162 | 43125 | 266 | |
| | Total | 215 | 192067 | | |
| SC | Génotype (G) | 5 | 106453 | 21290 | 53,86*** |
| | Milieu (M) | 8 | 16332 | 2041 | 5,16*** |
| | G X M | 40 | 45325 | 1133 | 2,87*** |
| | Résidus | 162 | 64037 | 395 | |
| | Total | 215 | 232147 | | |

*** = significatif $p < 0,001$

Tableau n°3 : Résultats du Test LSD appliqué aux trois variables TC, CC et SC en fonction du génotype

| Génotypes | Variables | | |
|------------------------|-----------|----|----|
| | TC | CC | SC |
| Bd 160 | b | a | d |
| Zulema'(Bd3113) | b | a | d |
| Bd114 | a | b | a |
| Bd115 | a | c | a |
| Bd238 | b | c | c |
| Bd341 | b | c | b |

Les structures embryogéniques initiées à partir des embryons immatures sont les plus importantes vue leur capacité à régénérer des plantules pendant la phase de régénération. L'analyse de la variance appliquée à la variable CC a montré des différences hautement significatives entre les cinq populations étudiées et la variété 'Zulema' ($p < 0.001$). Le test LSD pour cette variable CC a montré aussi des différences significatives ce qui indique que les populations étudiées présentent différentes aptitudes embryogènes. Ces différences mettent en évidence l'importance de l'effet génotype dans le processus de l'induction de l'embryogenèse somatique chez l'espèce *B. distachyon*. La population Bd160 et la variété 'Zulema' avec $2n=10$ étaient celles qui ont manifesté les taux d'induction les plus faibles, tandis que les génotypes Bd238 et Bd341 ($2n=30$) ont montré une réponse très acceptable à voir bonne en terme de production des cals compactes.

L'analyse de la variable SC a montré que les échantillons provenant des génotypes avec $2n=10$ étaient ceux qui produisaient un taux élevé des cals non embryogènes caractérisés par leur structure lisse ou bien rugueuse et statistiquement différents au reste des populations, précisément aux génotypes ayant $2n=20$ manifestant un pourcentage faible de formation des cals spongieux.

Nous avons aussi élaboré l'analyse de la variance de chaque variable testée (TC, CC et SC) au cours de la phase de la collagénèse en fonction du milieu de culture (BR1 à BR9). Dans le cas des variables TC et CC, les milieux de culture BR1, BR2 et BR3 supplémentés avec trois concentrations de 2,4-D (1 mg/l, 2 mg/l et 4 mg/l, respectivement) et le milieu BR6 préparé avec Dicamba à une concentration égale à 4 mg/l ont favorisé une bonne induction des cals totales de masse importante. Tandis que, les milieux BR7, BR8 et BR9 supplémentés avec l'hormone Picloran (1 mg/l, 2 mg/l et 4 mg/l, respectivement) ont manifesté la réponse la plus faible pour les trois variables analysées (Tableau 4).

Tableau n°4 : Résultats du Test LSD appliqué aux trois variables TC, CC et SC en fonction du milieu de culture.

| Milieux | Variables | | |
|------------|-----------|-----|-----|
| | TC | CC | SC |
| BR1 | cd | d | ab |
| BR2 | d | d | ab |
| BR3 | d | d | a |
| BR4 | ab | a | abc |
| BR5 | bc | bcd | abc |
| BR6 | bcd | cd | abc |
| BR7 | a | a | bc |
| BR8 | ab | ab | c |
| BR9 | ab | abc | c |

*Aptitude des cals à régénérer des plantules

Les cals âgés de quatre ou cinq semaines, cultivés sur le milieu d'induction sont repiqués sur le milieu de régénération G1. La régénération des cals correspond à sa capacité de donner naissance au moins à une plantule et elle consiste la phase la plus critique dans tout le processus de la culture *in vitro* des embryons immatures de *B. distachyon*. Tous les cals obtenus ont été distribués en quatre répétitions sur le milieu de régénération. Les deux types de cals ont répondu différemment :

*Les cals embryogènes régénèrent, dans la majorité des cas, et donnent des plantules sous trois à quatre semaines (Fig7a), cette régénération s'est manifestée par une caulogénèse, d'abord nous avons observé des structures verdâtres à la surface des cals puis une croissance accélérée des feuilles.

*Les cals non embryogènes ont une tendance, parfois, à former des racines sans chlorophylle (Fig 7b) mais dans la plupart des cas, aucune morphogénèse n'est observée et les cals tendent plutôt à se nécroser (Fig7c).

