

THESE

Présentée à l'UFR Sciences Exactes et Naturelles

Pour obtenir le titre de

**Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne
Spécialité : Biologie et Physiologie Végétales**

par

Cédric JACQUARD

**« Embryogenèse pollinique chez l'orge (*Hordeum vulgare L.*) :
importance du prétraitement »**

Soutenue publiquement le 14 décembre 2007, devant le jury :

M^{me} K. BOUTILIER, Directeur de Recherches (Université, Wageningen)

Rapporteur

M^r J. De BUYSER, Maître de Conférences - HDR (Université, Orsay)

Rapporteur

M^{le} F. BAILLIEUL, Professeur (Université, Reims)

Présidente

M^r P. DEVAUX, Directeur de Recherches (Florimond Desprez, Lille)

Examinateur

M^{me} F. MAZEYRAT-GOURBEYRE, Maître de Conférences (Université, Reims)

Examinateur

M^r R.S. SANGWAN, Directeur de Recherches (CNRS, Amiens)

Examinateur

M^r C. CLÉMENT, Professeur (Université, Reims)

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier la région Champagne-Ardenne et l'URCA de m'avoir fait confiance et de m'avoir financé pendant ces quatre années.

Je remercie Monsieur le Professeur Christophe Clément de m'avoir accueilli en DEA puis en thèse au sein du laboratoire BPV, devenu le laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes. Merci pour l'encadrement et les collaborations qui m'ont permis d'acquérir une certaine autonomie, de rencontrer des personnes d'exception et de me former à diverses techniques. Merci aussi pour les relations amicales et le bon voisinage 'roizyen'.

Un grand merci à Pierre Devaux, directeur de recherche des établissements Florimond Desprez et correspondant à l'Académie d'Agriculture de France, pour son aide précieuse, ses critiques toujours justes et ses encouragements chaleureux. Je garderai des souvenirs inoubliables des schnitzel Viennois !

Je remercie Monsieur Rajbir Sangwan, directeur de recherche CNRS, pour sa collaboration et sa participation à la publication de mes premiers articles.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Benoît Schoefs. Même si les résultats ne seront pas présentés dans le manuscrit je tenais à te remercier pour l'encadrement, les conseils et l'accueil "à la Belge" pendant mon séjour Liégeois. Un grand merci également à tes parents.

Toujours pour la partie chlorophylle, merci à Monsieur le Professeur Fabrice Franck de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

J'exprime ma reconnaissance à Madame Kim Boutilier et Monsieur Jacques De Buyser d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit.

Je présente mes plus sincères remerciements à Fabienne et Flo pour leur aide, leurs corrections, leurs critiques, leur savoir-faire et leur soutien.

Merci à Messieurs les Professeurs Jacky Bernard et Alain Cozzone, ainsi que Manuel Rosa-Calatrava, de m'avoir accepté pour le Diplôme Universitaire d'Ouverture Professionnelle aux bio-industries, de l'Université Claude Bernard Lyon I en collaboration avec l'IPROB. Un clin d'oeil aux alcooliques de la promo, déjà Docteurs ou en devenir, avec qui j'ai passé d'excellents moments (Emilie, Véronique, Maryline et Michel de Strasbourg ainsi que Fabrice, Léa, Maxime, Stéphane et Stéphanie de Lyon). Surtout ne changez rien vous êtes extra, mais ça vous le saviez déjà !!!

Je profite de cette page pour remercier Monsieur Fétrot de l'ABG ainsi que l'école doctorale STS de Reims pour m'avoir permis de faire le Nouveau Chapitre de Thèse.

Je n'oublie pas Thierry Bidaut de la maison de champagne Mumm-Perrier Jouet qui m'a fait confiance toutes ces années pour les analyses vendanges. Désolé pour cette année, ma thèse ne m'a pas permis de répondre présent.

Les lignes passent et je n'ai toujours pas remercié les membres du labo que j'ai côtoyés durant ces années. Je ne souhaitais pas les nommer par peur d'oublier quelqu'un mais je me lance. Merci à Alexandra, Anne-Marie, Andréas, Anne-Lise, Annie, Bertrand, Bibiz, Bioseb, Cathy, Chantal, Eric, Essaid, Fanja, Flof, Gaël, Hélène, JLDI, Julie, Laurence, Lucile, Mélanie, Maryline, Nathalie, Patricia, PhiPhi, Sandra, les Sandrine, Sébastien, Sophie et Sylvain.

Mention spéciale à Anouck, DD et Gastounette qui ont contribué à la bonne ambiance dans le bureau ainsi qu'à Stéphan pour ton aide, ton écoute et tes cours sur le court.

Merci également à tous les stagiaires et collaborateurs de différents niveaux et nationalités qui ont plus ou moins participé à ce travail : Alexandre, Alina, Aurélien, Claire, Estelle, Farid, Kathia, Merche, Rafik, Rita, Sarah et Sergei.

Les pépettes (Dali et Nono), non je ne vous ai pas zappées. Je ne sais pas ce que j'aurais fais si vous n'aviez pas partagé le bureau, si vous aviez cessé de discuter constamment ou encore si vous n'aviez pas fait vos collections de tout et n'importe quoi sur Bob et Winnie. Un grand merci pour votre bonne humeur et votre amitié.

Pour en finir avec les membres du labo, je remercie Stéphane, alias "le Piot" ou "l'cho" selon l'époque. Tout a commencé en DEUG et nous voici tous les deux à soutenir notre thèse à quelques jours d'intervalle. Nous avons connus les mêmes galères et soucis, j'espère que nous pourrons connaître les mêmes joies et réussites.

Je remercie les membres de la "bière Aoueur" pour la bonne humeur qui les anime et les "footbioleurs" de m'avoir permis d'intégrer ce cercle de joueurs exceptionnels. Merci particulièrement à Hervé pour l'organisation des divers concours et compétitions et au Dude pour les bons moments partagés et les parties de console nocturnes.

Je ne peux faire une partie de remerciements sans penser à ma famille et principalement à mes parents et à ma soeur qui m'ont toujours soutenu et qui ont toujours cru en moi. J'espère avoir été à la hauteur de vos espérances. Je pense également très fort à ma grand-mère Jeanine qui, térrassée par une terrible maladie, n'aura pas pu assister à la conclusion de ce travail.

Pour conclure cette partie, un grand merci surtout à Carine, qui après m'avoir supporté pendant les cours, m'a soutenu durant toutes ces années de stress, et a accepté de devenir ma femme en décembre dernier. Merci pour ta patience et ton soutien, sans toi ce travail n'en serait pas là.

SOMMAIRE

Remerciements

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des publications et communications

1. Introduction	1
1.1. Le matériel végétal	2
1.1.1. Présentation botanique	2
1.1.2. Données économiques	2
1.1.3. Amélioration variétale	3
1.2. L'obtention d'haploïdes doublés	4
1.2.1. Présentation	4
1.2.2. Les techniques d'obtention d'HD	5
1.2.2.1. L'apomixie	5
1.2.2.2. Les croisements interspécifiques	5
1.2.2.3. La gynogenèse	5
1.2.2.4. L'embryogenèse pollinique	6
1.3. L'embryogenèse pollinique	6
1.3.1. Historique et problématique	6
1.3.2. Embryogenèse pollinique et albinisme	7
1.3.3. Les différentes étapes	8
1.3.3.1. La phase de prétraitement	8
1.3.3.2. La phase de culture	8
1.3.3.3. La phase de régénération	9
1.3.3.4. L'étape de diploïdisation	9

1.3.4. Les facteurs influençant l'embryogenèse pollinique chez l'orge	9
Publication I	12
1.3.5. Importance du stress dans l'induction de l'embryogenèse pollinique	22
1.3.5.1. Stress physiques	22
1.3.5.1.1. Choc par le froid	22
1.3.5.1.2. Choc par le chaud	23
1.3.5.2. Stress physiologiques	23
1.3.5.3. Stress chimiques	23
1.3.5.4. Autres stress	24
1.3.5.5. Le sulfate de cuivre	24
1.4. Stress et mécanismes de défense	25
1.4.1. Le stress chez les plantes	25
1.4.2. Transduction et réponses aux stress	26
1.4.2.1. Le calcium	27
1.4.2.2. L'acide abscissique	28
1.4.2.3. L'acide jasmonique	30
1.4.2.4. L'acide salicylique	31
1.4.2.5. L'éthylène	32
1.4.2.6. Les espèces activées de l'oxygène	33
1.4.2.7. Défenses et protéines PR	35
1.4.2.7.1. Gènes de défense	35
1.4.2.7.2. Cas particulier des protéines PR	36
1.4.3. Embryogenèse pollinique et gènes de défense	37
Objectifs du doctorat	40
2. Résultats - Discussion	44
Publication II	45
Publication III	52
Publication IV	69

Publication V	78
3. Conclusions	95
3.1. Impact de différents paramètres sur la culture d'anthères	96
3.1.1. Effet du sulfate de cuivre	96
3.1.2. Effet de la saison	98
3.1.3. Effet de la position de l'épi sur le plateau de tallage	98
3.2. Suivi de divers marqueurs de défense	99
3.2.1. Burst oxydatif	100
3.2.2. Gènes de réponse aux stress	100
4. Perspectives	102
5. Bibliographie	106
6. Annexes	
6.1. <i>Curriculum vitae</i>	
6.2. Nouveau Chapitre de Thèse	
6.3. Publication VI	

Résumé

L'embryogenèse pollinique est une technique d'amélioration des espèces qui permet d'obtenir des plantes haploïdes doublées. Les microspores initialement programmées pour former des grains de pollen sont réorientées afin de produire des plantes haploïdes. Cette technique intéressante, car elle permet de diminuer le temps et le coût de la sélection classique mais également d'étudier les mécanismes impliqués dans la formation de l'embryon, voit son utilisation réduite chez les céréales à cause de la régénération de plantes albinos. Nous avons organisé nos recherches autour de deux axes. Premièrement nous voulions optimiser le protocole afin d'améliorer les rendements en plantules chlorophylliennes chez des cultivars récalcitrants. Deuxièmement, nous avons cherché à identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la réorientation de la microspore en nous focalisant sur les défenses.

Notre travail a porté sur la culture d'anthères chez l'orge (*Hordeum vulgare L.*). Afin d'améliorer le protocole, nous avons utilisé le cv. d'hiver Igri régénérant majoritairement des plantules chlorophylliennes et cinq cvs. de printemps produisant exclusivement des plantules albinos. L'apport de sulfate de cuivre dans les milieux de prétraitement et de culture a permis d'augmenter le nombre d'anthères formant des embryons, le nombre de plantules régénérées et surtout le pourcentage de plantules chlorophylliennes régénérées chez l'ensemble des cvs. testés. Une concentration de 20 μ M de sulfate de cuivre conduit à la régénération de plantules chlorophylliennes chez les cvs. de printemps Douchka et Prisma qui ne régénéraient que des plantules albinos auparavant.

L'étude de la saison à laquelle les plantes mères sont cultivées a fait apparaître que les rendements de la culture d'anthères étaient meilleurs pendant les mois les plus longs de l'année chez les cvs Igri et Cork. Le nombre de plantules régénérées est deux fois plus important entre Avril et Août que durant le reste de l'année. De même le pourcentage de plantules chlorophylliennes régénérées est augmenté de près de 10% chez le cv. d'hiver Igri entre les mois de Mai à Septembre en comparaison avec la moyenne annuelle.

Nous avons également constaté que les résultats obtenus dépendent de la position de l'épi sur le plateau de tallage. Ainsi le pourcentage de réponse des anthères et le nombre de plantules régénérées diminuent de plus de moitié pour les cvs. Igri et Cork entre le brin maître et la quatrième talle. Par contre le pourcentage de plantules chlorophylliennes augmente de 16% chez Igri et de 1800% chez Cork lorsque les anthères sont prélevées sur les épis issus des deuxièmes talles.

Le suivi de la production d' O_2^- ainsi que le suivi d'expression de différents gènes de réponse aux stress nous a permis de mettre en évidence l'activation des défenses dans l'anthère au cours du prétraitement. Ainsi nous avons pu constater l'apparition d'un burst oxydatif dès 48 heures après la mise en prétraitement des anthères. De même nous avons observé l'induction d'expression des gènes codant des protéines PR (PR1, PR2, PR10, chitinase, barwin) des protéines impliquées dans la détoxification des EAO (Oxalate Oxidase et GST), la PAL ainsi que la lipoxygénase et l'AOS. Ces résultats obtenus pour les cvs. Igri et Cork indiquent que le stress appliqué induit une mise en place des mécanismes de défense dans les anthères. L'ajout de sulfate de cuivre dans le milieu de prétraitement induit l'expression des différents gènes de façon plus progressive et souvent moins importante. Ce résultat suggère que la régénération de plantules albinos pourrait être liée à la réponse de l'anthère suite à la perception du stress appliqué.

Mots-clés : Albinisme, Culture d'anthères, Effet saison, Gènes de réponse aux stress, Orge (*Hordeum vulgare L.*), Plateau de tallage, Sulfate de cuivre

Abstract

Abstract

Abstract

The production of doubled haploid through pollen embryogenesis represents a modern tool for the improvement of cultivated species enabling plant breeders to produce homozygous lines in a few months. Pollen embryogenesis consists in the regeneration of haploid plantlets from microspores, which are initially destined to develop into pollen grains. This technique allows to decrease the time and the cost of classical selection, and to study the mechanisms involved in the embryo formation. Albinism restrains the use of pollen embryogenesis in cereals. This study is based on applied and fundamental aspects in order to 1- optimize the anther culture protocol and to improve green plantlet regeneration in recalcitrant cvs. and 2- identify molecular mechanisms involved in the switch of microspore, especially defenses.

In order to optimize the protocole of anther culture in barley (*Hordeum vulgare* L.) we used the winter cv. Igri which regenerates chlorophyllous plantlets at 90%, and 5 spring cvs. giving rise mostly to albino plantlets. The copper sulphate addition in pretreatment and culture media improved the anthers response, the quantity of regenerated plantlets and the percentage of regenerated chlorophyllous plantlets, with all tested cvs. The two spring cvs. Douchka and Prisma produced green plantlets with 20 μ M of copper sulphate, when they provided only albino plantlet with traditionnal media.

We followed the effects of donor plant annual cycle in yields of the anther culture. This study showed that spring and summer are the best seasons for pollen embryogenesis in both the winter cv. Igri and the spring cv. Cork. Indeed, the number of regenerated plants is twice better between April to August in comparison with the other months. Likewise, in the winter cv. Igri, the percentage of green plants was 10% better between May to September relatively to annual average.

Finally, we noticed that results also depended on spike position on the tillering plate. The anthers response percentage and the number of regenerated plants decreased when the donor spike was far from the main shoot. We recorded a number of responding anthers and a number of regenerated plantlets decreased twice between the main shoot and the fourth tiller. However, when anthers were collected from the second tiller, we noted an increase of 16% and 1800% in proportion of green plants, in the cv. Igri and the cv. Cork respectively.

Looking at anther stress responses during pretreatment, we noticed that defence mechanisms were induced during the anther pretreatment, as revealed by an oxidative burst. Also we have shown that the genes encoding Pathogenesis Related protein (*PR1*, *PR2*, *PR10*, *CHITINASE*, *BARWIN*), proteins involved in ROS scavenging (*OXALATE OXIDASE*, *GST*), the Phenylalanine Amonia Lyase, the Lipoxygenase and the Allene Oxide Synthase were induced by the stressing conditions of the pretreatment. These results indicate that the pretreatment induces defence mechanisms in anthers. Copper sulphate addition in the media induced more progressive and less important induction of gene expression.

Keywords : Albinism, Anther culture, Barley (*Hordeum vulgare* L.), Copper sulphate, Seasonal variation, Stress response genes, Tillering effect

Liste des abréviations

- AAB : acide abscissique
AAO : aldéhyde abscissique oxydase
AB : acide benzoïque
ACC : acide 1-aminocyclopropane-1-caboxylique
ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messager
AGP : "arabinogalactan proteins"
AJ : acide jasmonique
AOC : allène oxyde cyclase
AOS : allène oxyde synthase
APX : ascorbate peroxydase
AS : acide salicylique
BA : acide benzoïque
BBM : Baby boom
 Ca^{2+} : calcium
CAT : catalase
CDPKs : " Ca^{2+} -dependent protein kinases"
COR : "cold-regulated"
Cv(s). : cultivars
EAO : espèces activées de l'oxygène
ET : éthylène
FAO : food and agriculture organization of the United Nations
FI : facteur d'impact
FPP : farnésyl pyro-phosphate
GPX : glutathion peroxydase
GST : glutathion-S-transférase
H. : *Hordeum*
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HD : haploïde doublé
LEA : "late embryogenesis abundant"
Lox : lipoxygénase
MAPK : "mitogen-activated protein Kinase"
MAPKK : "mitogen-activated protein Kinase Kinase"

Liste des Abréviations

MAPKKK : "mitogen-activated protein Kinase Kinase Kinase"

MJ : méthyl-jasmonate

NCED : 9'-cis-époxycaroténoïde dioxygénase

PAL : phénylalanine amonia lyase

PEG : polyéthylène glycol

PR : "pathogenesis related"

SOD : superoxyde dismutase

UV : ultra-violet

ZEP : zéaxanthine époxydase

Liste des publications et communications

Publications

Jacquard C, Nollin F, Hécart C, Zuka A, Graudal D, Rashal I, Sangwan RS, Devaux P, Mazeyrat-Gourbeyre F and Clément C. Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. Soumise à Plant Biotechnology Journal

Jacquard C, Mazeyrat-Gourbeyre F, Devaux P, Baillieul F, Clément C. Microspore embryogenesis in barley: anther pretreatment stimulates plant defence gene expression. En préparation

Varnier AL, **Jacquard C**, Clément C (2008). Programmed cell death and microspore embryogenesis. In : A. Touraev, BP. Forster and S. Mohan Jain. (éds).Advances in haploid production in higher plants. Kluwer Academic Publishers. (Sous presse)

Jacquard C, Asakavičiūtė R, Hamalian AM, Sangwan RS, Devaux P, Clément C (2006). Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis and albinism. Plant Cell Reports 25 : 375-381.