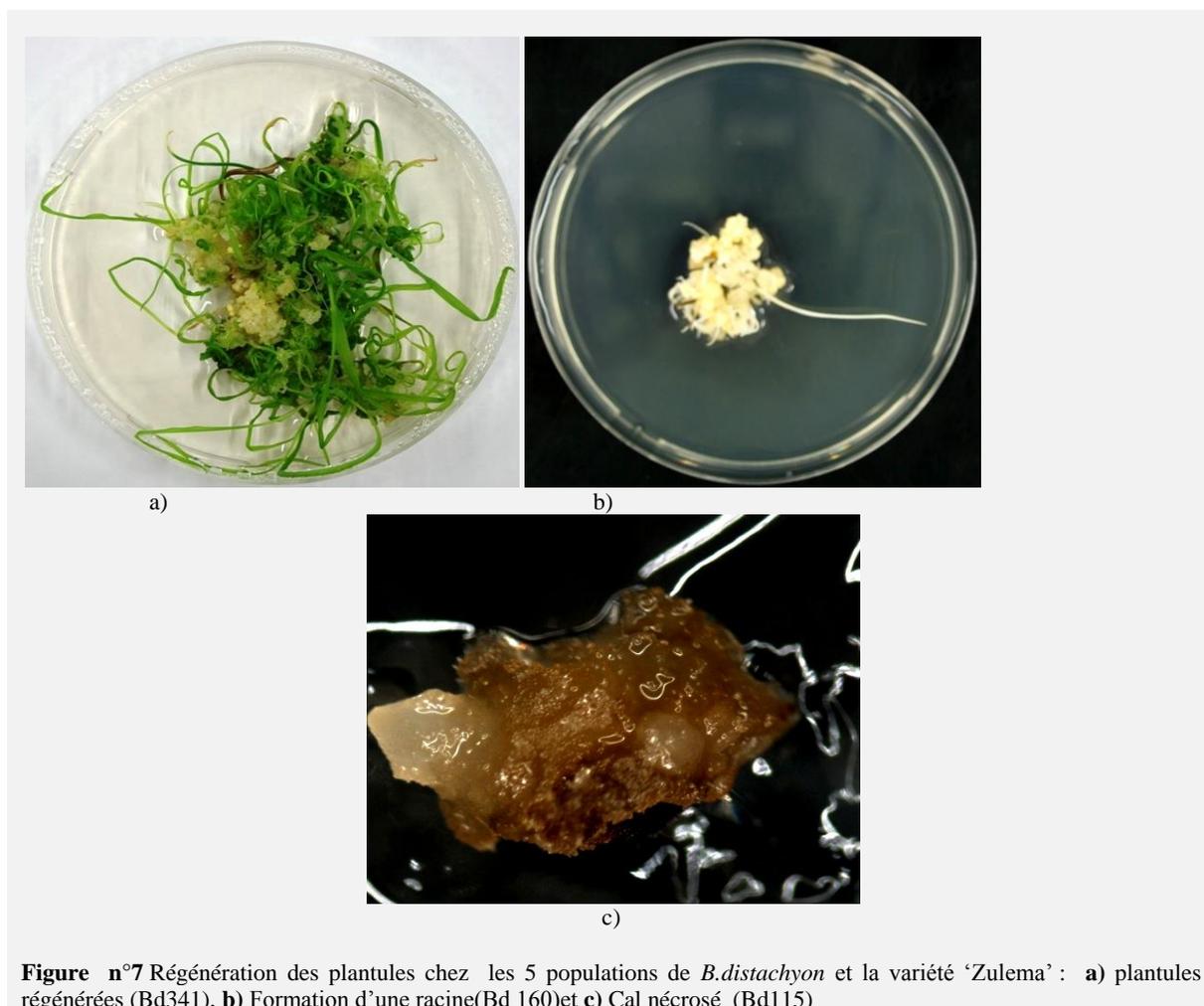


Figure n°7 Régénération des plantules chez les 5 populations de *B.distachyon* et la variété 'Zulema': **a)** plantules régénérées (Bd341), **b)** Formation d'une racine(Bd 160)et **c)** Cal nécrosé (Bd115)

A partir des résultats obtenus au cours de la phase de régénération des plantules, nous avons calculé les variables suivantes TSC, TSVC, SCC, SSC et R. Le Tableau n°5 montre le résultat de l'analyse de la variance appliquée à toutes les variables évaluées. Des différences hautement significatives ont été observées dans tous les cas sauf pour la variable SSC. Le manque de signification est probablement justifié par le fait que les cals friables ne produisaient pas des plantules vertes. Le test LSD a été appliqué aussi à toutes les variables dont le but de grouper les populations qui ont montré des comportements similaires (Tableau 6). En général, les populations Bd238 et Bd341 (2n=30) sont celles qui ont présenté la meilleure réponse à la régénération des plantules dans le milieu G1 contrairement à la population Bd160 et la variété 'Zulema' (2n=10) qui ont manifesté des taux de régénération négligeables.

Tableau n°5 : Résultats de l'analyse de la variance ANOVA des variables analysées TSC,TSVC, SCC, SSC et R

| Variables | Source de variation | dl | Somme des carrés | Moyenne des carrés | Coefficient-F |
|-----------|---------------------|----|------------------|--------------------|---------------|
| TSC | Between populations | 5 | 2084 | 416 | 17,61*** |
| | within population | 18 | 425 | 23 | |
| | Total | 23 | 2510 | | |
| TSVC | Between populations | 5 | 1787 | 357 | 17,29*** |
| | within population | 18 | 372 | 10 | |
| | Total | 23 | 2159 | | |
| SCC | Between populations | 5 | 853 | 170 | 16,57*** |
| | within population | 18 | 185 | 10 | |
| | Total | 23 | 1039 | | |
| SSC | Between populations | 5 | 689 | 137 | 3,87 (ns) |
| | within population | 18 | 641 | 35 | |
| | Total | 23 | 1331 | | |
| R | Between populations | 5 | 1701 | 340 | 17,07*** |
| | within population | 18 | 358 | 19 | |
| | Total | 23 | 2060,71 | | |

***= significatif $p < 0,001$; (ns) = non significatif

Tableau n°6 : Résultats du Test LSD appliqué aux variables TSC,TSVC, SCC, SSC et R en fonction du génotype

| Variables | TSC | TSVC | SCC | SSC | R |
|-------------------------|-----|------|-----|-----|-----|
| Génotypes | | | | | |
| Bd 160 | b | a | a | a | a |
| Zulema' (Bd3113) | b | ab | b | ab | ab |
| Bd114 | a | bc | ab | a | abc |
| Bd115 | a | c | b | a | bc |
| Bd238 | c | d | c | ab | d |
| Bd341 | b | c | b | b | c |

Nous avons établi une relation entre les taux de régénération et les pourcentages des cals embryogènes formés par chaque génotype (Fig8). L'existence d'une corrélation hautement significative ($R^2 = 0.808$) entre le taux de cals compactes et de régénération des plantules indique que ces deux critères sont proportionnels ce qui justifie le bon comportement des populations Bd238 et Bd341 suivie par les populations Bd114 et Bd115.

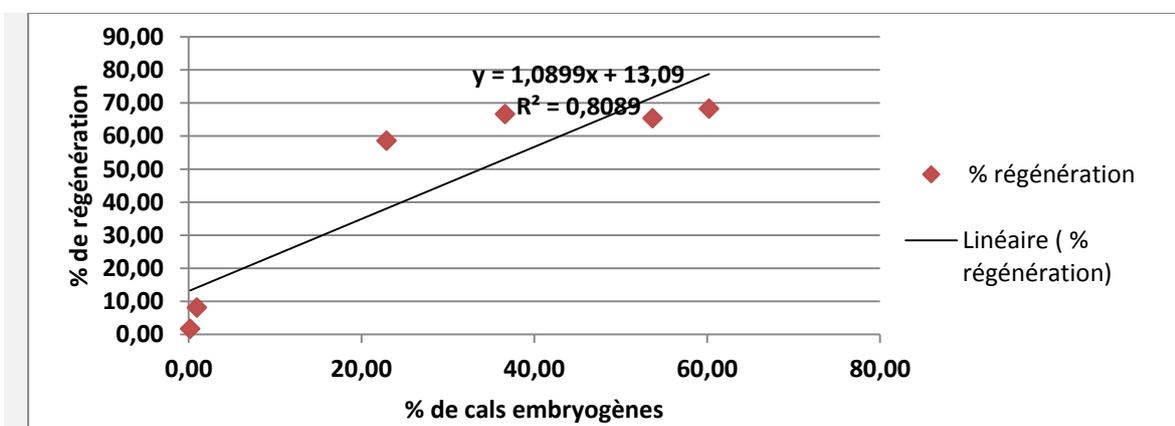


Figure n°8 : Relation entre le taux de cals embryogènes observée chez les 5 populations de *B. distachyon* et la variété 'Zulema' et le taux de régénération des plantules

La variable R est considérée comme une estimation globale de l'aptitude d'un génotype à régénérer des plantules à partir des embryons immatures. La population Bd238 est celle qui a montré la valeur la plus élevée estimée à 2.21 plantules par embryon immature. Cette valeur est cinq fois plus importante que celle observée chez la population Bd341 qui a montré une valeur réduite à 0.47.

4. Discussion

L'exploration de la diversité génétique de *B. distachyon*, naturelle ou issue des travaux de la manipulation génétique est devenue une priorité pour certains laboratoires. Aujourd'hui. Il existe de nombreux travaux autour de la biologie de la reproduction de *Brachypodium* (morphologie des fleurs, qualité physico-chimique des graines), de la biologie structurale (structure de la paroi cellulaire...), de la sensibilité à des agents pathogènes qui affectent énormément les céréales et bien évidemment l'aptitude à la transformation génétique dont sa réussite dépend largement de la culture *in vitro* des embryons matures ou immatures.

Chez les céréales, les embryons immatures sont les explants qui ont montré la meilleure réponse à la culture *in vitro* (Ahloowali, 1982 ; González et al., 2001 ; Rikiishi et al., 2003 ; Halamkova et al., 2004 ; Li et al., 2006 ; Chauhan et al., 2007). Chez *B. distachyon*, quelques travaux ont été réalisés avec du matériel végétal possédant $2n=10$ (Balbak et al., 1995 ; Draper et al., 2001 ; Christiansen et al., 2005 ; Bahar et al., 2008).

En général, la culture *in vitro* des embryons immature induit l'embryogenèse somatique qui se traduit par la provocation artificiellement d'un embryon à partir des cellules somatiques. Ce phénomène s'accompagne de prolifération cellulaire et aboutira à la formation d'un cal. L'aptitude à la callogenèse constitue une étape primordiale pour sélectionner les génotypes présentant une bonne capacité d'induction de l'embryogenèse somatique.