Jacquard C, Wojnarowicz G, Clément C (2003). Anther culture in barley. In : M. Maluszynski, KJ. Kasha, BP. Forster and I. Szarejko (éds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers : 21-27

Wojnarowicz G, **Jacquard C**, Devaux P, Sangwan RS, Clément C (2002). Influence of copper sulfate on anther culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Science 162 : 843-847

Communications

Jacquard C, Asakavičiūtė R, Sangwan RS, Devaux P, Clément C (2006). Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis. Haploid in higher plants III, Vienne (Autriche). Poster.

Jacquard C, Mazeyrat-Gourbeyre F, Devaux P, Baillieul F, Clément C (2006). Plant defence mechanisms are triggered in the anther during the pretreatment process. Haploid in higher plants III, Vienne (Autriche). Communication orale.

Jacquard C, Sangwan RS, Devaux P, Clément C (2005). Microspore embryogenesis and albinism in barley. Meeting COST 851, Stara Lesna (Slovaquie). Communication orale.

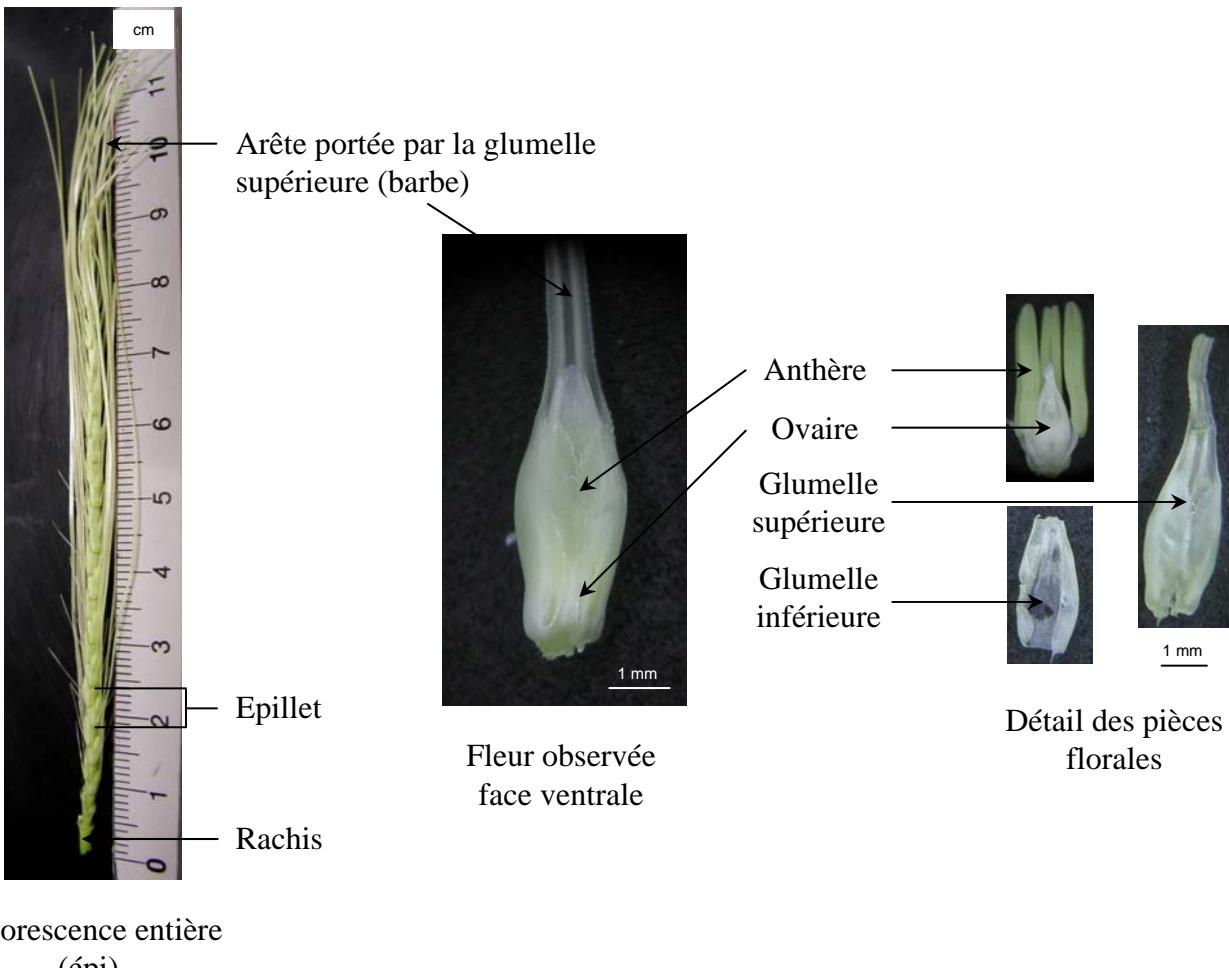
Jacquard C, Schoefs B, Clément C (2004). Variations around a theme (proto)chlorophyll (ide) fluorescence. Symposium on chlorophyll fluorescence, Ceske Budejovice (République Tchèque). Communication orale.

Jacquard C, Schoefs B, Clément C (2003). Putative origin of albinism in androgenetic plantlets in barley (*Hordeum vulgare* L.). Congress of the European Society for Photobiology, Vienne (Autriche). Communication orale.

Jacquard C, Wojnarowicz G, Devaux P, Sangwan RS, Clément C (2002). The effect of copper on anther culture in various cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). Meeting COST 851, Budapest (Hongrie). Communication orale.

Wojnarowicz G, **Jacquard C**, Devaux P, Sangwan RS, Ait Barka E et Clément C (2002). Beneficial effect of copper on anther culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). VIII^{èmes} Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies, Amélioration des Plantes et Sécurité Alimentaire "Biotechnologies Végétales : valorisations pour une agriculture durable". Marrakech (Maroc). Poster.

1. Introduction



Inflorescence entière
(épi)

Figure 1 : Inflorescence, fleur et pièces florales d'orge (*Hordeum vulgare* L. cv. Cork)

Tableau 1 : Production mondiale en 2005 (source FAOSTAT 2006)

Céréales	Production (en Mt)	Rang mondial
Mais	694	1
Blé	628	2
Riz	618	3
Orge	137	4
Sorgho	58	5
Millet	27	6
Avoine	23	7
Autres	42	
Total	2227	

Mt : millions de tonnes

1.1. Le matériel végétal

1.1.1. Présentation botanique

L'orge commune (*Hordeum vulgare* L.) est une céréale à paille. C'est une monocotylédone qui appartient à la famille des Poacées et à la sous-famille des Festucoïdées. Le genre *Hordeum*, auquel l'orge cultivée appartient, se caractérise par des épillets uniflores groupés par trois, avec un central flanqué de deux latéraux, disposés alternativement à chaque étage du rachis (Von Bothmer et Jacobsen 1985). Les épillets latéraux peuvent se développer normalement et ainsi conférer la morphologie orge à "6 rangs" ou être stériles, réduits à des vestiges et caractériser les orges à "2 ou 4 rangs" (Von Bothmer *et al.* 1995). L'espèce *H. vulgare* L. est diploïde et possède sept paires de chromosomes (Thomas et Pickering 1988). Elle peut être annuelle ou vivace. Parmi les variétés cultivées il existe des orges d'hiver et des orges de printemps. Les orges d'hiver nécessitent d'être vernalisées pour fleurir, c'est à dire qu'une exposition au froid et une photopériode plus courte sont indispensables pour induire leur floraison. Ces variétés sont donc semées en début d'hiver. Les variétés de printemps quant à elles, ne résistent pas au froid et ne nécessitent pas de vernalisation, elles sont par conséquent semées au printemps.

La fleur d'orge est constituée d'un verticille de trois anthères, chacune constituée d'une anthère fixée au filet, et d'un ovaire surmonté de deux stigmates plumeux (Figure 1) (Jestin 1992 ; Von Bothmer *et al.* 1995). L'anthère représente l'organe reproducteur mâle de la fleur qui produit les grains de pollen. La floraison débute vers le tiers supérieur de l'épi puis s'étend à l'épi entier. L'orge est le plus souvent autogame, c'est à dire que les anthères émettent une grande partie de leur pollen dans leur fleur d'origine, induisant une autopollinisation (Nuutila *et al.* 2000a).

1.1.2. Données économiques

L'orge est la quatrième céréale cultivée au rang mondial (Tableau 1) après le maïs, le blé et le riz (FAOSTAT 2006). L'espèce *H. vulgare* L. possède une forte capacité d'adaptation à des conditions extrêmes, grâce à l'existence de variétés avec un cycle de culture court (100 à 120 jours) et à sa résistance à la sécheresse et à la salinité. Ainsi l'orge est cultivée du niveau de la mer (bassin méditerranéen) à plus de 4500 mètres d'altitude dans la chaîne montagneuse himalayenne (Von Bothmer *et al.* 1995).

Tableau 2 : Classement mondial des pays producteurs d'orge en 2005
 (source FAOSTAT 2006)

Pays	Production (en Mt)	Rang mondial
Russie	18	1
Canada	13	2
Allemagne	12,9	3
Ukraine	11	4
France	10,9	5
Espagne	10,5	6

Mt : millions de tonnes

Tableau 3 : Productions agricoles végétales en France en 2005 (source FAOSTAT 2006)

Produits	Production (en Mt)	Rang
Blé	40	1
Betterave à sucre	29	2
Mais	16	3
Orge	11	4

Mt : millions de tonnes

En 2005, la France était le cinquième producteur mondial d'orge (Tableau 2) après la Russie, le Canada, l'Allemagne et l'Ukraine (FAOSTAT 2006) et l'orge représentait la quatrième culture française (Tableau 3) après le blé, la betterave à sucre et le maïs (FAOSTAT 2006). Le département de la Marne était, en 2006, le premier département français pour la production d'orge.

Les critères de sélection des orges dépendent du domaine d'application. En effet, le grain d'orge est utilisé en alimentation animale, principalement pour les élevages porcins. Il est considéré comme l'un des meilleurs aliments pour la qualité qu'il apporte à la viande mais aussi pour ses valeurs diététiques (Becart *et al.* 2000 ; Fischbeck 2002). L'orge peut également être cultivée pour l'apport de nourriture sous forme d'ensilage (plante entière) ou générer des pâtures aux animaux dans les régions sèches du Proche-Orient (Briggs 1978 ; Fischbeck 2002). Même si l'utilisation de l'orge en alimentation humaine est de moins en moins importante, elle est encore présente pour la fabrication de pains, soupes et gruaux (Fischbeck 2002). La principale utilisation de l'orge reste pour l'industrie brassicole et la fabrication de la bière et du whisky (Briggs 1978 ; Fischbeck 2002). Les critères de qualité nécessaires à ces utilisations sont partiellement conditionnés par le génotype (Jestin 1992 ; Fischbeck 2002).

L'intérêt de la sélection de l'orge est donc évident. Classiquement, le sélectionneur puise dans la grande variabilité génétique de l'orge afin d'améliorer et créer de nouveaux cvs. présentant des caractères intéressants. Les efforts d'amélioration génétique portent principalement sur la qualité des protéines (Jestin 1992), notamment la teneur en lysine, acide aminé limitant des céréales mais acide aminé essentiel pour l'homme (Bang-Olson *et al.* 1987). La qualité brassicole est un critère important de sélection (Fischbeck 2002) car l'aptitude du grain à germer rapidement et à fournir un malt avec un albumen bien dégradé est importante pour optimiser la fermentation (Mac Gregor 1996). La teneur en amidon, source de sucres fermentescibles en alcool, est un autre critère essentiel à la bonne fabrication de bière ou de whisky.

1.1.3. Amélioration variétale

L'amélioration des plantes peut se faire par la sélection généalogique qui permet d'éliminer efficacement les génotypes sans intérêt. Cette méthode est cependant problématique car elle oblige à réaliser de nombreux croisements destinés à fixer les caractères d'intérêt. Certains descendants peuvent exprimer des gènes de façon transitoire à cause des phénomènes de dominance et récessivité, ainsi que des interactions entre allèles et

gènes différents. La descendance doit être examinée et étudiée pour ne retenir que les plantes les plus intéressantes. Un long travail d'épurations successives est donc nécessaire avant d'obtenir une nouvelle variété (Kahn 1997).

La technologie des "haploïdes doublés" (HD), permet de diminuer la durée des cycles de sélection, en diminuant le temps nécessaire à la fixation des caractères et à la multiplication des génotypes intéressants. Elle permet l'obtention de plantes homozygotes pour l'ensemble du génome sans introduction de matériel génétique exogène.

1.2. L'obtention d'haploïdes doublés

1.2.1. Présentation

Un HD est défini comme étant une plante possédant un stock chromosomique hérité d'une seule cellule haploïde (Kimber et Riley 1963). Le doublement du nombre de chromosomes permet l'obtention de plantes diploïdes et homozygotes pour l'ensemble de leur génome. L'utilisation d'HD a de nombreuses applications aujourd'hui, notamment chez les céréales (Pickering et Devaux 1992 ; Devaux *et al.* 1996). Les plantes obtenues sont homozygotes, donc leur génotype et leur phénotype se confondent. Les plantes haploïdes peuvent exprimer des caractères récessifs, dont l'expression est habituellement masquée par l'hétérozygotie, et présenter de nouveaux phénotypes (Horlow *et al.* 1992 ; Brar et Khush 1994 ; Kicherer *et al.* 2000). De plus, les caractères d'intérêt sont fixés dès la première génération puisque les plantes HD présentent un génome homozygote pour tous les caractères (Powell *et al.* 1992).

L'avantage le plus important de l'haplodiploïdisation est le gain de temps (Touraev *et al.* 2001 ; Thomas *et al.* 2003). Chez les céréales, la production de semences à partir d'haploïdes doublés est possible en quelques mois (Pickering et Devaux 1992), alors que les méthodes de sélections généalogiques classiques nécessitent sept à huit ans de sélection pour disposer d'une lignée pure homozygote.

L'haplodiploïdisation est donc une technique rapide de production de lignées pures, réalisée en une seule étape au lieu de plusieurs générations (Thomas *et al.* 2003). Elle facilite la sélection et permet d'observer l'expression aussi bien des gènes récessifs que des gènes dominants.

1.2.2. Les techniques d'obtention d'HD

1.2.2.1. L'apomixie

L'apomixie est un mode de reproduction de certaines plantes au cours duquel la mégasporèse se développe sans fécondation et produit une plantule haploïde parfaitement viable (Grossniklaus *et al.* 2001). Ce phénomène intervient spontanément chez quelques espèces comme le maïs, le pommier ou le citronnier (Koltunow 1993 ; Grossniklaus *et al.* 2001 ; Koltunow et Grossniklaus 2003). Cette technique conduit à l'amplification d'un individu particulièrement intéressant, sans reproduction sexuée et donc sans brassage génétique puisque seul le génome maternel participe à la formation des nouvelles plantules. La faible fréquence d'apparition d'embryons par cette technique la rend pour le moment inexploitable pour des programmes industriels de sélection (Koltunow et Grossniklaus 2003).

1.2.2.2. Les croisements interspécifiques

Cette méthode est basée sur le sauvetage par culture *in vitro* d'embryons immatures issus de croisements interspécifiques. Chez l'orge, le croisement est réalisé entre *H. bulbosum*, qui sert de parent mâle et *H. vulgare* L., qui sert de parent femelle (Devaux 2003). Après fécondation, les chromosomes de *H. bulbosum* sont éliminés au cours du développement embryonnaire, ce qui conduit à l'obtention d'une plante haploïde (Kasha et Kao 1970). Le doublement chromosomal permet l'obtention de plantes HD présentant tous les caractères d'*H. vulgare* L. (Kasha et Kao 1970). Cette technique est couramment utilisée pour l'amélioration et la sélection variétale des céréales (Devaux 2003).

1.2.2.3. La gynogenèse

La gynogenèse correspond à la culture *in vitro* de gamétophytes femelles (Huang *et al.* 1982 ; Castillo et Cistué 1993). Des embryons haploïdes se forment à partir des cellules du sac embryonnaire. Cette technique permet l'obtention de plantes HD stables génétiquement et se trouve largement utilisée pour l'amélioration de l'oignon (Jakse et Bohanec 2003 ; Martinez 2003) ou encore de la betterave (Wremerth Weich et Levall 2003). Le principal inconvénient est le nombre important d'espèces récalcitrantes à cette technique. Chez les céréales, notamment l'orge, les ovaires sont difficilement accessibles et le nombre de plantes HD

obtenues reste très faible (Castillo et Cistué 1993). L'utilisation de la gynogenèse est donc limitée pour ces espèces.