A la lumière d'un essai antérieur réalisé par Hammami et al., (2011a) qui s'est limité uniquement à deux milieux d'induction de l'embryogenèse somatique, nous avons choisi les six populations testées dans la présente étude, caractérisées par différents nombre de chromosomes. Par ailleurs, l'étude s'est focalisée sur l'influence de la composition du milieu de culture c'est-à-dire l'effet du régulateur de croissance (2,4-D, Dicamba ou Picloran), sa concentration (1 mg/l, 2 mg/l ou 4 mg/l) dans le milieu, l'importance de l'effet génotype ($2n=10$, 20 ou 30) et bien évidemment l'interaction G*M.

L'observation des cals obtenus nous a permis de distinguer deux types de cals :

- Des cals embryogènes caractérisés par la formation des structures compactes : les embryons somatiques avec leurs deux pôles : un pôle racinaire et un pôle caulinaire identiques à ceux observés chez les embryons zygotiques, ces cals sont caractérisés par un très bon pouvoir régénératif.
- Des cals non embryogènes d'aspect spongieux et duveteux caractérisés par une faible capacité de régénération.

Dont le but d'évaluer le comportement des génotypes testés durant la phase d'induction de l'embryogène somatique, nous avons calculé trois variables : TC, CC et SC. L'analyse de la variance 'ANOVA' appliquée à la variable CC a montré des différences hautement significatives ($p < 0.001$). Sachant que les génotypes ayant le plus petit nombre de chromosomes ($2n=10$) furent ceux qui ont présenté le pourcentage le plus faible des cals embryogènes. Contrairement aux populations avec $2n=20$ (Bd115) et $2n=30$ (Bd238 et Bd341) qui ont montré des taux élevés de formation des cals embryogènes.

De même le test LSD a permis de grouper les populations selon leurs performances durant cette première phase et a montré que les populations ayant le même nombre de chromosome ont une tendance à se regrouper ensemble. Malgré que les taux de callogenèse furent élevés presque chez toutes les populations de *B. distachyon*, le pourcentage de formation des cals embryogènes était très faible chez la population Bd160 et la variété 'Zulema' ($2n=10$) qui induisaient des taux extrêmement élevés des cals friables, cette diminution de la capacité embryogène s'est répercuté sur le pouvoir de régénération de ses cals dans le milieu G1.

Dans le présent travail, les milieux BR1, BR2 et BR3 supplémentés avec 2,4-D à des concentrations estimées à 1 mg/l, 2 mg/l et 4 mg/l, respectivement, sont les meilleurs en termes de productions des cals embryogènes contrairement aux milieux BR7, BR8 et BR9 contenant Picloran (1 mg/l, 2 mg/l et 4 mg/l, respectivement) qui ont induit la formation des cals friables à faible pouvoir de régénération.

La réaction d'un explant à la composition du milieu de culture dépend essentiellement de l'auxine supplémentée à ce milieu et de sa concentration. Il est admis que, durant l'induction de l'embryogenèse somatique, les régulateurs de croissance interviennent qualitativement et quantitativement pour contrôler l'évolution de ce phénomène (Morris *et al.*, 1991).

L'effet de la composition du milieu sur le développement des embryons immatures chez plusieurs espèces a été largement étudié (Carman *et al.*, 1988 ; Hanzal *et al.*, 1985). Dans ce sens, Elwafa et Ismail (1999) et Alok *et al.*, (1999) ont suggéré que la production des cals dépend de plusieurs facteurs tels que le type de l'explant (Vasil, 1994), son stade de développement (Varshney *et al.*, 1996) de la taille de l'embryon (Draper *et al.*, 2001) et de la composition nutritionnelle du milieu de culture utilisé (Mathias y Simpson, 1986 ; Ahmad *et al.*, 2002).

Les résultats de la présente étude confirme les observations de Serhantová *et al.*, (2004), qui ont testé la réponse à la culture *in vitro* de treize cultivars d'orge dans différents milieux préparés avec 2.4-D, Dicamba et Picloran. De cette collection, onze génotypes ont produisaient des taux élevés de cals embryogènes lorsqu'ils sont cultivés dans des milieux supplémentés avec 2.4-D. Les auteurs ont conclu que le meilleur comportement est observé lorsque les embryons sont cultivés dans un milieu préparé avec l'auxine 2.4-D à une concentration de 2.5 mg/l. De la même manière, Sikandar *et al.*, (2007) ont étudié le comportement des embryons matures de deux variétés de blé tendre et ont montré que la fréquence de production des cals embryogènes est en fonction de la concentration de l'auxine 2.4-D dans le milieu de culture et ils ont observé que le potentiel des variétés testées est à son maximum lorsque la concentration de l'hormone est égale à 3.5 mg/l. Egalement, Shafquat *et al.*, (2009), ont analysé la réponse à la culture *in vitro* de trois variétés de *Triticumaestivum* sous différentes concentrations de régulateurs de croissance et ils ont suggéré que la variété 'Khirman' produisait un pourcentage élevé des cals compactes dans un milieu de culture basé sur 2.4-D (1 mg/l) + kin (1 mg/l) + NAA (2 mg/l).

Kilinc, (2004), a testé aussi le comportement *in vitro* des embryons matures de sept cultivars de blé tendre dans des milieux préparés avec l'hormone Dicamba sous différentes concentrations (2.5 ; 5 ; 7.5 et 10 mg/l) et ces résultats ont montré que le taux de formation des cals dépend du génotype et de la concentration de l'auxine suggérant ainsi qu'à une concentration de 5 mg/l de Dicamba la réponse des variétés était spectaculaire.

La présente étude a montré que les populations de *Brachypodium distachyon* possédant $2n=30$ et $2n=20$ ont favorablement répondu aux stimulants des milieux de la culture. Ces résultats sont en accord avec les travaux réalisés par Christianse, (2005) sur la même espèce qui a analysé le comportement *in vitro* des embryons immatures de quatre populations de *B. distachyon* et il a conclu que les génotypes BDR017 et BDR030 avec $2n=20$ ont présenté une bonne aptitude à la culture *in vitro* qui se traduit par des taux d'induction des cals embryogènes très élevés proches de 91%. Tandis que les génotypes BDR001 et BDR018 ($2n=10$) ont produit des faibles pourcentages de cals embryogènes estimé à 30%. L'effet génotype paraît être le facteur clé pour la stimulation de la capacité embryogène qui se répercute de façon directe sur la régénération des plantules. Cet effet a été largement étudié par plusieurs auteurs (Maddock *et al.*, 1983 ; Ou *et al.*, 1989 ; Felföldi & Purnhauser, 1992). Chez les graminées, le contrôle génétique de l'embryogenèse somatique a fait l'objet de nombreux travaux (Higging & Mathias, 1987 ; Henry *et al.*, 1994a).

Le phénomène de régénération est une étape très critique car elle conditionne la réponse globale d'un génotype donné à la culture *in vitro*. Au cours de la présente étude nous avons analysé les variables suivantes : TSV, TSVC, SCC, SSC et R, l'analyse de la variance 'ANOVA' et le test LSD ont montré des différences significatives dans tous les cas. Les populations Bd238 et Bd341 avec $2n=30$ ont présenté une bonne aptitude à la régénération des plantules vertes. Cependant, les populations Bd114 et Bd115 ($2n=20$) ont formé des taux de régénération faibles par rapport à leurs potentiels d'induction des cals embryogènes. En effet, les génotypes ayant $2n=20$ induisaient des cals embryogènes volumineux, présentant à leurs surfaces des centaines des embryons somatiques mais quand ils sont repiqués dans le milieu de régénération G1 uniquement quelques cals ont régénérer des plantules. L'absence de corrélation entre le taux de callogenèse et de régénération montre que ces deux phénomènes sont contrôlés par des mécanismes génétiques différents. L'indépendance de ces deux caractères a été déjà signalée chez le Blé (Chowdhury *et al.*, 1991), ainsi que chez l'orge (Komatsuda *et al.*, 1989). Les gènes qui contrôlent l'induction la callogenèse et la capacité embryogène ne sont pas les mêmes. Par ailleurs, chez les graminées, les embryons immatures à des stades jeunes synthétisent de quantités plus au moins

importantes d'ABA en fonction du facteur génotype. Le niveau endogène de ce régulateur de croissance est par contre nul au stade embryon mature (Qureshi et al., 1989 ; Brown et al., 1989). Ainsi une synthèse élevée d'ABA favorise la formation des cals embryogènes. Egalement, Papenfus & Carmen (1987), Ozgen et al., (1998) et Benkirane et al., (2000) ont suggéré que lorsque le blé est cultivé dans des conditions optimales, la phase d'induction des cals et la phase de régénération des plantules vertes sont deux phénomènes indépendants. Les populations de *B. distachyon* et la variété 'Zulema' testées dans la présente étude confirment cette hypothèse ce qui nous a de conclure que le processus de culture *in vitro* est déterminée par deux phases séparées dans le temps et elle sont contrôlées par des mécanismes génétiques différents (Hammami et al., 2011a).

Dans un essai préliminaire antérieur à ce travail (Hammami et al., 2001), les populations ayant $2n=20$ chromosomes favorisaient la callogenèse avec des taux d'induction des cals embryogènes spectaculaires, ces mêmes cals ont présentés une bonne aptitude à la régénération positivement corrélée avec leur aptitude de callogenèse (Hammami et al., 2011a). Alors l'expression de la compétence morphogénétique *in vitro* est donc complexe et fortement influencée par les facteurs physiologiques, génétiques et surtout environnementaux. Ces résultats appuient les travaux de Hess & Carman (1998) qui ont affirmé que les conditions de développement des plantes donatrices des embryons pourraient affecter la concentration endogènes des hormones en ralentissant la capacité de formation des cals embryogènes, indépendamment du génotype testé. Dans ce contexte, Dejan et al., (2010) ont analysé la réponse à la culture *in vitro* de 96 génotypes de blé tendre et ont prouvé l'importance des facteurs climatiques tels que la température et la pluviométrie dans la réussite de la collagénèse.