1.2.2.4. L'embryogenèse pollinique

Cette technique consiste à régénérer *in vitro* des plantes entières haploïdes à partir de microspores, cellules initialement destinées à produire des grains de pollen. Le principe consiste à cultiver *in vitro* des microspores, soit à partir de microspores isolées (Davies 2003), soit à partir de culture d'anthères (Jacquard *et al.* 2003). Le nombre important et l'accessibilité aisée des microspores (Touraev *et al.* 2001) facilitent l'utilisation et le bon rendement de cette technique qui a permis la production d'un grand nombre de lignées actuellement commercialisées (Devaux *et al.* 1996 ; Maluszynski *et al.* 1996).

Les plantes néoformées proviennent d'une cellule unique (Kimber et Riley 1963), la microspore, isolée naturellement et facilement accessible à l'expérimentation. Des gènes d'intérêts peuvent être introduits dans ces cellules avant de les mettre en culture pour régénération. Les microspores transformées génétiquement, acquièrent artificiellement un caractère d'intérêt (Kasha *et al.* 1995 ; Yao *et al.* 1997 ; Carlson *et al.* 2001 ; Shim et Kasha 2003) et des plantes transformées homozygotes sans chimère peuvent donc être obtenues.

Tous ces avantages ont fait de l'embryogenèse pollinique la technique de production de plantes HD la plus utilisée chez l'orge (Pickering et Devaux 1992 ; Jähne et Lörz 1995).

1.3. L'embryogenèse pollinique

1.3.1. Historique et problématique

En 1921, Bergner était le premier à identifier une plante haploïde chez *Datura stramonium* L. (Blakeslee *et al.* 1922 ; Riley 1974 ; Kasha et Maluszynski 2003). Les premiers essais d'amélioration des plantes par l'utilisation des HD remontent à 1962, avec la production de plants de maïs HD par apomixie (Chase 1963). Les premières plantules dérivées de microspores ont été obtenues en 1964 chez *Datura innoxia* Mill. (Guha et Maheshwari 1964). Ces travaux représentent le point de départ de l'utilisation de l'embryogenèse pollinique chez une multitude d'espèces (Kasha et Maluszynski 2003). En

1973, Nitsch et Norreel améliorent la technique en régénérant des plantes à partir de cultures de microspores isolées (Nitsch et Norreel 1973).

L'embryogenèse pollinique a permis l'amélioration et la création de nombreuses lignées cultivées (Devaux *et al.* 1996 ; Maluszynski *et al.* 1996 ; Szarejko 2003 ; Devaux et Pickering 2005). Cependant, la réussite de cette technique chez les céréales est influencée par des facteurs génétiques qui modulent la fréquence de formation des embryons, la régénération de plantes et l'obtention de plantules chlorophylliennes (Knudsen *et al.* 1989 ; Larsen *et al.* 1991). Certaines espèces et variétés sont en effet récalcitrantes à cette technique (Kimber et Riley 1963 ; Tsay *et al.* 1990 ; Liang *et al.* 1997 ; Wang *et al.* 2000) et la fréquence d'apparition des plantes haploïdes est souvent faible. En outre, la culture d'anthères ou de microspores chez les céréales présente un frein supplémentaire à son utilisation car elle engendre la régénération d'un certain pourcentage de plantules albinos.

1.3.2. Embryogenèse pollinique et albinisme

Chez les céréales, le pourcentage de plantules chlorophylliennes obtenues par culture d'anthères est souvent faible, pouvant même être nul chez certains génotypes d'orge, de blé, de riz ou de seigle (Wenzel *et al.* 1977 ; Heberle-Bors 1985 ; Marsolais *et al.* 1985 ; Chu *et al.* 1990 ; Jähne et Lörz 1995 ; Xie *et al.* 1995 ; Caredda et Clément 1999 ; Touraev *et al.* 2001). La culture de microspores isolées conduit à un plus grand pourcentage de plantules chlorophylliennes (Cistué *et al.* 1995 ; Luckett et Smithard 1995). La différence entre la culture de microspores et la culture d'anthères s'explique par la présence des enveloppes staminale. Elles jouent le rôle de filtre ou de barrière pour les nutriments du milieu parvenant aux microspores (Hoekstra *et al.* 1992 ; Ziauddin *et al.* 1992 ; Pulido *et al.* 2005).

Les cvs. d'orges de printemps Madras, Prisma, Douchka, Scarlet et Cork sont particulièrement sensibles à ce phénomène : le taux d'albinos régénérés est proche de 100 % (Caredda *et al.* 2000), contrairement au cv. d'hiver Igri qui régénère près de 90 % de plantules vertes (Jähne *et al.* 1991 ; Kao *et al.* 1991 ; Caredda et Clément 1999 ; Wojnarowicz *et al.* 2002 ; Wojnarowicz *et al.* 2004). Le cv. de printemps Cork possède les mêmes paramètres de culture (pourcentage de réponse, structures embryoïdes, plantules régénérées) que le cv. d'hiver Igri. Un seul critère oppose ces deux variétés, le pourcentage de plantules chlorophylliennes régénérées est seulement de 1% pour le cv. Cork et près de 90% pour le cv. Igri (Caredda et Clément 1999). Ces deux cvs. sont donc utilisés comme modèles pour l'étude du phénomène d'albinisme lors de la culture d'anthères chez l'orge (Caredda *et al.* 2000)

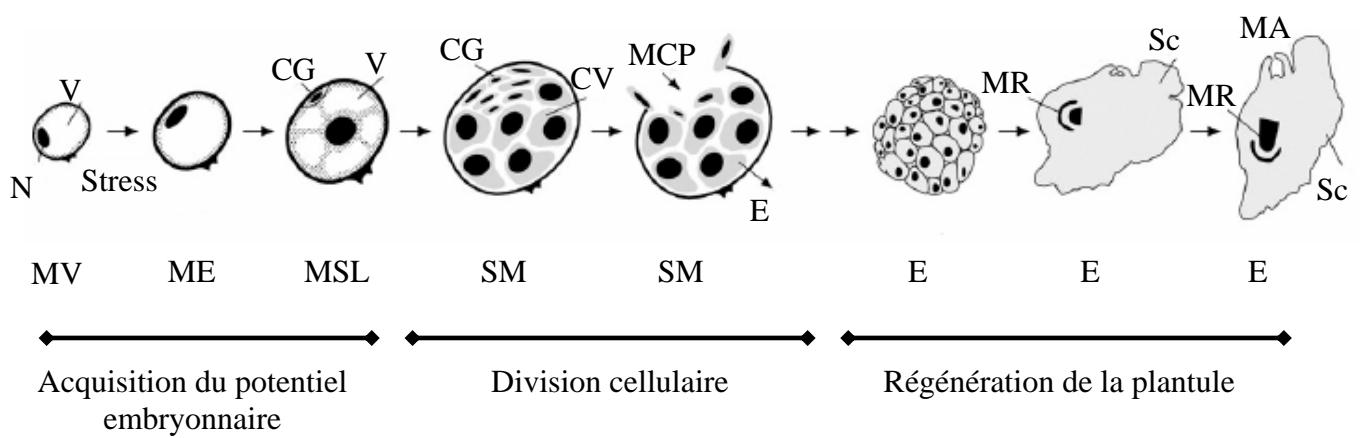


Figure 2 : Aspects cellulaires de l'embryogenèse pollinique chez l'orge (d'après Maraschin et al. 2005a).

CG : cellule génératrice - CV : cellule végétative - E : embryon - MA : méristème apical - MCP : mort cellulaire programmée - ME : microspore "enlarged" - MR : méristème racinaire
 MSL : microspore " star-like " - MV : microspore vacuolisée - N : noyau - Sc : scutellum -
 SM : structure multicellulaire - V : vacuole

1.3.3. Les différentes étapes

L'embryogenèse pollinique se décompose en quatre étapes.

1.3.3.1. La phase de prétraitement

Cette première étape consiste en l'acquisition du potentiel embryonnaire de la microspore (Figure 2), obtenu par l'application d'un stress permettant la répression du programme gamétophytique et menant à la dédifférenciation cellulaire et la formation d'un embryon (Maraschin *et al.* 2005a). Ce changement de programme peut avoir lieu grâce à la totipotence des cellules végétales et nécessite l'application d'un stress (Touraev *et al.* 1996a). Le prétraitement engendre un grossissement de la microspore, qualifiée alors d'"enlarged". Ce changement morphologique coïncide avec le début de la réorientation du programme de la microspore chez de nombreuses espèces (Hoekstra *et al.* 1992 ; Touraev *et al.* 1996a ; Touraev *et al.* 1996b ; Maraschin *et al.* 2005a). La microspore réorientée présente alors un aspect caractéristique. Son noyau est en position centrale, entouré du cytoplasme fragmenté. La microspore prend alors l'aspect d'une étoile, d'où l'appellation "star-like" (Touraev *et al.* 1996a ; Maraschin *et al.* 2005a). Ce changement morphologique observé chez le blé (Touraev *et al.* 1996b), l'orge (Maraschin *et al.* 2005a), le pommier (Höfer *et al.* 1999), le tabac (Touraev *et al.* 1996a) ou le riz (Raina et Irfan 1998), est considéré comme étant le marqueur de la réorientation de la microspore (Shariatpanahi *et al.* 2006a). Ceci est confirmé par le fait que ce stade, couplé à une division cellulaire symétrique, est indispensable à l'initiation du développement embryonnaire des microspores isolées (Indrianto *et al.* 2001).

1.3.3.2. La phase de culture

La seconde étape correspond à la mise en œuvre du nouveau programme de développement adopté par la microspore au cours du prétraitement. Elle consiste en la division cellulaire (Figure 2) menant à la formation de structures multicellulaires contenues dans l'exine. Les anthères sont transférées sur un milieu de culture, permettant aux microspores de subir une division symétrique (Mlodzianowski et Idzikowska 1978 ; Sunderland et Huang 1985) et de former des structures embryoïdes (embryogenèse directe) ou des cals (embryogenèse indirecte) au cours de la phase de culture. Les embryons sont ensuite

Tableau 4 : Influence du génotype sur l'embryogenèse pollinique chez diverses céréales.

Spèces / cultivars	Culture	pcreg/100 ant	preg/100 ant	% pcreg	références
<i>Avena sativa</i>	CA	≤ 12	≤ 13	≤ 92,3	Rines <i>et al.</i> 1997, Kiviharju <i>et al.</i> 2000
<i>Hordeum vulgare</i>					
Tweed	CA	192,7	341,0	56,5	Finnie <i>et al.</i> 1989
Tyne	CA	<28,0	56,0	<50	
Princesse	CA	0,0	20,0	0,0	Jähne <i>et al.</i> 1991
Baronese	CA	0,0	20,0	0,0	
Bruce	CA	19,0	29,0	65,5	Caï <i>et al.</i> 1992
Klages	CA	<7,5	15,0	<50	
Chernigovski	CM	62,8	86,0	73,0	Tiwari et Rahimbaev 1992
Dnieprovski	CM	16,9	19,0	88,9	
Igri	CA	379,6	420,0	90,4	Li <i>et al.</i> 1993
Atias	CA	60,0	120,0	50,0	
Igri	CA	1425,0	1500,0	95,0	Cistué <i>et al.</i> 1994
Albacette	CA	50,0	100,0	50,0	
Igri	CM	nc	nc	99,0	Castillo <i>et al.</i> 2000
Reinette	CM	nc	nc	64,0	
Hop	CM	nc	nc	22,0	Kruczkowska <i>et al.</i> 2002
Mobek	CA	3,5	7,7	45,5	
Horus	CA	4,6	10,5	43,8	Caredda <i>et al.</i> 2004
Igri	CA	26,0	39,4	66,0	
Igri	CA	95,4	108,7	87,8	Wojnarowiez <i>et al.</i> 2004
Cork	CA	3,2	109,2	2,9	
Douchka	CA	2,2	45,4	4,8	Piccirilli et Arcioni 1991
Madras	CA	1,5	39,6	3,8	
Prisma	CA	4,3	46,9	9,1	Lentini <i>et al.</i> 1995, Bishnoi <i>et al.</i> 2000, Trejo-Tapia <i>et al.</i> 2002, Kiviharju <i>et al.</i> 2005
Scarlet	CA	1,1	37,1	2,9	
Igri	CA	18,4 à 240,7	30,9 à 276,7	52,4 à 87,8	Xie <i>et al.</i> 1995
<i>Hordeum spontaneum</i>	CA	5,8 à 12,5	2 à 23	<50 à 58,3	Abdullah <i>et al.</i> 1994
<i>Oryza sativa</i>	CA	0,1 à 30,2	≤ 20	0 à 100	Rakoczy-Trojanowska <i>et al.</i> 1997, Tenhola-Roininen <i>et al.</i> 2005
<i>Oryza sativa</i>	CM	0 à 1,1	2,5 à 19,5	0 à 44,4	Immonen et Robinson 2000
<i>Phleum pratense</i>	CA	0 à 12	0 à 20	0 à 60	Chu <i>et al.</i> 1990, Hassawi et Liang 1990, Hassawi <i>et al.</i> 1990, Orshinsky <i>et al.</i> 1990, Konzak et Zhou 1991
<i>Secale cereale</i>	CA	0 à 2,8	0 à 22,9	0 à 44,4	Liu <i>et al.</i> 2002, Kang <i>et al.</i> 2003, Labbani <i>et al.</i> 2005
<i>x Triticosecale</i> Wittmack	CA	0 à 3,5	nc	0 à 86,4	Triticum <i>aestivum</i>
<i>Triticum aestivum</i>	CA	0 à 108,2	0 à 115	0 à 99	3,8 à 11,9
<i>Triticum aestivum</i>	CM	nc	nc	32,6 à 94	9,4 à 13,8
<i>Triticum turgidum</i>	CM	3,8 à 11,9	9,4 à 13,8	10 à 85,6	10 à 85,6
<i>Zea mays</i>	CA	nc	8,9	nc	Büter 1997

ant : anthère - CA : culture d'anthères - CM : culture de microspores isolées - emb : embryon - nc : non communiqué - pcreg : plantules chlorophylliennes régénérées - preg : plantules régénérées

libérés après rupture de l'exine et le développement sporophytique commence (Maraschin *et al.* 2005a).

1.3.3.3. La phase de régénération

Après l'étape de culture, intervient la phase de régénération de la plantule par l'entrée en activité des méristèmes apicaux et racinaires (Figure 2). Après environ 3 semaines de culture, les embryons sont transférés sur un milieu de régénération (Lyne *et al.* 1986 ; Olsen 1987 ; Jacquard *et al.* 2003 ; Maraschin *et al.* 2005a). Au cours de cette étape, les embryons haploïdes vont former des plantules qui sont ensuite entretenues en chambre de culture.

1.3.3.4. L'étape de diploïdisation

La dernière étape de l'embryogenèse pollinique consiste à obtenir des plantes HD. Chez l'orge, le doublement du nombre de chromosomes peut être spontané ou obtenu par un traitement avec un agent anti-mitotique tel que la colchicine (Ferrie *et al.* 1995). Après vérification de la ploïdie, les plantules HD sont replantées et cultivées en terre (Lyne *et al.* 1986 ; Olsen 1987).

1.3.4. Les facteurs influençant l'embryogenèse pollinique chez l'orge

La réorientation de la microspore n'est pas uniquement dûe à l'isolement de l'anthère et à sa mise en culture sur des milieux optimisés. Elle est dépendante d'un certain nombre de facteurs génétiques (Knudsen *et al.* 1989), des paramètres chimiques et physico-chimiques des milieux de culture (Olsen 1991 ; Cai *et al.* 1992 ; Caredda et Clément 1999), ainsi que des conditions climatiques et environnementales (Ritala *et al.* 2001). Chez les céréales, la réponse des micros pores et le pourcentage de plantules chlorophylliennes régénérées (Tableau 4) sont génotype-dépendants (Powell 1988 ; Luckett et Smithard 1992 ; Caredda et Clément 1999). Les conditions de culture des plantes mères (Lyne *et al.* 1986 ; Luckett et Smithard 1992 ; Daniel 1993 ; Jähne et Lörz 1995 ; Raina *et al.* 2003), ainsi que la technique d'isolement des anthères ou des micros pores (Ferrie *et al.* 1995 ; Ritala *et al.* 2001) interviennent également dans la réussite de la technique.

Le stade de développement de la microspore au moment du prélèvement est crucial quant à sa capacité à se réorienter (Heberle-Bors 1985). En effet, la microspore est capable de

se réorienter jusqu'au stade précédent la première division pollinique (Maraschin *et al.* 2005a). Durant le développement pollinique naturel, la microspore subit une division asymétrique menant à la formation du grain de pollen, constitué d'une cellule génératrice incluse dans le cytoplasme de la cellule végétative (Garrido *et al.* 1995). La cellule génératrice donne deux cellules spermiques après une nouvelle division mitotique, alors que la cellule végétative accumule des réserves lipidiques et amylacées permettant ultérieurement le développement du tube pollinique (Bedinger 1992 ; McCormick 1993 ; Garrido *et al.* 1995). Dès que l'accumulation d'amidon dans le cytoplasme de la cellule végétative a commencé, la microspore ne peut plus réorienter son programme et l'embryogenèse pollinique est dès lors impossible (Binarova *et al.* 1997 ; Touraev *et al.* 1997). Pour la majorité des espèces utilisées, notamment pour l'orge, le stade microspore vacuolisée uninucléée s'avère optimal pour l'utilisation en embryogenèse pollinique (Touraev *et al.* 1996a ; Touraev *et al.* 1996b ; Obert *et al.* 2004 ; Shariatpanahi *et al.* 2006a).