Finalement, La variable R est l'estimation globale de la capacité d'une population à régénérer des plantules *in vitro* partant de la culture des embryons immatures. Cette variable a indiqué des différences remarquables entre les cinq populations et la variété 'Zuema' testées. De ce fait, Bd238 ($2n=30$) a formé le nombre de plantules par embryon le plus élevé estimé à 2.21 suivie par la population Bd341 ($2n=30$) avec une valeur égale à 0.47 plantules par embryon mis en culture. Au contraire, les populations avec Bd160 et la variété 'Zulema' ont présenté la réponse la plus faible en termes de régénération des plantules.

L'expression de la performance morphogénétique des embryons immatures des différentes populations de *B. distachyon* est un phénomène complexe et fortement influencée par des facteurs génétiques et par la composition du milieu de culture. Le protocole de culture *in vitro* élaboré dans ce travail a mis en évidence certaines corrélations permettant de qualifier l'aptitude à la culture *in vitro* des génotypes testés.

5. Conclusion

Les résultats de ces expérimentations proviennent de la mise en culture de près de 4.400 embryons immatures, tous les génotypes confondus. Les résultats obtenus durant la phase collagène indiquent que les embryons immatures du matériel végétal testé ont une bonne capacité d'induction des cals. Par ailleurs, l'acquisition de la compétence à l'embryogenèse somatique dépend de trois facteurs :

- L'espèce *B. distachyon* : en moyenne les populations avec $2n=20$ (Bd114 et Bd115) et $2n = 30$ (Bd238 et Bd341) se prêtent le mieux à l'embryogenèse. Comme chez la majorité des céréales l'effet « génotype » reste donc un facteur primordial de la réussite de l'induction de l'embryogenèse somatique.
- L'association constituée par les composantes du milieu MS et des concentrations croissantes (1 mg/l, 2 mg/l et 4 mg/l) de l'auxine 2.4-D semble être la plus favorable pour la prolifération cellulaire et la formation des cals compacts riches en embryons somatiques. Cependant les régulateurs de croissance Dicamba et Picloran utilisés dans le présent travail, stimulent la callogenèse mais ils freinent l'induction de l'embryogenèse.
- L'interaction Génotype * Milieu, cette relation a montré des différences hautement significatives dans la plus part des cas ($p < 0.001$).

Le phénomène de la régénération rend compte de la capacité que possèdent les cellules à restructurer une plante entière. La réaction des cals face aux stimulants du milieu de régénération (G1) varie selon le type des cals formés, de façon que les cals embryogènes ont manifestés une bonne capacité de régénération caractérisé par l'apparition à leurs surfaces des structures verdâtres qui donnent par la suite des feuilles. Cependant, chez les populations Bd114 et Bd115 leur potentiel de formation des cals n'a pas pu s'exprimer correctement dans le milieu de régénération. En fait, les génotypes avec $2n=20$ ont

produit des cals embryogènes spectaculaires mais ces derniers n'arrivaient pas à manifester la réponse attendue une fois repiqués dans le milieu de régénération. Contrairement aux populations Bd238 et Bd 341 ($2n=30$) qui ont présenté la meilleure réponse à la culture *in vitro*.

Remerciements

Ce travail est réalisé grâce au financement accordé par le ministère des sciences et innovations (projet AGL2006-09018-C02-01-GL ; AGL-2009-10373), R.Hammami, remercie le ministère de l'éducation et des sciences pour la bourse accordée pour réaliser sa thèse doctorale (BES-2007-14361).