La composition des milieux de culture est un facteur supplémentaire intervenant dans la réussite de l'embryogenèse pollinique. La culture d'anthères ou de microspores peut se réaliser sur des milieux liquides ou solides (Kao *et al.* 1991 ; Luckett et Smithard 1992, 1995 ; Rimberia *et al.* 2005). La culture en milieu liquide ajoute cependant un problème supplémentaire : les cellules immergées se retrouvent en condition d'anaérobie et l'accumulation de lactate et d'acides organiques contribuent à la régénération de plantules albinos (Kao *et al.* 1991). L'ajout de Ficoll dans le milieu (Kao *et al.* 1991 ; Luckett et Smithard 1992 ; Devaux *et al.* 1993 ; Cistué *et al.* 1999 ; Ingram *et al.* 2000) ou l'utilisation de membrane permettent de diminuer l'effet néfaste du milieu liquide sur le rendement en plantules chlorophylliennes (Luckett et Smithard 1992, 1995).

La source carbonée des milieux de culture et de régénération est le paramètre le plus important pour l'obtention de plantules chlorophylliennes (Finnie *et al.* 1989 ; Roberts-Oehlschlager et Dunwell 1990 ; Olsen 1991 ; Cai *et al.* 1992 ; Caredda et Clément 1999). Les sucres les plus utilisés aujourd'hui sont le maltose et le saccharose avec une réussite plus ou moins importante selon l'espèce utilisée (Tableau 5). Ces deux sources carbonées ont été préférées au fructose et au glucose utilisés dans les années 80 mais qui s'avèrent moins efficaces aujourd'hui (Guo et Pulli 2000a, 2000b ; Kernan et Ferrie 2006). Chez l'orge, le saccharose, le fructose et le glucose se sont avérés toxiques (Scott et Lyne 1994). En effet, l'assimilation rapide de ces sucres par les microspores engendre une hypoxie du milieu (Scott *et al.* 1995) et une accumulation d'amidon dans la microspore qui pourraient être la cause du mauvais fonctionnement des plastes et de la régénération de plantules albinos

(Mlodzianowski et Idzikowska 1981). L'assimilation plus lente du maltose induit un meilleur développement embryonnaire et un pourcentage de régénération de plantules chlorophylliennes plus important (Scott *et al.* 1995).

Tous les travaux menés sur l'embryogenèse pollinique font apparaître que la réussite de cette technique est multifactorielle. Dans la publication I, nous récapitulons les différentes étapes de l'embryogenèse pollinique et proposons le protocole qui semble le mieux adapté à cette technique pour l'orge (*Hordeum vulgare* L.).

Publication I

Anther culture in barley

Jacquard C, Wojnarowiez G et Clément C (2003). In: Maluszynski M, Kasha K, Forster BP, Szarejko I (eds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 21 - 27

2.3

Anther culture in barley

C. Jacquard, G. Wojnarowicz and C. Clément

Université de Reims Champagne Ardenne, UFR Sciences, Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

Introduction

The production of doubled haploid through androgenesis represents a modern tool for the improvement of cultivated species enabling plant breeders to produce homozygous lines in a few months. In barley and other cereals, the use of androgenesis has generated number of cultivars currently available and cultivated in many countries.

Androgenesis can be performed using either anther or isolated microspore culture. In both cases, it consists in the regeneration of haploid plantlets from microspores, which are initially destined to develop into pollen grains (Fig.2.3-1). The microspore enters the androgenetic process following two possible pathways. In the first case, the microspore develops into a haploid callus from which haploid plantlets can be regenerated through indirect embryogenesis. In the second case the microspore develops directly into haploid embryo (direct microspore embryogenesis) which further regenerates a haploid plantlet. The indirect microspore embryogenesis was mostly followed in the 70's but the successive optimizations of the protocols progressively leaded to the obtention of direct embryogenesis in most cases.

The process of androgenesis can be decomposed into 3 steps: the pretreatment, or induction phase, destined to switch the pollen fate from the initial gametophytic program to the alternative sporophytic embryogenic program; the culture phase, which consists in the embryogenic development of the microspore; the regeneration phase allowing the development of androgenetic embryos into haploid plantlets (Fig. 2.3-1).

Protocol

Donor plants and growth conditions

The model genotype used is the 2-rowed winter cultivar “Igri”, though it is no longer used in breeding programmes. Spring lines of barley can follow this protocol but the efficiency will be lower, especially regarding albinism.

The vigor of the donor plant is a crucial point for the success of androgenesis. During plant growth, any form of stress such as pesticide treatment, dehydration or important temperature variations should be avoided. A minimal weekly preventive pesticide treatment can however be applied without significant changes in the yield of anther culture. Seeds are germinated on moistened filter paper in a closed Petri dish for a few days at room temperature and ambient light. After germination seedlings are planted in 20 cm diameter pots containing a mixture of sand, peat moss and soil (1:1:1). They are grown in the greenhouse at 25°C for a week under a 16 h photoperiod at approximately 80% of relative humidity. For winter lines, seedlings are vernalized for 8 weeks at 4°C using a 12 h photoperiod at low light intensity (100 µE/m²/s). Seedlings of vernalized winter or spring cultivars are next treated similarly. They are grown in the greenhouse at low temperature (25±2°C) and 80 % of relative humidity. The suitable photoperiod is 16 h and the light intensity should reach 1,000 µE /m²/s. The quality of light can be determinant and sodium vapor lamps are recommended. Addition of NPK granules during plant growth helps increasing the vigor of the plant and the yield of androgenesis.

Spike sampling and sterilization

1. The developmental stage of microspores at sampling is determinant for their competence to androgenesis. Spikes are collected after approximately 8 weeks when the awns appear outside the upper leaf. This usually corresponds to the uninucleate stage.
2. The stage of development is checked by collecting an anther in the middle of the spike and squashing it in acetic carmine (5% in 45% acetic acid boiled during 1 hour and filtered) on a glass slide. Acetic carmine binds to DNA allowing the location of the nucleus in the microspore under the microscope. Spikes in which microspores have undergone mitosis are not suitable for androgenesis.

3. Suitable spikes are collected and sterilized in ethanol 70° for 5 min and rinsed in sterile distilled water for 5 min.
4. In each spike, the anthers from proximal and distal anthers are removed. The anthers from the central flowers are solely conserved for further pretreatment, representing approximately 30 anthers per spike.

Anther pretreatment

1. Collected anthers from the same spike are deposited in a 5 cm diameter Petri dish in 10 mL of a medium containing CuSO₄.5H₂O (2.5 mg/L) and mannitol (62 g/l) providing an osmotic pressure of 180 mosm/L. For sterilization, the pretreatment medium is classically autoclaved.
2. They are pretreated at 4°C in the dark at 80% of relative humidity and during 3-4 days.

Anther culture

1. After pretreatment, anthers are transferred without rinsing on the culture medium (Table 2.3-1).
2. Thirty anthers were plated per 5 cm diameter Petri dish. Dishes were sealed with Parafilm and maintained in the culture chamber at 26 ± 2°C, with 85% relative humidity, in the dark for 21-28 days.

Haploid plantlet regeneration

1. When microspore derived embryos measure approximately 1-2 mm (Fig. 2.3-2), responding anthers are collected and transferred on the regeneration medium (Table 2.3-1). The differences between the regeneration and the culture medium are the nature and concentration of the carbon source, the removal of mannitol, the replacement of agarose by agar washed (Sigma A8976) and the lower concentrations of plant growth regulators.
2. The Petri dishes were maintained in the culture chamber at 26 ± 2°C and 85% of relative humidity with a 16 h photoperiod, at 100 µE/m²/s⁻¹.

Table 2.3-1. Composition of the C3 and M 1 media for anther culture in barley

Media components	C3 culture medium (mg/L)	M1 regeneration medium (mg/L)
<i>Macro elements</i>		
KH ₄ NO ₃	166	166
KNO ₃	1,900	1,900
MgSO ₄ .7H ₂ O	374	374
KH ₂ PO ₄	170	170
CaCl ₂	22	22
<i>Micro elements</i>		
H ₃ BO ₃	6.2	6.2
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8.6	8.6
KI	0.83	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	2.5	2.5
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	22.3
Fe-Na-EDTA	40	40
<i>Vitamins</i>		
myo-Inositol	0.1	0.1
Thiamine HC1	0.4	0.4
<i>Growth regulators</i>		
NAA	2	0.4
BAP	1	0.4
<i>Others</i>		
Glutamine	752	752
Maltose	60,000	-
Sucrose	-	30,000
Mannitol	32,000	-
Agarose	7,000	-
Agar washed	-	6,000
pH	5.6	5.6

Vitamins and growth regulators are filter sterilised

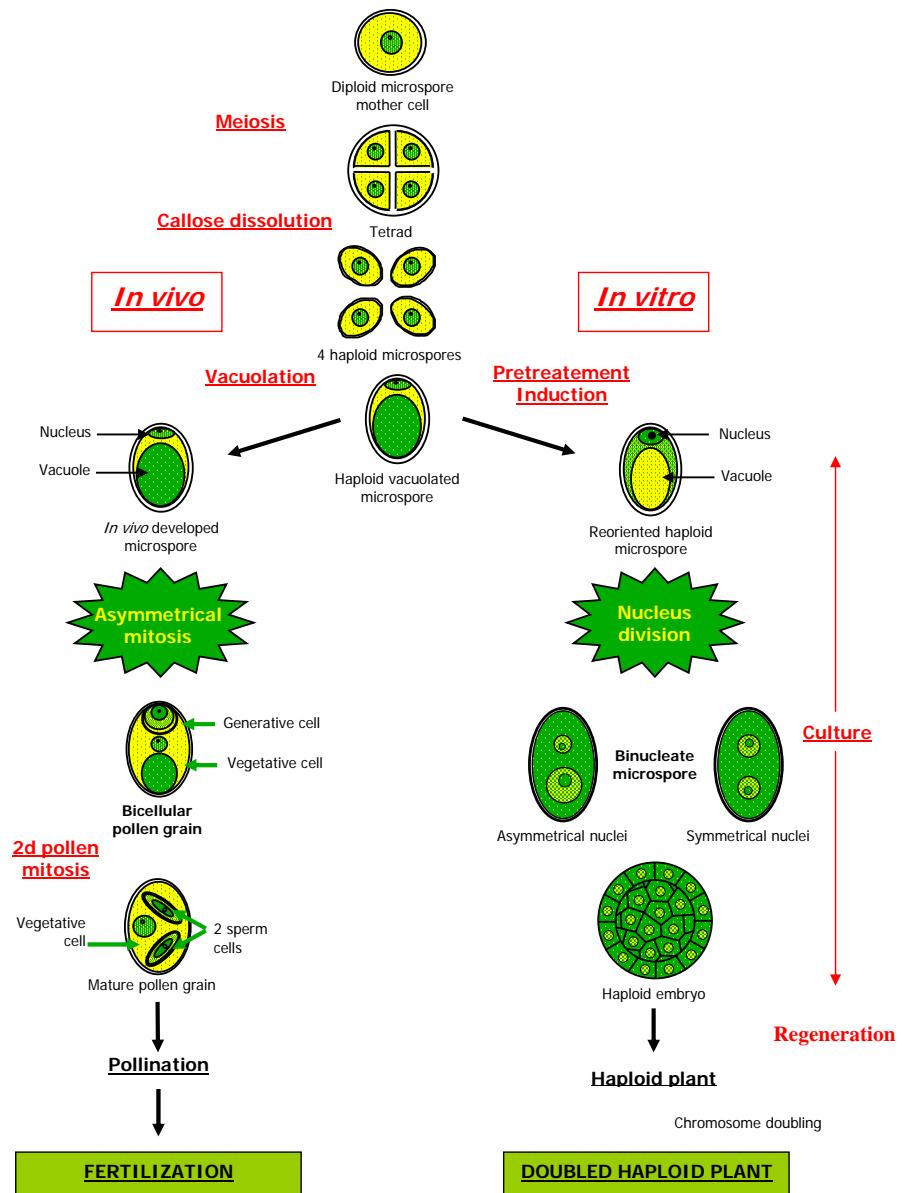


Fig. 1. Alternative pathway of microspore fate in *Hordeum vulgare* L.

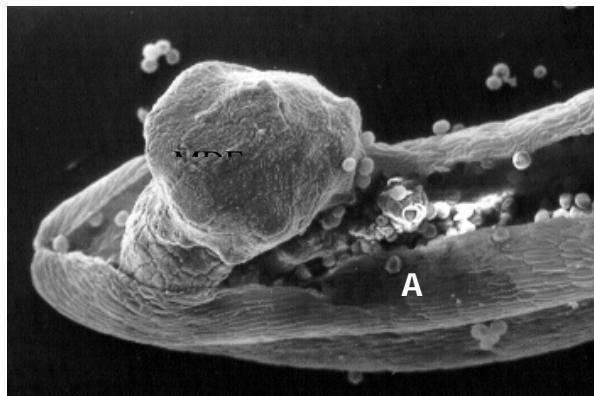


Fig. 2.3-2. Microspore derived embryo (MDE) developing outside of the anther (A) prior to regeneration (x 50).

3. After 2 weeks, green plantlets are transferred in 25 mm culture tubes containing 25 mL of the regeneration medium described above and allowed to grow during 4 weeks in the culture chamber.

Plant ploidy evaluation

Doubled haploid plantlets are spontaneously recovered from anther culture as well as plants with other ploidy. The former are cultivated as described above and grown for further agronomical evaluation. The latter are tested for their ploidy and haploid plantlets undergo chromosome doubling. Aneuploid, triploid or tetraploid plants are not conserved.

1. In order to test the ploidy of androgenetic plantlet, leaf tissue is homogenized in a buffer containing the Murashige and Skoog salts, 700mM sorbitol and 1% (w/v) Triton X 100 at pH 6.6. For the preparation of samples, 40 mg of fresh tissue are homogenized in 2 ml of buffer in the presence of 16 µL filter sterilized DAPI (250 µg/mL).
2. The homogenate is used for the determination of cell ploidy using a CAII flow cytometer (Partec GmbH).

Chromosome doubling and doubled haploid plant obtention

1. Regenerated green plantlets are transferred directly in 20 cm diameter pots containing a mixture of sand/turf/earth (1:1:1).
2. They are grown in the greenhouse at 25°C and 80 % of relative humidity. The suitable photoperiod is 16 h and the light intensity should reach 1,000 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$.
3. Plants are grown until they have produced 3-4 tillers. They are then removed from the pot and washed in water.
4. Roots are trimmed at the stem bases and plantlets are treated with 0.05% colchicine in the presence of 2% dimethyl sulphoxide for chromosome doubling. Plants are immersed to a depth of 5 cm for 5 hours at 25-30°C.
5. Plants are washed for 5 min and next replanted into the pots and grown in the greenhouse

Efficiency and Applications

In *Hordeum vulgare*, the androgenetic protocol has been widely improved for years in most cultivated lines (Pickering and Devaux 1992, Jähne-Gärtner and Lörz 1996) though some genotypes remain recalcitrant. Indeed, the genotype is responsible for more than 60% of the variations obtained in anther cultures. The best results were obtained in the winter lines, especially in the winter cv. Igri, which represents the model genotype for the improvement of the androgenesis protocol through anther culture. Another problem affecting the efficiency of androgenesis in barley is the production of albino plantlets in various proportions according to the cultivars (Caredda and Clément 1999). Barley is particularly affected by this phenomenon as far as several genotypes cannot be used for improvement because of albinism. Both winter and spring lines are concerned though the latters are more sensitive. For example, the winter cv. Igri produces up to 89 % of green haploid plantlets using the following protocol, whereas the spring cv. Cork currently usually generates 99 % of albino plantlets.

This protocol has been optimized in the winter cv. Igri and provides acceptable results with this cv. for theoretical and applied studies (Table 2.3-2). The originalities of this protocol mainly consist in the addition of both mannitol and copper sulfate during anther

pretreatment and culture. Both of them have considerably increased the yield of this technique. The short 4 days pretreatment with mannitol instead of 4 weeks in water allowed to remove the formation of callus during anther culture in favor of embryos. Besides, the addition of copper sulfate at 2.5 mg/L (10 µM) enhanced both the quantity and the quality of regenerated plantlets in the winter cv. Igri.

Table 2.3-2. Yield of anther culture in the winter barley (*Hordeum vulgare* L.) variety Igri

Parameters	RA (%)	RP /100 RA	GP/100 RA	GP (%)
Winter variety Igri	72.3	1245	1111.1	89.2

RA, responding anthers; RP/100 RA, regenerated plantlets per 100 responding anthers; GP/100 RA, green plantlets per 100 responding anthers; % GP, percentage of green plantlets.

However, several parameters generate noticeable variations in the results obtained. For example the season affects microspore behaviour in the anther. Actually, though the conditions described above are maintained constant rigorously all over the year, the results fluctuate significantly. They are much better during the spring and the early summer, suggesting that endogenous rhythms affect barley plant physiology from the seed to the flowering plant, whatever the growth and *in vitro* culture conditions. It is likely that it will be difficult to remove this kind of effect in the future.

The major obstacle of anther culture in numerous barley lines remains albinism. In some cultivars, 100% of microspore derived plantlets are albinos (Fig. 3). This trait is not specific to anther culture and is currently studied in many other *in vitro* systems (Cho et al. 1998). At present, the optimization of the anther culture protocol did not provide considerable improvement of this parameter, suggesting that barley microspores and derived structures are particularly sensitive to albinism.

When albinism occurs, plastids lost their internal membranes, accumulate lipids and prolamellar globules whereas chlorophyll is not synthesized. Comparing the winter cv. Igri producing 89% of green plantlets and the spring cv. Cork producing 99% of albino plantlets, it was shown that microspore plastids are affected as early as the anther sampling stage, and that normal pattern of plastid development is not recovered during the androgenesis process (Caredda et al. 2000). Similar results were obtained in other lines, meaning that the obtention of albino plants following anther culture may be correlated to the physiological state of plastids in the microspore at the time of sampling. Therefore, both fundamental and applied studies carried out in this respect may focus on the early stages of microspore development and

on plant growth conditions. For example, the impact of copper during plant growth may provide interesting data, especially regarding albinism in concerned albino producing cultivars.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr Pierre Devaux (Florimond Desprez Ind.) for helpful advices reading the manuscript.

References

- Caredda S. and C. Clément (1999). Androgenesis and albinism in Poaceae: influence of genotype and carbohydrates. In Anther and pollen. From Biology to Biotechnology. Clément C., E. Pacini and J.-C Audran (Eds.) Springer-Verlag, Berlin, pp. 211-228.
- Caredda S., C. Doncœur, P. Devaux, R.S Sangwan and C. Clément, 2000. Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). Sexual Plant Reproduction **13**: 95-104.
- Cho M.-J, W. Jiang, P.G Lemaux, 1998. Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. Plant Science **138**: 229-244.
- Jähne-Gärtner, A. and H. Lörz, 1996. Protocols for anther and microspore culture of barley. In Hall R.D (Ed.) Methods in molecular Biology, vol 111: Plant cell culture protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp 269-279.
- Pickering R.A. and P. Devaux, 1992. Haploid production: approaches and use in plant breeding. In Shewry PR (Ed.) Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology. CAB International, Oxford, pp 519-547.

Tableau 5 : Protocoles (stress et source de carbone) utilisés pour la culture d'anthères ou de microspores isolées, afin de provoquer l'embryogenèse pollinique chez diverses espèces.

Espèces	Culture	Pré-traitement	Source de carbone	Références
<i>Avena sativa</i> L.	CA	7j à 4°C + 5j à 32°C	Maltose ou Saccharose	(Kiviharju et Pehu 1998 ; Kiviharju <i>et al.</i> 2005)
<i>Brassica napus</i> L.	CM	7j à 4°C	Saccharose	(Zhang <i>et al.</i> 2006)
	CM	42h + Colchicine à 25°C	Saccharose	(Zhao <i>et al.</i> 1996)
	CM	2j à 10°C (plante entière)	Saccharose	(Zhou <i>et al.</i> 2002)
<i>Capsicum annuum</i> L.	CM	1j à 4°C + 7j à 9°C	Maltose	(Supena <i>et al.</i> 2006)
<i>Carica papaya</i> L.	CA	5j Saccharose à 33°C	Saccharose	(Rimberia <i>et al.</i> 2005)
<i>Coffee arabica</i> L.	CM	48h Saccharose + colchicine	Maltose	(Herrera <i>et al.</i> 2002)
<i>Eriobotrya japonica</i> Lindl.	CA	14j à 4°C	Saccharose	(Germana <i>et al.</i> 2006)
<i>Glycine max</i> L.	CA	28j à 4°C	Saccharose	(Rodrigues <i>et al.</i> 2005)
<i>Hordeum vulgare</i> L.	CA	4j Mannitol à 25°C	Maltose	(Castillo <i>et al.</i> 2000)
	CM	4j Mannitol à 25°C	Maltose	(Castillo <i>et al.</i> 2000)
	CM	4j Mannitol à 4°C	Maltose	(Kasha <i>et al.</i> 2001)
	CA	4j Mannitol à 4°C + 4j 4°C	Saccharose	(Kruczowska <i>et al.</i> 2002)
	CA	28j à 4°C	Maltose	(Lazaridou <i>et al.</i> 2005)
	CM	21j à 4°C + 7j Mannitol à 4°C	Maltose	(Li et Devaux 2003)
	CM	4j Mannitol à 25°C	Maltose	(Maraschin <i>et al.</i> 2005 b)
	CA	3j Mannitol 4°C	Maltose	(Caredda <i>et al.</i> 1999 ; Wojnarowicz <i>et al.</i> 2004)
	CA	4j (Mannitol + CuSO ₄) à 4°C	Maltose	(Wojnarowicz <i>et al.</i> 2002 ; Jacquard <i>et al.</i> 2003 ; Jacquard <i>et al.</i> 2006)
<i>Linum usitatissimum</i> L.	CA	1j à 35°C	Saccharose	(Chen <i>et al.</i> 1998 ; Chen et Dribnenki 2002)
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	CA	48h à 4°C + 9j à 10°C	Saccharose	(Shtereva <i>et al.</i> 1998)
<i>Malus domestica</i> Borkh	CM	Fleurs 1j Mannitol à 4°C + microspores 2j Mannitol à 4°C	Maltose	(Höfer <i>et al.</i> 1999)
<i>Oryza sativa</i> L.	CA	10j à 10°C	Maltose	(Bishnoi <i>et al.</i> 2000)
	CM	4j Mannitol à 33°C	Maltose	(Raina et Irfan 1998)
	CA	14j à 4°C	Saccharose ou Maltose	(Trejo-Tapia <i>et al.</i> 2002)
<i>Phleum pratense</i> L.	CA	24h à 31°C	Maltose	(Guo et Pulli 2000b)
	CA	7j à 8°C	Saccharose + Maltose	(Obert <i>et al.</i> 2004)
<i>Saponaria vaccaria</i>	CM	3j à 32°C	Saccharose	(Kernan et Ferrie 2006)
<i>Secale cereale</i> L.	CA	7j à 4°C	Maltose	(Rakoczy-Trojanowska <i>et al.</i> 1997)
	CM	7j Mannitol à 10°C	Maltose	(Guo et Pulli 2000a)
<i>Silene latifolia</i> L.	CA	1j à 33°C	Saccharose	(Safarova <i>et al.</i> 2005)
<i>x Triticosecale</i> Wittmack	CM	14j à 4°C	Saccharose	(Gonzalez et Jouve 2005)
	CA	14j à 4°C + 3j à 32°C	Maltose	(Immonen et Robinson 2000)
	CM	14j à 4°C	Maltose	(Pauk <i>et al.</i> 2000)
	CA	6 à 10j à 4°C	Saccharose	(Kang <i>et al.</i> 2003)
<i>Triticum aestivum</i> L.	CM	3j Mannitol à 4°C	Maltose	(Labbani <i>et al.</i> 2005)
	CM	7j à 4°C	Maltose	(Letarte <i>et al.</i> 2006)
	CM	3j à 33°C	Maltose	(Liu <i>et al.</i> 2002)
	CM	6j Mannitol à 24°C	Saccharose	(Cistué <i>et al.</i> 2006)
<i>Triticum turgidum</i> L.	CM	35j à 4°C + 3j Mannitol à 4°C	Maltose	(Labbani <i>et al.</i> 2005)
	CA	7j à 7°C + 3j Colchicine à 29°C	Saccharose	(Obert et Barnabas 2004)

CA : culture d'anthères ; CM : culture de microspores isolées ; h : heure ; j : jour

1.3.5. Importance du stress dans l'induction de l'embryogenèse pollinique

Le facteur principal et déterminant pour la réussite de l'embryogenèse pollinique demeure le stress appliqué aux microspores (Heberle-Bors 1985). En effet, un stress, servant de facteur déclenchant, est nécessaire à l'induction de l'embryogenèse pollinique chez la majorité des espèces (Touraev *et al.* 1996c ; Touraev *et al.* 1997 ; Maraschin *et al.* 2005a ; Shariatpanahi *et al.* 2006a ; Shariatpanahi *et al.* 2006b). La phase de prétraitement détermine la réorientation du programme de la microspore et constitue l'étape clé de la technique. Pour le prétraitement, des stress variés sont utilisés (Shariatpanahi *et al.* 2006a).

1.3.5.1. Stress physiques

L'application d'un choc thermique, chaud ou froid, est le stress le plus couramment utilisé (Tableau 5).

1.3.5.1.1. Choc par le froid

Les anthères, les fleurs, voire les plantes entières peuvent facilement être stressées par le froid (Touraev *et al.* 1997 ; Touraev *et al.* 2001 ; Shariatpanahi *et al.* 2006a). Chez le tabac, la culture des plantes mères au "froid" (15°C) permet d'engendrer une production accrue de plantes HD (Heberle-Bors 1983). L'exposition de fleurs ou d'épis à 4°C pendant 7 à 28 jours permet l'induction de l'embryogenèse pollinique chez l'avoine (Kiviharju et Pehu 1998). Un stress à 4°C est souvent utilisé durant quelques jours (Ingram *et al.* 2000) ou plusieurs semaines chez le blé (Labbani *et al.* 2005) ou l'orge (Huang *et al.* 1982 ; Davies et Morton 1998 ; Caredda *et al.* 1999 ; Davies 2003 ; Szarejko 2003). Un prétraitement des fleurs à 8°C pendant 7 jours chez le lin (Obert *et al.* 2004), ou à 4°C pendant plusieurs semaines chez le riz (Cho et Zapata 1988) permet également d'améliorer le processus. L'embryogenèse pollinique chez *Triticosecale* est engendrée par le passage des anthères à 4 ou 7°C pendant 2 semaines (Pauk *et al.* 2000 ; Tuvesson *et al.* 2000 ; Gonzalez et Jouve 2005). Chez le maïs, Barnabas *et al.* (2003) utilisent une température de 7°C pendant 7 jours pour réorienter les microspores. Pour le riz le prétraitement des anthères à 4, 8 ou 10°C pendant 8 à 15 jours donne les meilleurs résultats (Bishnoi *et al.* 2000 ; Trejo-Tapia *et al.* 2002 ; Zapata-Arias 2003).

De façon générale, le prétraitement au froid permet d'augmenter la survie des microspores (Sunderland et Roberts 1979), la régénération de plantes HD spontanées (Amssa *et al.* 1980 ; Heberle-Bors 1983) mais également la production de plantules chlorophylliennes (Labbani *et al.* 2005).

1.3.5.1.2. Choc par le chaud

L'embryogenèse pollinique par culture de microspores isolées peut être induite par un traitement à 29°C pendant 3 jours chez le blé (Barnabas 2003), 32°C pendant 24h chez le brocoli (Dias 2003) ou la phléole des prés (Guo et Pulli 2000b), 32°C pendant 3 jours chez le colza (Custers *et al.* 1994), ou 33°C pendant 6 jours chez le tabac (Touraev *et al.* 1996a). Pour la culture d'anthères, l'application du stress chaud, entre 32 et 35°C s'effectue durant 1 à 5 jours chez l'avoine (Kiviharju et Pehu 1998), le lin (Chen *et al.* 1998), la papaye (Rimberia *et al.* 2005), le riz (Raina et Irfan 1998) et *Triticosecale* (Immonen et Robinson 2000). Le choc thermique chaud peut être amplifié par une carence en source carbonée pour améliorer l'effet du prétraitement chez le blé (Touraev *et al.* 1996b) et le tabac (Touraev *et al.* 1996c).

1.3.5.2. Stress physiologiques

Un choc osmotique peut également être utilisé afin de réorienter le programme de la microspore (Touraev *et al.* 2001). Ainsi, un prétraitement avec un milieu hypertonique est utilisé chez le blé (Wang *et al.* 1981 ; Zhang *et al.* 1987) ou le poivre (Supena *et al.* 2006) car il augmente le nombre de cals obtenus. Ce stress semble le plus approprié pour l'embryogenèse pollinique chez les céréales (Hoekstra *et al.* 1993). Le milieu hypertonique est obtenu en utilisant du mannitol, du polyéthylène glycol (PEG) et du sorbitol qui sont des sucres non assimilables par la cellule, ou du saccharose (Wojnarowiez *et al.* 2004). Le mannitol est cependant le sucre le plus fréquemment utilisé (Tableau 5). En effet, il permet d'augmenter le nombre de plantules régénérées, notamment chlorophylliennes, pour la culture de microspores isolées aussi bien que pour la culture d'anthères chez le blé (Zhou *et al.* 1991 ; Labbani *et al.* 2005), l'orge (Hoekstra *et al.* 1992 ; Cistué *et al.* 1994 ; Hoekstra *et al.* 1997) et le seigle (Guo et Pulli 2000a). Chez l'orge, le stress osmotique est souvent couplé à un stress froid à 4°C. Ce double stress permet d'augmenter la réponse des anthères et la régénération de plantules chlorophylliennes (Caredda *et al.* 1999 ; Kasha *et al.* 2001 ; Kruczowska *et al.* 2002 ; Li et Devaux 2003 ; Wojnarowiez *et al.* 2004).

1.3.5.3. Stress chimiques

L'utilisation de la colchicine - molécule empêchant la synthèse des microtubules en se fixant à la tubuline - est le troisième principal stress utilisé. L'utilisation de cet agent chimique stimule l'embryogenèse pollinique pour les cultures de microspores isolées de navet (Hansen

(Hansen et Andersen 1996 ; Zhao et al. 1996 ; Zhou et al. 2002), de café (Herrera et al. 2002), ainsi que pour la culture d'anthères de maïs (Obert et Barnabas 2004). Ce prétraitement peut être couplé à un choc thermique chaud et/ou froid pour améliorer l'embryogenèse pollinique chez le maïs (Obert et Barnabas 2004).

1.3.5.4. Autres stress

En marge de ces trois principaux prétraitements, un grand nombre d'autres stress sont utilisés uniquement sur quelques espèces dont : les radiations γ chez le datura, le tabac et la tomate (Sangwan et Sangwan 1986 ; Shtereva et al. 1998), l'acide abscissique chez l'orge (Van Bergen et al. 1999 ; Wang et al. 1999), une variation de pH du milieu de prétraitement chez le tabac (Barinova et al. 2004) ou encore l'utilisation de métaux lourds comme le lithium chez la pomme de terre, le pommier et le tabac (Zonia et Tupy 1995) ou le sulfate de cuivre chez l'orge (Wojnarowicz et al. 2002).

1.3.5.5. Le sulfate de cuivre

Chez les céréales, le cuivre joue un rôle clé dans l'anthère pendant le développement pollinique puisque le déficit en cuivre affecte le tapis et le métabolisme du pollen (Jewell et al. 1988 ; Azouaou et Souvré 1993). Dans la majorité des cas, une carence en cuivre mène à un avortement précoce du pollen et à une stérilité mâle (Jewell et al. 1988). Le cuivre est également impliqué dans la synthèse de chlorophylle et dans la photosynthèse (Maksymiec 1997 ; Caspi et al. 1999). Il entre notamment dans la composition de la plastocyanine et de la ferrédoxyne qui sont deux protéines intervenant dans la photophosphorylation. Plusieurs travaux récents suggèrent un effet positif du sulfate de cuivre sur le rendement et l'albinisme pendant la culture *in vitro* de différents explants chez l'orge (Cho et al. 1998 ; Nuutila et al. 2000b ; Wojnarowicz et al. 2002). L'apport en sulfate de cuivre dans le milieu de culture augmente le taux de régénération de plantes à partir de culture de cals (Dahleen 1995), permet la production de plantules chlorophylliennes à partir de cals dérivés du scutellum dans des lignées récalcitrantes (Cho et al. 1998) et améliore le comportement des cultures poly-embryonnaires de scutellum en permettant la régénération de plantules chlorophylliennes (Nuutila et al. 2000b). La concentration optimale de cuivre semble dépendre du type d'explant ou du cv. utilisé. Par exemple, la concentration optimale pour la régénération de

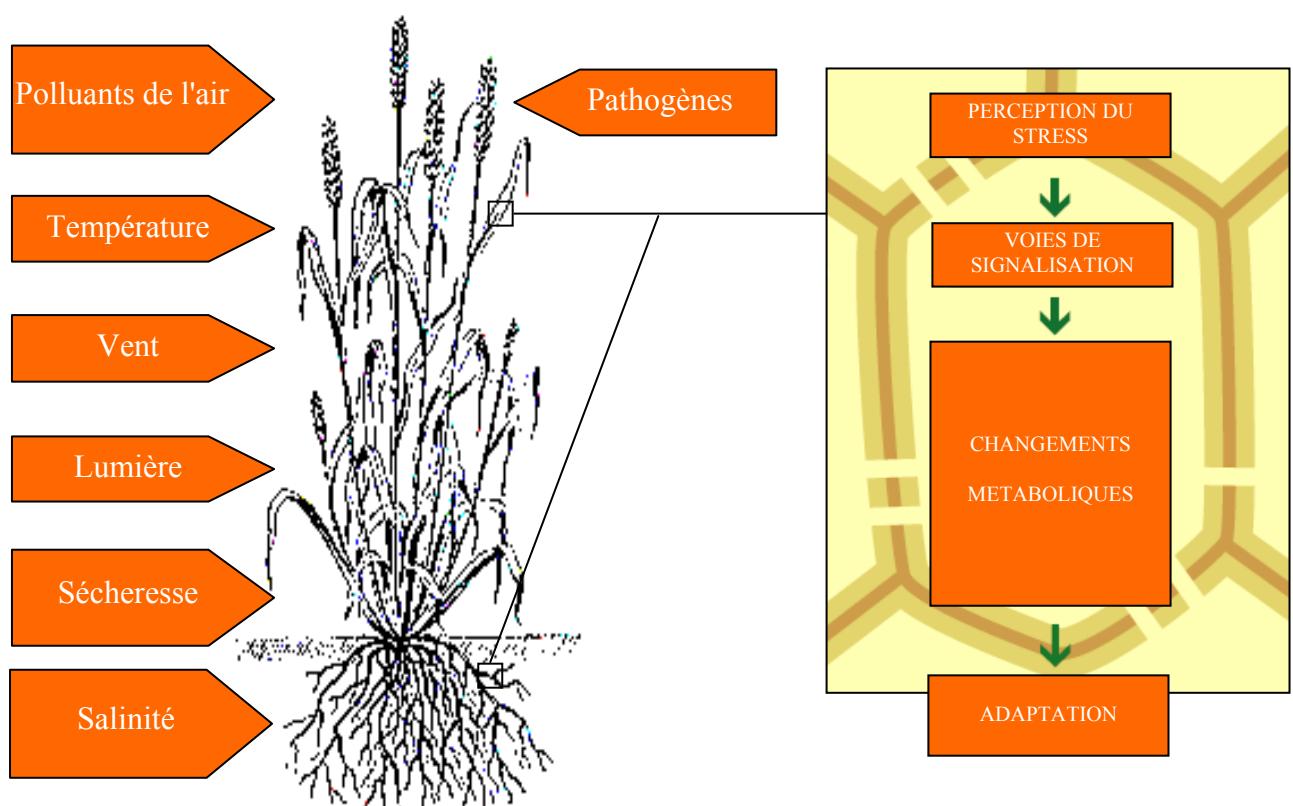


Figure 3 : Schéma général de l'adaptation aux stress chez les plantes.

plantes à partir de cultures de cals chez les lignées récalcitrantes peut être 500 fois plus élevée que celle utilisée normalement dans le milieu de culture (Dahleen 1995).