6. Références Bibliographiques

- Ahloowalia B.S., 1982.** Plant regeneration from callus culture in wheat. *Crop.Sci*, 22; 405-410.
- Ahmad A., Zhong H., Wang. &Sticklen M.B., 2002.**Shoot apical meristem. *In vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticumaestivum*).*In vitro*Cell Development. *Biol. Plant*, 38, 163-167
- Alok V., Jain S., Kathari S.L., Varshney A. &Jsin S., 1999.** Plant regeneration from mature embryos of 20 cultivars of wheat (*Triticumaestivum* L. and *T. durum* Desf.).*Cereal Res. Comm*, 27 (1-2), 163-170.
- Alves S.C., Worland B., Thole V., Snape J.W., Bevan M.W. & Vain P., 2009.** A protocol for Agrobacterium-mediated transformation of *Brachypodiumdistachyon* community standard line Bd21. *Nature protocols*, 4, 638-649
- Bablak P., Draper J., Davey M.D. & Lynch P.T., 1995.** Plant regeneration and micropropagation of *Brachypodiumdistachyon*. *Plant cell Tissue and Organ Culture*, 42, 97-107.
- Bahar S.O., Hernandez P., Filiz E.&Budak H., 2008.** *Brachypodium* genomics. *Journal of Plant Genomics*, doi: 10.1155/2008/536014.
- Barakat M.N., 1994.** Combining abilities of *in vitro* traits in wheat (*Triticumaestivum*) immature embryo culture.*Euphytica*, 76 (3), 169-175
- Barceló P.,Lazzeri P.A., Martin A. &Lôrz., 1991.** Competence of cereal leaf cellus. I. Patterns of proliferation and regeneration capability *in vitro* of the inflorescence sheath leaves of barely, wheat and tritordeum. *Plant Sci*, 77, 243-251
- Benkirane H., AbounjiChlyah S.A. &Chlyah H., 2000.**Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat plant. *Cell Tissue and Organ Culture*,61, 107-113.
- Bevan M.W., Garvin D.F. & Vogel J.P., 2010.***Brachypodiumdistachyon* genomics for sustainable food and fuel production.*Current Opinion in Biotechnology* 21, 211–217
- Brkljacic, J., Grotewold, E., Scholl, R., Mockler, T., Garvin, D. F., Vain, P., et al.,2011.** *Brachypodium* as a model for the grasses: today and the future. *Plant Physiol.* 157, 3–13. doi: 10.1104/pp.111.179531
- Brown C., Brooks F.J., Pearson D. & Mathias R.J., 1989.** Control of embryogenesis and organogenesis in immature wheat embryo callus using increased medium osmolarity and abscisic acid. *J. Plant Physiol*, 133 (6), 727-733
- Carman J.G. , Jefferson N.E. & Campbell., 1987b.** Induction of embryogenic*Triticumaestivum* L.calli. II. Quantification of organic addenda and other culture variable effects. *Plant Cell.Tiss. Org. Cult*, 10, 115-128
- Carman J.G., Jeferson N.& Campbell W.F., 1988.** Induction of embryogenic*Triticumaestivum* L. calli.Quantification of genotype and culture medium effects. *Plant Cell Tissue and Organ*
- Catalán P., Müller J., Hasterok R., Jenkins G., Mur LA., Langdon T, Betekhtin A, Siwinska D, Pimentel M, López-Alvarez D, 2012.** Evolution and taxonomic split of the model grass *Brachypodiumdistachyon*. *Ann. Bot.* 109 (2), 385-405.
- Chauhan H., Srinivas A.D.&Khurana P., 2007.** Comparative analysis of the differential regeneration response of various genotypes of *Triticumaestivum*, *Triticum durum* and *Triticumdicoccum*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 91, 191-199
- Chowdhury S.H., Kato K., Yamamoyo Y. & Hayashi k., 1991.** Varietal variation in plant regeneration capacity from immature embryo among common wheat cultivars.*Japan J. Breed*, 41 (3), 443-450
- Christiansen P., Andersen C.H., Didion T.,Folling M. & Nielson KK., 2005.** A rapid and efficient transformation protocol for the grass *Brachypodiumdistachyon*. *Plant Cell*, 23, 751-758.
- Dejan D.I., Miroslav Z., Mitic N., Radomirka N., Stephen R.K., Blazo L. &Gordana S.M., 2010.** Morphologic responses of embryo culture of wheat re-lated to environment culture conditions of the explant donor plant. *Sci. Agric (Piracicaba.Braz.)*, 67, n° 3.
- Draper J., Mur L.A.J., Jenkins G., Ghosh-Biswas G.C.Bablak P., Hasterok R. &Routledge A.P.M., 2001.** *Brachypodiumdistachyon*.A New model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiology*, 127, 1539-1555.
- Elwafa A.A.A. & Ismail A.E.S.A., 1999.**Callus induction and plant regeneration from cultures of immature embryos of spring wheat. *Aust. J. AgricSci*, 303, 13-23.