Pour la culture d'anthères chez l'orge (cv. Igri), l'ajout de sulfate de cuivre dans le milieu de prétraitement et une concentration en sulfate de cuivre 100 fois plus élevée que la normale dans le milieu de culture, permettent une augmentation du nombre de plantules régénérées et du pourcentage de plantules chlorophylliennes (Wojnarowicz *et al.* 2002).

L'utilisation de sulfate de cuivre chez les cvs. produisant exclusivement des plantules albinos pourrait donc permettre l'amélioration des rendements en plantules chlorophylliennes.

Le choix du stress à appliquer est donc dépendant de l'espèce mais également de l'utilisation de la culture de microspores isolées ou d'anthères. L'important est de trouver un stress qui permettra la réorientation des microspores et d'obtenir des plantules HD chlorophylliennes.

1.4. Stress et mécanismes de défense

Comme nous l'avons vu précédemment, le prétraitement est l'étape clé de la technologie. La compréhension des mécanismes impliqués dans le processus passe donc par une attention accrue portée au stress appliqué.

"Biologiquement parlant, le stress correspond aux contraintes et agressions subies par un organisme qui vont l'empêcher de vivre dans des conditions optimales et vont engendrer une réponse de cet organisme pour pouvoir vivre dans de meilleures conditions. Au sens strict du terme, la définition du stress ne comprend pas la réponse de l'organisme aux contraintes mais uniquement les contraintes elles mêmes" (Roeder 2006).

Les réactions internes déclenchées par le stress visant à maintenir l'équilibre de l'organisme sont regroupées sous le terme "homéostasie". La mise en place des mécanismes de régulation de l'homéostasie permet à la plante de s'adapter au stress (Figure 3).

1.4.1. Le stress chez les plantes

Les stress se traduisent chez les plantes par des changements morphologiques, physiologiques et moléculaires qui affectent leur croissance et leur productivité (Wang *et al.*

Stress abiotiques

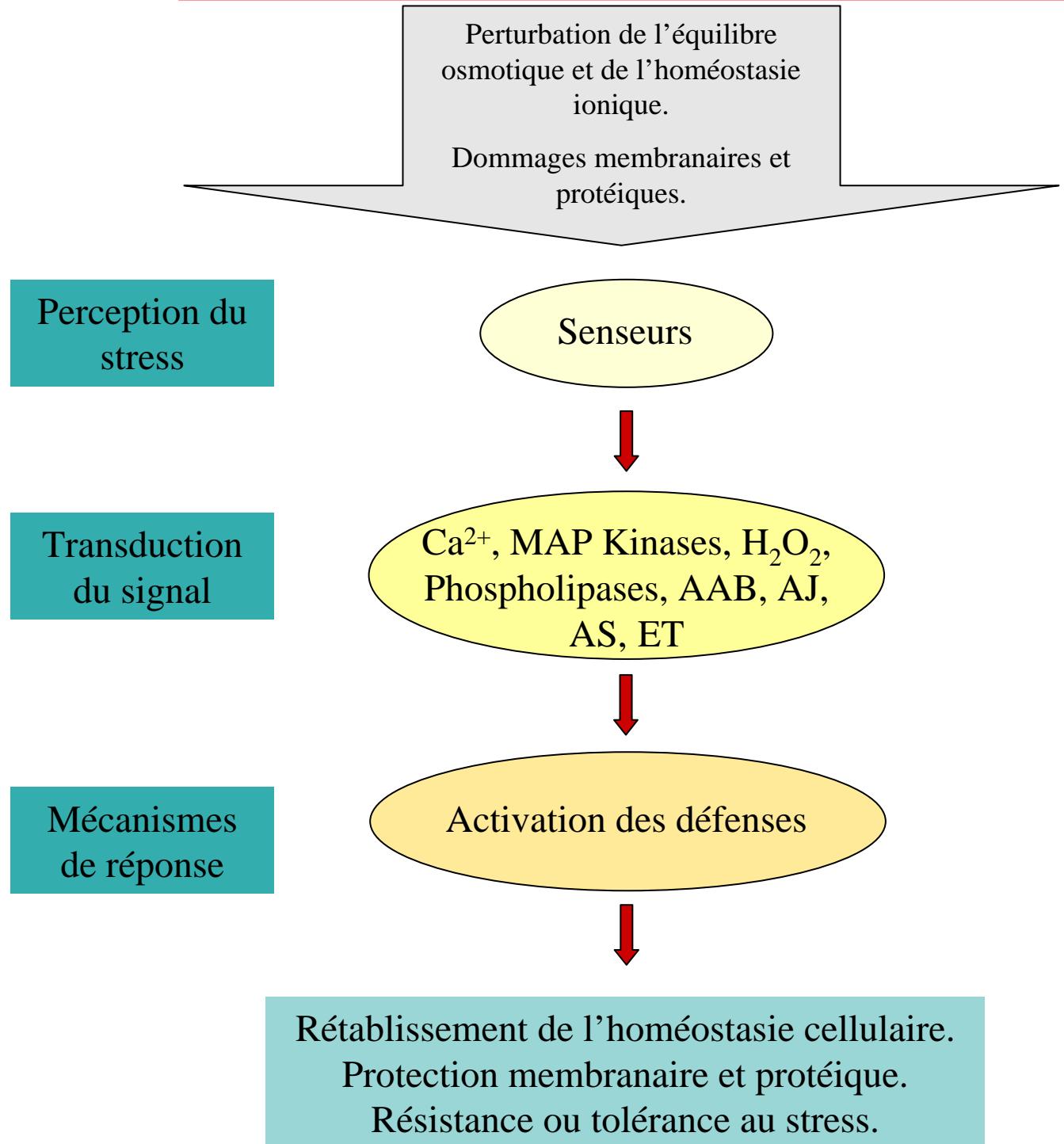


Figure 4 : Représentation schématique de la réponse aux stress abiotiques chez les plantes
(d'après Wang *et al.* 2003)

2001 ; Araus *et al.* 2002). Contrairement aux animaux, les plantes ne peuvent pas migrer lorsque les conditions de vie leur sont défavorables. Naturellement, les plantes doivent donc s'adapter pour faire face à des agressions biotiques (champignons, bactéries, virus...) et abiotiques (blessures, pollution, salinité, sécheresse, variation de température...).

Les stress abiotiques induisent des changements physiologiques (Knight et Knight 2001 ; Langridge *et al.* 2006) et des changements dans les processus cellulaires et moléculaires (Knight et Knight 2001 ; Chinnusamy *et al.* 2004 ; Chinnusamy *et al.* 2006 ; Langridge *et al.* 2006 ; Verslues *et al.* 2006 ; Talame *et al.* 2007). Les stress abiotiques engendrent généralement une perturbation du potentiel hydrique chez les plantes (Atienza *et al.* 2004 ; Verslues *et al.* 2006), compensée par une fermeture des stomates, suite à une perte de turgescence dans les cellules de garde (Langridge *et al.* 2006), ou une diminution de la pression osmotique cellulaire (Dekov *et al.* 2000 ; Goicoechea *et al.* 2000 ; Nogués *et al.* 2002 ; Pellegrineschi 2004 ; Langridge *et al.* 2006). Les stress peuvent également affecter le fonctionnement de la plante en perturbant les flux ioniques (Knight et Knight 2001 ; Langridge *et al.* 2006) ou en altérant les parois ou membranes cellulaires (Zhu 2001 ; Wang *et al.* 2003 ; Verslues *et al.* 2006). Les tissus doivent alors mettre en place plusieurs mécanismes d'adaptation afin de limiter les dégâts engendrés par le stress (Verslues *et al.* 2006).

Les plantes mettent donc en œuvre des stratégies d'adaptation et de défense aux stress (Netting 2002). Pour cela elles possèdent des mécanismes de perception et de signalisation complexes leur permettant de produire une réponse plus ou moins spécifique des *stimuli* perçus (Figure 4). La réorientation de la microspore étant dépendante du stress appliqué, la connaissance de la réponse aux stress est nécessaire afin d'établir une stratégie d'étude des mécanismes moléculaires mis en place dans l'anthère et/ou la microspore lors du prétraitement.

1.4.2. Transduction et réponses aux stress

Suite à la perception du stress, *via* des senseurs plus ou moins spécifiques, le signal émis est transmis au reste de la plante (Knight et Knight 2001 ; Chinnusamy *et al.* 2004). Chez les végétaux, le principal second messager est le calcium -Ca²⁺- (Sanders *et al.* 1999 ; Knight et Knight 2001), et les principales molécules signal impliquées dans la transduction du signal sont l'acide abscissique -AAB- (Leung et Giraudat 1998), l'acide jasmonique -AJ- (Creelman et Mullet 1997), l'acide salicylique -AS- (Durner *et al.* 1997), l'éthylène -ET- (Ecker 1995) et les espèces activées de l'oxygène -EOA- (Lamb et Dixon 1997). Le signal

peut être plus ou moins stress-spécifique (Hazen *et al.* 2003) et tissu-spécifique (Kreps *et al.* 2002 ; Ozturk *et al.* 2002 ; Yu et Setter 2003). La stimulation de la cascade de signalisation engendre notamment des modifications de l'expression d'un certain nombre de gènes permettant ainsi le rétablissement de l'équilibre cellulaire (Kreps *et al.* 2002 ; Ozturk *et al.* 2002 ; Seki *et al.* 2002 ; Wang *et al.* 2003).

Dans tous les cas, la réponse au stress est liée à la capacité de la plante à le percevoir, à transmettre le signal et à activer les différentes voies métaboliques. Nous allons maintenant détailler les principales voies impliquées dans la transduction du signal et les mécanismes de réponse qui en découlent.

1.4.2.1. Le calcium

L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} libre dans le cytosol est un événement précoce de la perception du stimulus. Le Ca^{2+} est le second messager principal dans la réponse aux stress abiotiques (Sanders *et al.* 1999 ; Knight 2000 ; Knight et Knight 2001 ; White et Broadley 2003 ; Sano *et al.* 2006). Le signal Ca^{2+} est généré par l'ouverture de canaux ioniques qui permettent le passage du Ca^{2+} depuis l'extérieur de la cellule, la vacuole (Knight *et al.* 1996) ou les mitochondries (Subbaiah *et al.* 1998) vers le cytosol (Knight et Knight 2001 ; Sanders *et al.* 2002 ; Sano *et al.* 2006).

Les stress hypo-osmotique et oxydatif sur des cultures cellulaires de tabac engendrent une augmentation du Ca^{2+} libre dans le cytosol, induisant un ralentissement du cycle cellulaire et un retardement de la division cellulaire (Price *et al.* 1994 ; Takahashi *et al.* 1997 ; Sano *et al.* 2006). Le stress oxydatif active des canaux Ca^{2+} voltage dépendants (Furuichi *et al.* 2001 ; Kawano *et al.* 2004), tandis que le stress hypo-osmotique induit une entrée de Ca^{2+} dans le cytosol via l'activation de canaux voltage indépendants (Kadota *et al.* 2004 ; Kawano *et al.* 2004). Il existe donc deux types de canaux calcium, mais quelque soit le type activé, le stress engendre une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique (Sano *et al.* 2006).

L'augmentation de Ca^{2+} engendre toute une cascade de processus contrôlés par des senseurs calciques. Ces senseurs sont des calmodulines, impliquées dans la réponse au froid, au stress oxydatif ou à une stimulation mécanique (Braam et Davies 1990 ; Botella et Artega 1994), des CDPKs (Ca^{2+} -dependent protein kinases) impliquées dans la réponse au stress froid, salin et à la sécheresse (Sheen 1996 ; Harmon *et al.* 2000 ; Saijo *et al.* 2000) et des phosphatases régulées par le Ca^{2+} comme par exemple les serine/thréonine phosphatases ou les calcineurines B-like qui interviennent également lors de stress salin ou froid (Liu et Zhu

1998 ; Luan 1998 ; Kudla *et al.* 1999 ; Knight et Knight 2001). Sanders *et al.* (2002) ont classé les senseurs Ca^{2+} en deux classes :

- les senseurs relais, comme les calmodulines et les calcineurines B-like, agissent sur un partenaire d'interaction qui va répondre en changeant son activité enzymatique ou sa structure (Luan *et al.* 2002).

- les senseurs répondants, comme les " Ca^{2+} -dependent protein kinases" (CDPKs), qui répondent directement au signal en modifiant leur activité enzymatique ou leur structure (Sanders *et al.* 2002).

Avec ces deux types de senseurs, le Ca^{2+} peut cibler diverses réponses grâce à la multitude de voies de signalisation qui lui sont ainsi proposées.

L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} induit en partie la cascade des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) en réponse au froid, à la sécheresse, au stress oxydatif ou à une stimulation mécanique (Mizoguchi *et al.* 1996 ; Ichimura *et al.* 1998 ; Mizoguchi *et al.* 1998 ; Kovtun *et al.* 2000). Selon le stress ce sont différentes MAPKKKs qui sont activées et qui vont phosphoryler certaines MAPKKs. Ces dernières vont engendrer l'activation de MAPKs variées en fonction du stress perçu (Kovtun *et al.* 2000 ; Knight et Knight 2001). Les combinaisons entre ces activations dans la cascade des MAPKs pourraient coder la spécificité de la réponse selon le stress appliqué (Knight et Knight 2001).

Une augmentation biphasique de la teneur en Ca^{2+} , suite à un stress à l'ozone, engendre l'induction de l'expression de la Gluthation-S-Transférase (GST) chez *Arabidopsis* (Clayton *et al.* 1999). La signature calcique est donc caractérisée par le type de stress mais également par la durée du burst calcique (Knight et Knight 2001 ; Sanders *et al.* 2002). De plus selon le stress, la réponse ne sera pas identique en fonction du tissu concerné (Knight et Knight 2001). La réponse calcique est donc stress et tissu-spécifique, elle peut ainsi fournir une réponse appropriée et spécifique à chaque stress.

1.4.2.2. L'acide abscissique

L'AAB participe à la régulation du développement de l'embryon (Cheng *et al.* 2002) et de la graine en intervenant sur la maturation, la mise en réserve et la dormance (Shinozaki *et al.* 2003 ; Frey *et al.* 2004 ; Nambara et Marion-Poll 2005 ; Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki 2006). Il est également impliqué dans l'adaptation des plantes à un grand nombre de stress abiotiques, tels que la sécheresse, le stress osmotique ou encore la déshydratation

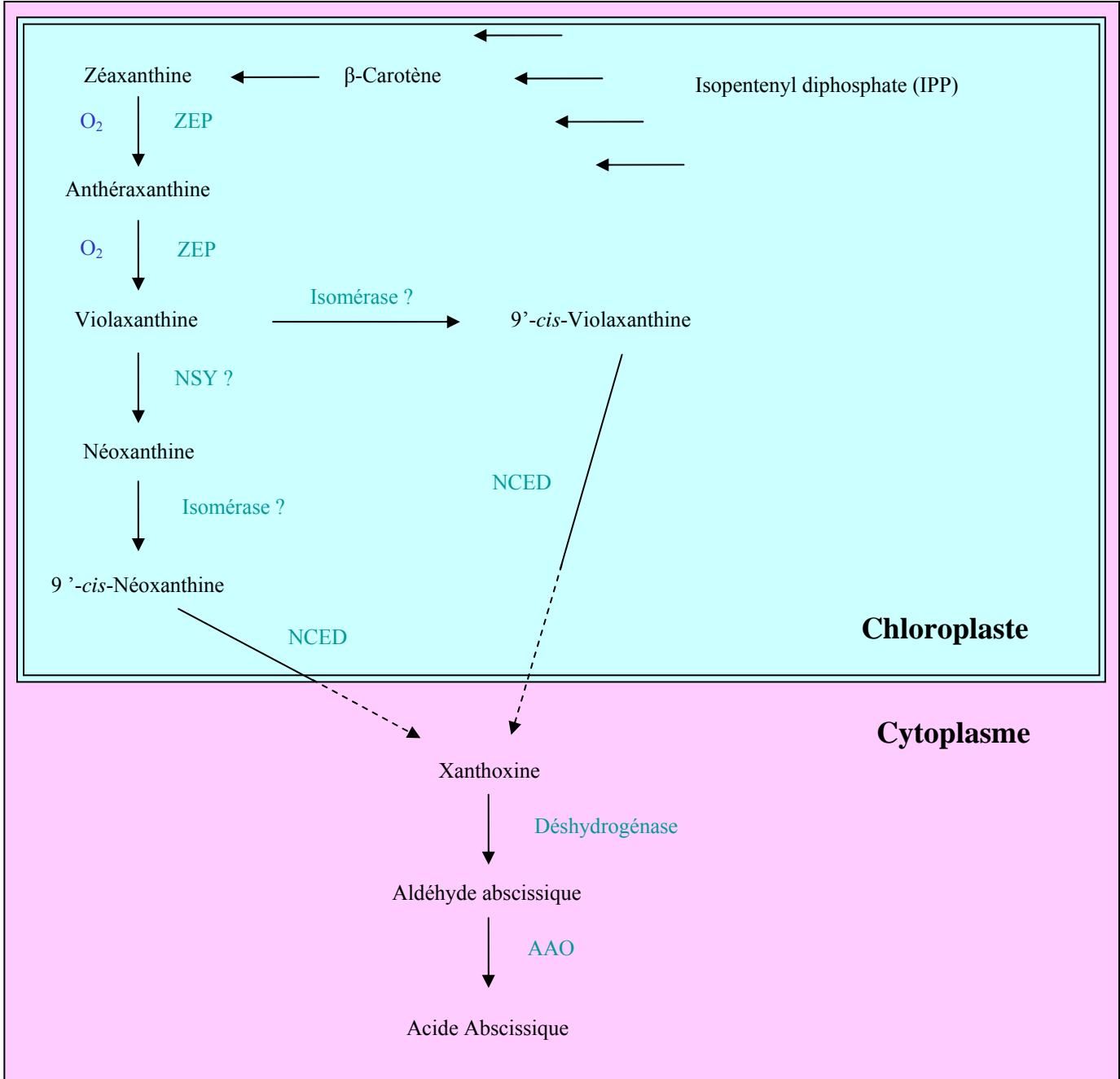


Figure 5 : La voie de biosynthèse de l'AAB (d'après Schwartz *et al.* 2003 et Nambara et Marion-Poll 2005)

Enzymes - AAO : aldéhyde abscissique oxydase, NCED : 9-cis époxycaroténoïde dioxygénase, NSY : néoxanthine synthase, ZEP : zéaxanthine époxidase.

(Himmelbach *et al.* 2003 ; Nambara et Marion-Poll 2005 ; Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki 2006).

Les premières étapes de la synthèse de l'AAB se déroulent dans le chloroplaste (Figure 5). Elles correspondent aux étapes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes permettant l'obtention de la zéaxanthine (Lefebvre 2005), le premier xanthophylle spécifique de la voie de biosynthèse de l'AAB (Liotenberg *et al.* 1999). La première étape spécifique de la biosynthèse de l'AAB est l'époxydation de la zéaxanthine et de l'anthéraxanthine (intermédiaire) en violaxanthine sous l'action de la zéaxanthine époxydase ou ZEP (Marin *et al.* 1996). La violaxanthine est ensuite convertie en 9'-cis-époxycaroténoïdes (C40), notamment en 9'-*cis*-Néoxanthine et 9'-*cis*-Violaxanthine (Schwartz *et al.* 1997). Ces 9'-cis-époxycaroténoïdes sont clivés puis oxydés en xanthoxine (C15) par la 9'-cis-époxycaroténoïde dioxygénase ou NCED (Schwartz *et al.* 1997). La xanthoxine est exportée vers le cytoplasme pour y être convertie en AAB par une réaction en deux étapes *via* l'aldéhyde abscissique (Sindhu *et al.* 1990). Cette conversion nécessite l'action d'une déshydrogénase à courte chaîne (ABA2) puis d'une AB-aldéhyde oxydase (AAO3).

L'AAB régule plusieurs aspects du développement de la plante comme la germination des graines, la dormance ainsi que la tolérance à la dessiccation des graines, mais il joue aussi un rôle majeur dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Leung et Giraudat 1998 ; Chinnusamy *et al.* 2004). Ainsi il régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la résistance au froid, au choc osmotique ou encore à la déshydratation (Audran *et al.* 1998 ; Audran *et al.* 2001 ; Knight et Knight 2001 ; Xiong *et al.* 2001).

Des plantes soumises à des conditions de sécheresse et de stress osmotique produisent de l'AAB comme signal endogène de réponse adaptative au stress (Zhu *et al.* 2002). Une analyse de l'expression des gènes induits par un stress osmotique montre que ces gènes sont activés par des voies dépendantes et indépendantes de l'AAB (Shinozaki *et al.* 2003 ; Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki 2006). La sécheresse induit une production d'AAB qui induit la fermeture des stomates afin de limiter la perte en eau (Wood *et al.* 2000 ; Schroeder *et al.* 2001 ; Sanders *et al.* 2002). L'AAB est synthétisé durant la déshydratation puis dégradé au cours de la réhydratation (Seo *et al.* 2000 ; Iuchi *et al.* 2001 ; Nambara et Marion-Poll 2005). Suite à la déshydratation, l'AAB est détecté par un récepteur membranaire qui transmet le signal à des canaux calciques présents dans la membrane plasmique. L'AAB induit en parallèle un signal redox par l'activation de la NADPH oxydase et de la nitrate réductase qui produisent du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et de l'oxyde nitrique (Himmelbach *et al.* 2003). Ainsi, la fermeture des stomates induite par l'AAB est précédée d'une augmentation de la

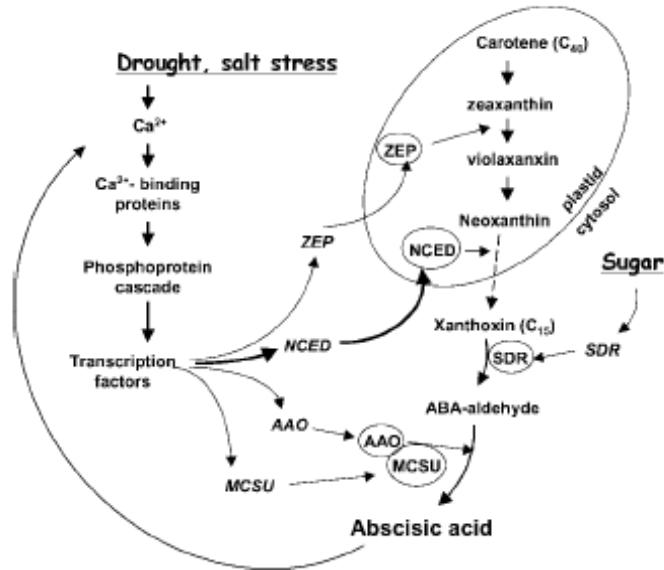


Figure 6 : Régulation de la biosynthèse de l'AAB par une voie Ca^{2+} dépendante (Xiong et Zhu 2003).

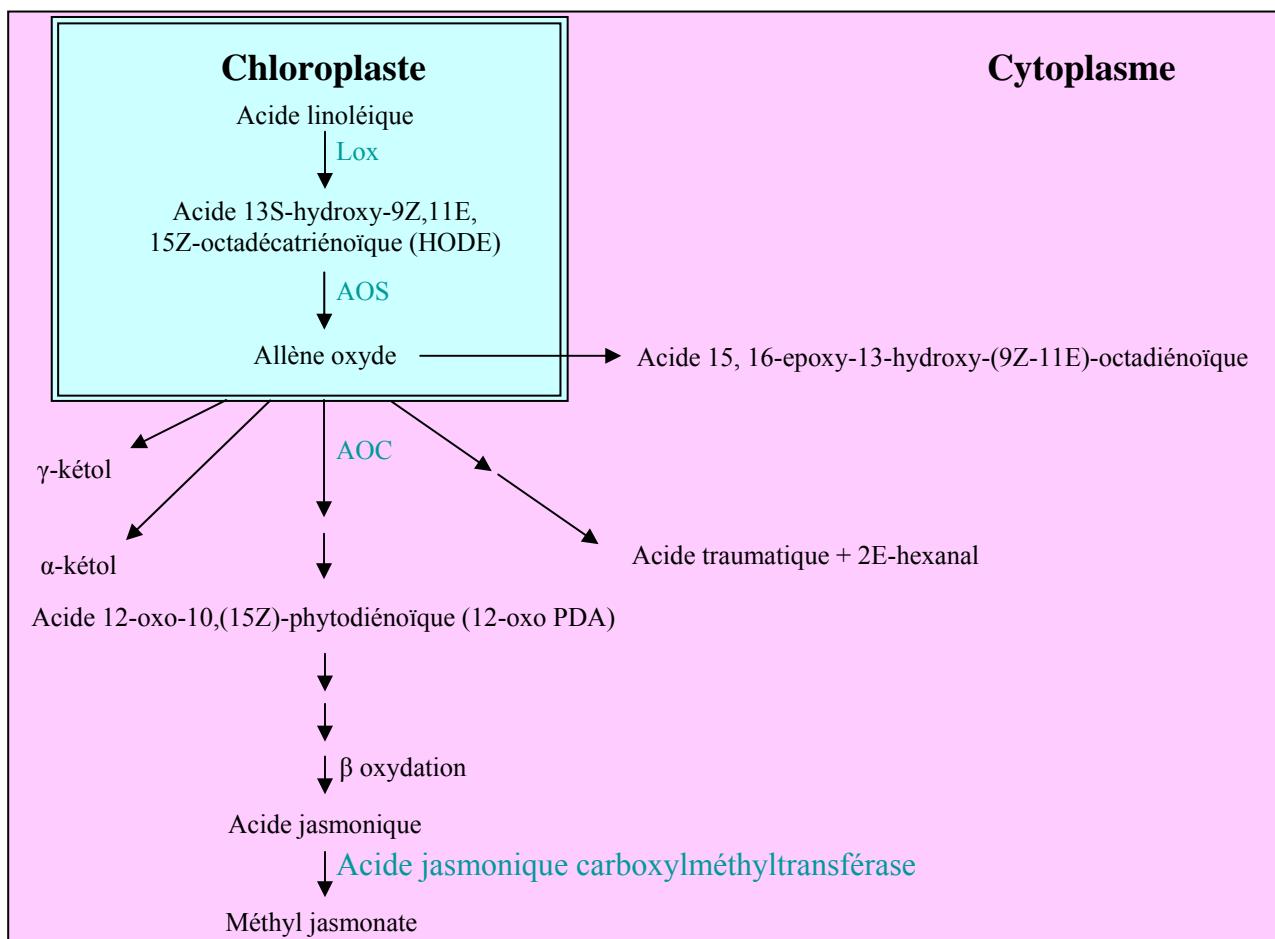


Figure 7 : Voie de biosynthèse de l'acide jasmonique (d'après Wasternack *et al.* 1998).
Enzymes - AOC : allène oxyde cyclase, AOS : allène oxyde synthase, Lox : lipoygénase

concentration en EAO dans les cellules de garde (Pei *et al.* 2000 ; Zhang *et al.* 2001 ; Zhu *et al.* 2002). Ces messagers, ainsi que la cascade des MAPKs, sont également présents durant les interactions plante/pathogène et lorsque la concentration de Ca^{2+} cytoplasmique augmente (Himmelbach *et al.* 2003). Une voie de signalisation Ca^{2+} dépendante (Figure 6) régulatrice de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'AAB durant un stress hydrique ou salin a récemment été mise en évidence (Xiong *et al.* 2002b ; Xiong et Zhu 2003).

Plusieurs travaux ont montré l'implication de l'AAB dans l'acclimatation des plantes au froid (Thomashow 1999 ; Xiong *et al.* 2001 ; Chinnusamy *et al.* 2006) en induisant notamment l'expression de gènes COR chez le tournesol (White *et al.* 1994), la tomate (Wu *et al.* 1997), l'orge (White *et al.* 1994) ou le colza (Sangwan *et al.* 2001). Un traitement avec de l'AAB permet de mimer la vernalisation et induit la tolérance et l'acclimatation au froid chez l'orge (Bravo *et al.* 1998). Durant un stress froid, l'AAB induit l'accumulation de thaumatin-like sur des suspensions cellulaires de blé (Kuwabara *et al.* 1999), ainsi que des chitinases sur des cultures cellulaires de tabac (Rezzonico *et al.* 1998) et de tomate (Yu *et al.* 1998). Par contre, il réprime des β -1,3-glucanases sur les cultures cellulaires et durant la germination chez le tabac (Leubner-Metzger *et al.* 1998 ; Rezzonico *et al.* 1998).

Enfin, il semble que l'AAB régule sa propre production en agissant sur différents gènes impliqués dans sa synthèse (Xu *et al.* 2002 ; Xiong *et al.* 2002c ; Kushiro *et al.* 2004 ; Saito *et al.* 2004 ; Nambara et Marion-Poll 2005). De par ses nombreuses implications, l'AAB est donc un des acteurs principaux des mécanismes de défense chez les plantes.

1.4.2.3. L'acide jasmonique

Chez les plantes, l'AJ intervient dans le développement, l'induction de la sénescence et la mise en place des défenses (Creelman et Mullet 1997 ; Wasternack et Parthier 1997 ; Lorenzo et Solano 2005).

Les précurseurs de l'AJ sont des acides gras poly-insaturés (Figure 7) tels que l'acide linoléique (Conconi *et al.* 1996 ; Mueller 1997). Ces acides gras sont ensuite oxydés et cyclisés par l'action de la lipoxygénase (Lox), de l'allène oxyde synthase (AOS), de l'allène oxyde cyclase (AOC), des enzymes de la voie de synthèse des octadécanoïdes, pour donner finalement l'AJ (Figure 7) puis le méthyl-jasmonate (MJ) par l'action de l'acide jasmonique carboxyméthyl-transférase (Schaller 2001). La Lox et l'AOS sont chloroplastiques, tandis que l'AOC est située dans le cytosol (Wasternack *et al.* 1998). L'AOC est la première enzyme spécifique de la voie de synthèse de l'AJ (Kramell *et al.* 2000 ; Stenzel *et al.* 2003 ; Maucher

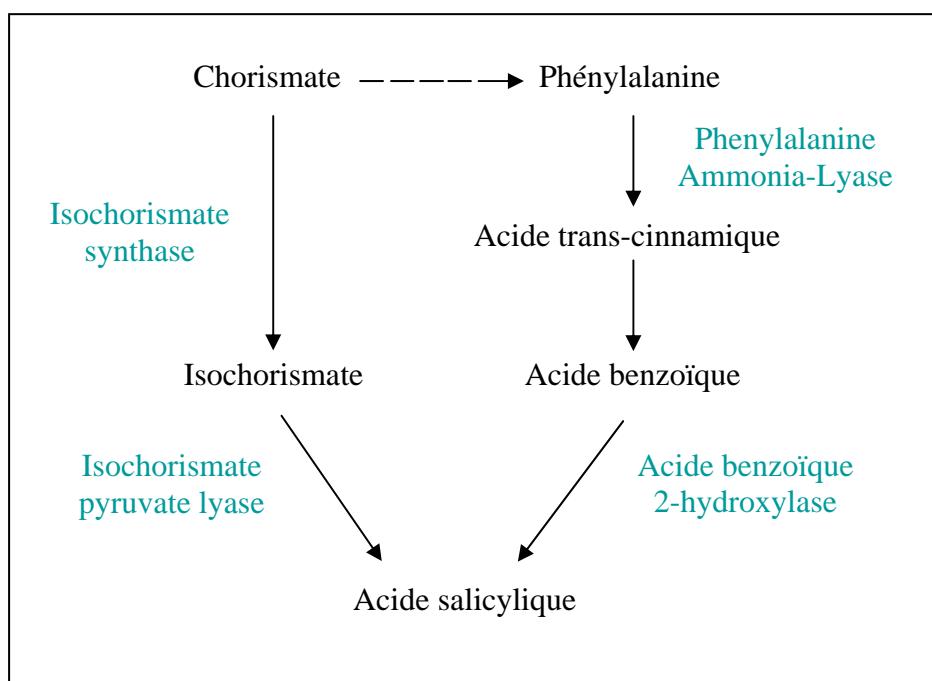


Figure 8 : Voie de biosynthèse de l'acide salicylique (adaptée de Ogawa *et al.* 2006).

et al. 2004). La synthèse de l'AJ, du MJ mais aussi des autres oxylipines issues de la voie des octadécanoïdes (dérivés aldéhyde, kétol, époxy, hydroxy et divinyl-éther) est régulée en réponse aux différents stress biotiques ou abiotiques (Schaller 2001 ; Howe et Schilmiller 2002 ; Stenzel *et al.* 2003 ; Afitlhile *et al.* 2005).