- Evans D.A., Sharp W.R. & Flick C.E., 1981.** Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. Thorpe T.A (ed). Tissue culture. Methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York, 45-113.
- Felföldi K. & Purnhauser L., 1992.** Induction of regenerating callus cultures from immature embryos of 44 wheat and 3 triticale cultivars. Cereal. Res. Comm, 20 (3/4), 273-277
- Filiz E., Ozdemir B.S., Tuna M. & Budak H., 2009.** Diploid *Brachypodium distachyon* of Turkey: Molecular and Morphologic Analysis. T. Yamada and G. Spangenberg (eds.), Molecular Breeding of Forage and Turf, doi: 10.1007/978-0-387-39144-9_7; © Spring Science + Business Media, LIC 2009.
- González J.M., Ferrer E. & Jouve N., 2001.** Influence of genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration from immature embryos of *Triticum turgidum* Desf. Cultivars. Plant breeding, 120 (6), 513-517.
- Halámková E., Vafera J. & Ohnoutková L., 2004.** Regeneration capacity of calli derived from immature embryos in spring barley cultivars. Biologia Plantarum, 48 (2), 313-316.
- Hammami R., Cuadrado A., Frierio E., Jouve N., Soler C. & González J.M., 2011a.** Callus induction and plant regeneration from immature embryos of *Brachypodium distachyon* with different chromosome number. Biologia Plantarum, 55 (4), 797-800
- Hanzel J.J., Miller J.P., Rinkman M.A.B. & Fendos E., 1985.** Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. Crop Sci, 25, 27-31
- He D.G., Tanner G. & Scott K.J., 1986.** Somatic embryogenesis and morphogenesis in callus derived from the epiblast of immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Sci, 57, 225-233
- Henry Y., Marcotte J.L. & DeBuyser J., 1994a.** Chromosomal location of genes controlling short-term and long-term somatic embryogenesis in wheat revealed by immature embryo culture of a neuploid lines. Theor. Appl. Genet, 89 (2/3), 344-350
- Hess J.R. & Carman J.G., 1998.** Embryogenic competence of immature wheat embryos: genotype, donor plant environment, and endogenous hormone levels. Crop Sci, 38, 249-253.
- Higging P. & Mathias R.J., 1987.** The effect of the 4 B chromosome of hexaploid wheat on the growth and regeneration of callus cultures. Theor. Appl. Genet, 74, 439-444
- Kellogg E.A., 2015.** *Brachypodium distachyon* as a Genetic Model System. Annual Review of Genetics, 49, 1-20 DOI: 10.1146/annurev-genet-112414-055135
- Kilinc M., 2004.** Effects of dicamba concentration on the embryo cultures of some bread wheat (*Triticum aestivum*). Genotypes. Biotechnol. And Biotechnol, 58-61 Eq. 18/2004/2.
- Komatsuda T., Enomoto. & Nakajimi K., 1989.** Genetics of callus proliferation and shoot differentiation in barley. J. Hered, 80, 345-350
- Li G.Y., Huang C.Y., Sui X.X., He Z.H., Sun Q.X. & Xia X.C., 2006.** Tissue culture efficiency of different explants from wheat. Journal of Triticeae Crop, 26, 21-25
- Maddock S.E., Lancaster V.A., Risiott R. & Franklin J., 1983.** Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). J. Exper. Bot, 34 (144), 915-926
- Mathias R.J. & Simpson E.S., 1986.** The interaction of genotype and culture medium on the tissue culture responses of wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell) callus. Plant Cell. Tissu. Org. Cult, 7, 31-37
- Murashige T. & Skoog F., 1962.** A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15(3), 473-497.
- Opanowicz M., Hands P.H., Betts D., Parker M.L., Toole G.A., Mills E.N.C, Doonan J.H. & Drea S., 2011.** Endosperm development in *Brachypodium distachyon*. Journal of Experimental Botany, 62(2), 735-748
- Ou G., Wang W.C. & Nguyen H.T., 1989.** Inheritance of somatic embryogenesis and organ regeneration from immature embryo cultures of winter wheat. Theor. Appl. Genet, 78 (1), 137-142
- Ozgen M., Turet M., Altinok S. & Sancak C., 1998.** Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Plant Cell Reports, 18, 331-335.
- Papenfus J.M. & Carman J.G., 1987.** Enhanced regeneration from wheat callus culture using dicamba and Kinetin. Crop Science, 27, 588-593.
- Qureshi J.A., Kartha K.K., Abrams S.R. & Steinhauer L., 1989.** Modulation of somatic embryogenesis in early and late stage embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) under the influence of abscisic acid and its analogs. Plant. Cell. Tiss. Org. Cult, 18 (1), 109-113
- Rikiishi K., Matsuura T., Maekawa M., Noda K. & Takeda K., 2003.** Barley lines allowing prominent high green shoot regeneration in cultures derived from immature embryos. Plant Breeding, 122, 105-111
- Rubio S., Jouve N. & Gonzalez J.M., 2005.** Biolistic and Agrobacterium-Mediated Transient Expression of UidA in Triticale Immature Embryos. S. Czech J. Genet. Plant Breed, 41, 2005 (Special Issue)
- Salse J., 2010.** *Brachypodium* Genome Initiative 2010. Genome Sequencing and Analysis of the Model grass *Brachypodium distachyon*. NATURE, 463(7282), 763-768

- Sener O., Can A., Arslan M. & Celiktas N., 2008.** Effects of genotype and picloran concentrations on callus induction and plant regeneration from immature inflorescence of spring Barley cultivars (*Hordeum Vulgare L.*), *Biotechnol*, 22, 915-920.
- Serhantová V., Ehrenbergerova J. & Ohnoutková L., 2004.** Callus induction and plant regeneration efficiency of spring barley cultivars registered in the Czech Republic. *Plant Soil Environment*, 50 (10), 456-462.
- Shafquat Y., Imtiaz A.K., Abullah K., Nighat S., Ghulam S.N. & Mohammad A.A., 2009.** *In vitro* plant regeneration in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Pak. J. Bot*, 41 (6), 1869-2876.
- Sikandar W.A., Israr K. & Iqbal M., 2007.** Optimization of *in vitro* conditions for callus induction, proliferation and regeneration in wheat (*Triticum aestivum L.*), *Biotechnology* 6 (3), 420-425.
- Varshney A.T., Kant V.K., Sharma A. & Kothari S.L., 1996.** High frequency plant regeneration from immature embryo cultures of *Triticum aestivum* and *Triticum. Durum*. *J. Cereal Res. Commun*, 24, 409-416
- Vasil I.K., 1994.** Molecular improvement of cereals. *Plant. Mol. Biol*, 25, 925-937.
- Zombori Z., Szécsény M. & Györgyey J., 2011.** Different approaches for Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Brachypodium distachyon*, a new model plant for temperate grasses. *Acta Biologica Szegediensis*, 55(1), 19