L'AJ et le MJ sont impliqués dans l'induction de nombreuses réponses de défense telles que la synthèse d'inhibiteurs de protéases (Farmer et Ryan 1992), d'osmotines, de thionines, de défensines (Xu *et al.* 1994 ; Penninckx *et al.* 1996) ou de protéines impliquées dans le renforcement de la paroi cellulaire (Creelman *et al.* 1992 ; Creelman et Mullet 1997). Ils interviennent également dans l'accumulation de métabolites secondaires (Gundlach *et al.* 1992 ; Nojiri *et al.* 1996 ; Agrawal *et al.* 2002) comme par exemple les enzymes de la voie des phytoalexines (Gundlach *et al.* 1992 ; Agrawal *et al.* 2002). La blessure entraîne une synthèse d'AJ chez la tomate mais pas chez l'orge (Bücking *et al.* 2004).

L'application de MJ sur des feuilles de tomate, de tabac, ou de luzerne induit des inhibiteurs de protéases plus efficacement que la blessure (Farmer *et al.* 1992 ; Ryan 1992). Chez le soja, l'AJ appliqué sur cultures cellulaires, induit une accumulation des transcrits de la Phénylalanine Amonia Lyase (PAL) et une augmentation de son activité (Gundlach *et al.* 1992). Chez le riz, l'application d'AJ ou de H₂O₂ sur les feuilles induit une augmentation de la synthèse d'AOS induisant donc la synthèse d'AJ (Agrawal *et al.* 2002). L'application d'un stress, d'éliciteurs ou de sulfate de cuivre engendre aussi une accumulation d'AJ dans les tissus de riz (Agrawal *et al.* 2002).

L'AJ est donc largement impliqué dans les mécanismes d'adaptation des plantes en réponse à divers stress biotiques et abiotiques.

1.4.2.4. L'acide salicylique

L'AS est impliqué dans de nombreux processus physiologiques comme le retardement de la sénescence ou l'induction de la floraison, mais aussi dans les réponses de défense chez les plantes (Martinez *et al.* 2004).

L'AS a pour précurseur la phénylalanine (Figure 8). Il est synthétisé à partir de l'acide trans-cinnamique *via* l'acide benzoïque (AB) formé sous l'action de la PAL. La conversion de l'AB en AS est effectuée par l'acide benzoïque-2-hydroxylase dont l'activité est induite en réponse notamment à un stress biotique (Leon *et al.* 1993). Il peut également être produit à partir du chorismate *via* l'isochorismate par l'action de l'isochorismate synthase puis de l'isochorismate pyruvate lyase (Ogawa *et al.* 2006).

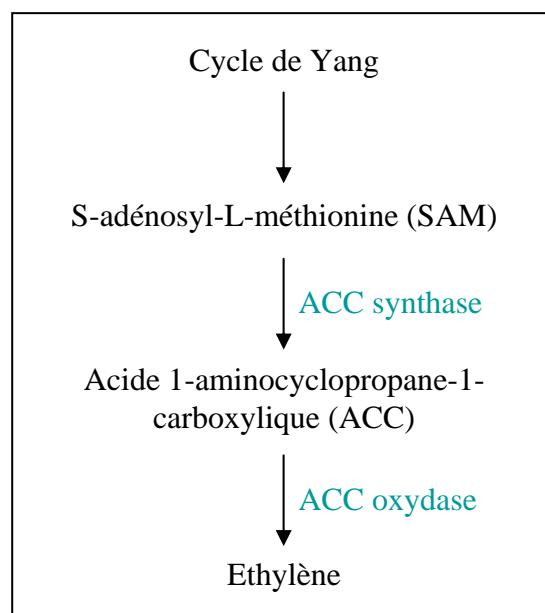


Figure 9 : Voie de biosynthèse de l'éthylène (adaptée de Bleecker et Kende 2000).
ACC : acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique

L'application d'AS exogène inhibe la synthèse d'éthylène, diminue la photosynthèse et ralentit la croissance chez l'orge (Uzunova et Popova 2000). Chez *A. thaliana*, le concombre et le tabac, différents travaux montrent un lien entre la teneur endogène en AS et la résistance à divers stress biotiques (Malamy *et al.* 1990 ; Métraux *et al.* 1990 ; Uknas *et al.* 1993) ou abiotiques (Yalpani *et al.* 1994). Inversement, chez le riz ou la pomme de terre, l'augmentation de la quantité d'AS ne semble pas être suffisante pour induire une résistance (Coquoz *et al.* 1995 ; Silverman *et al.* 1995 ; Chen *et al.* 1997). Dans ce dernier cas, la résistance est due à une augmentation de la sensibilité à l'AS plutôt qu'à l'augmentation de sa synthèse (Yu *et al.* 1997).

La production d'AS est très souvent corrélée à l'accumulation de protéines PR. Chez le tabac, l'AS pourrait également être lié à l'augmentation d' H_2O_2 par inhibition d'une catalase impliquée dans sa détoxification (Conrath *et al.* 1997 ; Dong 1998). Il induit l'accumulation des transcrits de la PAL et l'activité MAP-kinase chez le tabac (Zhang et Klessig 1997). L'AS détient un rôle clé dans l'établissement de la résistance systémique acquise et dans son maintien par l'expression de gènes tels que ceux codant des β -1,3-glucanases, chitinases et PR-1 (Linhorst 1991, Ryals *et al.* 1996, Dempsey *et al.* 1999). Chez l'orge l'accumulation d'AS n'est pas nécessaire à l'induction d'expression des gènes de défense en réponse à une infection (Vallelian-Bindchedler *et al.* 1998). L'AS est donc important dans la défense chez les céréales, notamment en réponse à des stress biotiques mais il ne constitue pas le signal de déclenchement des mécanismes de défense (Agrawal *et al.* 2002).

1.4.2.5. L'éthylène

L'éthylène est une hormone végétale volatile synthétisée à partir de la S-adénosylméthionine (Figure 9). L'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) synthétase permet la formation de l'ACC ensuite oxydé par l'ACC oxydase pour former l'éthylène (Kende 1993 ; Bleeker et Kende 2000).

L'ET est impliqué dans la germination, la sénescence, l'abscission des fleurs et des feuilles ainsi que la maturation des fruits (Ecker 1995 ; Bleeker et Kende 2000). Sa synthèse est induite en réponse à des stress biotiques (Hoffman *et al.* 1999) et abiotiques (O'Donnell *et al.* 1996). Il est notamment induit en réponse à une blessure, une infection virale, un stress froid, l'exposition aux métaux lourds ou encore la sécheresse (Theologis 1992 ; Ecker 1995). L'ET stimule la synthèse de protéines qui ont un rôle dans le renforcement des parois cellulaires (Enyedi *et al.* 1992).

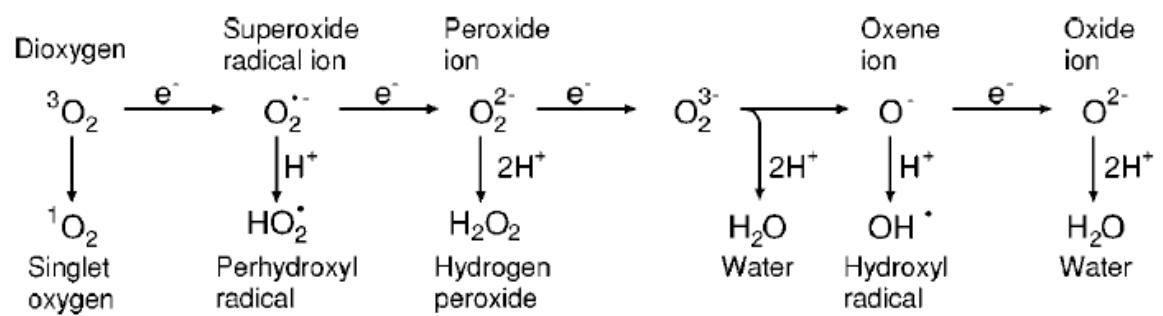


Figure 10 : Synthèse des EAO suite à l'excitation de l' O_2 et aux différents transferts d'électrons possibles (Apel et Hirt 2004).

Il existe des relations entre les voies de l'AAB et de l'ET. En effet, des plantes *d'Arabidopsis* mutées, présentant une sensibilité diminuée à l'ET, ont une sensibilité accrue pour l'AAB (Ghassemian *et al.* 2000). De même des expériences menées chez le riz ont montré que l'ET joue un rôle en tant que régulateur négatif de la synthèse d'AAB (Kende *et al.* 1998). Ces résultats montrent l'influence de l'éthylène dans la sensibilité des plantes à l'AAB.

L'ET est également impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux gènes, dont ceux codant des protéines PR et notamment des glucanases et des chitinases (Bol *et al.* 1990 ; Samac *et al.* 1990 ; Deikman 1997). Chez la tomate, l'ET est nécessaire mais pas suffisant pour induire la réponse à la blessure, l'AJ est également requis (O'Donnell *et al.* 1996). L'ET diminue l'expression de gènes induits par l'AJ chez le tabac (Shoji *et al.* 2000) alors que la synthèse d'ET est stimulée par l'application d'AJ chez la tomate (O'Donnell *et al.* 1996). Il a été suggéré que l'interaction négative qui pouvait exister entre l'ET et l'AJ pouvait être utilisée par la plante et lui permettre de réguler au mieux la réponse selon les stress (Rojo *et al.* 1999).

Chez le tabac, l'ET n'est pas directement impliqué dans la transduction du signal qui conduit à l'accumulation de protéines PR acides et à l'induction de la résistance systémique acquise (Brederode *et al.* 1991), il n'est pas non plus impliqué dans l'accumulation de l'AS (Silverman *et al.* 1993 ; Lawton *et al.* 1994 ; 1995).

L'AJ et l'ET sont impliqués dans l'établissement de la résistance systémique induite, indépendamment de l'AS, et dans l'établissement de la réponse à la blessure et aux insectes (Pieterse *et al.* 1996 ; Dong 1998 ; Van Wees *et al.* 2000). Les voies de signalisation de l'AJ, l'AAB, l'ET ainsi que l'AS et ses dérivés se régulent mutuellement (Doherty *et al.* 1988 ; Pena-Cortes *et al.* 1993 ; Doares *et al.* 1995 ; Vidal *et al.* 1997). Elles sont complémentaires et permettent donc à la plante de mettre en place les mécanismes de défense adaptés à chaque type de stress (Thomma *et al.* 1998 ; Lorenzo et Solano 2005).

1.4.2.6. Les espèces activées de l'oxygène

Les EAO sont les formes partiellement réduites de l' O_2 atmosphérique (Mittler 2002). Elles résultent de l'excitation de l' O_2 et du transfert d'un ou plusieurs électrons (Figure 10) menant à la formation de l'oxygène singulet 1O_2 , du radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$, de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , ou du radical hydroxyle OH^{\bullet} (Apel et Hirt 2004).

Chez les plantes, en conditions non stressantes, la production des EAO est principalement assurée par les chloroplastes (Polle 2001) et les mitochondries (Eltsner et Osswald 1994 ; Vanlerberghe *et al.* 1997). Les EAO sont produites en permanence comme co-produits de différentes voies métaboliques (Hammond-Kosack et Jones 1996 ; Pei *et al.* 2000 ; Mittler 2002 ; Apel et Hirt 2004). La source principale d'EAO chez les plantes est la photosynthèse (Apel et Hirt 2004). L'accepteur d'électrons de l'appareil photosynthétique est le CO₂. Or la fixation par le CO₂ chez les plantes ne permet pas d'utiliser toute l'énergie lumineuse (Baker 1991). D'autres accepteurs d'électrons doivent donc intervenir, dont l'O₂ qui va conduire à la formation d'EAO. Les autres sources d'EAO en conditions normales sont la photorespiration et la respiration mitochondriale (Mittler 2002 ; Apel et Hirt 2004). Les EAO sont dangereuses pour la plante car elles peuvent conduire à des dommages oxydatifs importants, en particulier des membranes, et engendrer la destruction de la cellule si elles sont en trop forte concentration (Hammond-Kosack et Jones 1996 ; Asada 1999 ; Dat *et al.* 2000).

Les EAO sont également produites en conditions de stress. En effet, la sécheresse, les chocs thermiques, les métaux lourds, les ultraviolets, l'ozone, une carence en nutriments ou les attaques de pathogènes induisent une production rapide et massive d'EAO (Lamb et Dixon 1997 ; Dat *et al.* 2000 ; Grant et Loake 2000 ; Pei *et al.* 2000 ; Wohlgemuth *et al.* 2002 ; Hammond-Kosack et Parker 2003 ; Apel et Hirt 2004 ; Chinnusamy *et al.* 2006). Dans le cadre d'un stress biotique, les EAO ont un rôle de défense car elles sont toxiques pour l'agresseur. Mais elles servent également de second messager et engendrent généralement une mort cellulaire programmée dans les tissus infectés afin de limiter la propagation du pathogène (Orozco-Cardenas et Ryan 1999 ; Dangl et Jones 2001 ; Orozco-Cardenas *et al.* 2001 ; Apel et Hirt 2004). Pour les stress abiotiques, les EAO servent essentiellement de second messager et sont à l'origine de l'induction d'expression d'un grand nombre de gènes de défense ainsi que de nombreux facteurs de transcription (Doke *et al.* 1996 ; Low et Merida 1996 ; Lamb et Dixon 1997 ; Desikan *et al.* 2001 ; Apel et Hirt 2004 ; Chinnusamy *et al.* 2006) et peuvent engendrer une synthèse d'AS (Leon *et al.* 1995 ; Low et Merida 1996 ; Lamb et Dixon 1997). La production d'EAO participe au renforcement de la paroi cellulaire (Brisson *et al.* 1994 ; Wei *et al.* 1998 ; Xiang et Zhu 2002) en augmentant notamment la synthèse de lignine (Iiyama *et al.* 1994).

Les EAO agissent donc comme des indicateurs cellulaires du stress. Elles servent de second messager pour l'activation de la réponse aux stress et la mise en place des mécanismes de défense (Dalton *et al.* 1999 ; Knight et Knight 2001 ; Mittler 2002 ; Apel et Hirt 2004). En raison de leur toxicité mais également de leur rôle important, les plantes mettent en place

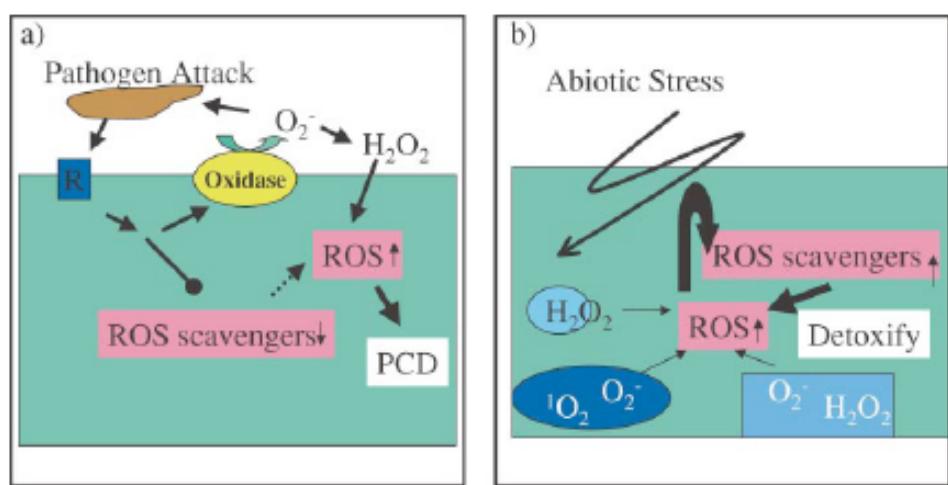


Figure 11 : Production et effets des EAO suite à un stress biotique (a) ou abiotique (b)
(Apel et Hirt 2004).

plusieurs mécanismes de régulation des EAO (Apel et Hirt 2004). Les principaux mécanismes de détoxification font intervenir la superoxyde dismutase -SOD-, l'ascorbate peroxydase -APX-, les catalases -CAT- ou les glutathion peroxydases -GPX- selon les stress (Dat *et al.* 2000 ; Desikan *et al.* 2001 ; Orozco-Cardenas *et al.* 2001 ; Bolwell *et al.* 2002 ; Mittler 2002). La synthèse de ces différentes enzymes couplée à la production de composés anti-oxydants, tels que les vitamines C et E, des flavonoïdes et des caroténoïdes induites par les EAO contribue à renforcer la protection cellulaire durant le stress (Larson 1995 ; Vanacker *et al.* 2000). Dans le cas d'un stress biotique, notamment lors de la réponse hypersensible, la synthèse d'EAO augmente *via* des NADPH oxydases et des peroxydases. Le mécanisme de détoxification diminue (Hammond-Kosack et Jones 1996 ; Dat *et al.* 2000 ; Mittler 2002), alors que suite à une augmentation de la production d'EAO induite par un stress abiotique, la plante augmente son mécanisme de détoxification (Figure 11). Les EAO se retrouvent donc à l'interface des mécanismes de défense induits par les stress biotiques et abiotiques.

1.4.2.7. Défenses et protéines PR

1.4.2.7.1. Gènes de défense

De nombreuses interconnexions existent entre les voies de signalisation et les profils d'expression des gènes impliqués dans la réponse aux stress (Durrant *et al.* 2000 ; Schenk *et al.* 2000 ; Seki *et al.* 2001 ; Chen *et al.* 2002 ; Chinnusamy *et al.* 2004 ; Langridge *et al.* 2006). Chez *Arabidopsis* (Seki *et al.* 2002) ainsi que chez l'orge (Ozturk *et al.* 2002), les mêmes gènes sont induits en réponse à la sécheresse et au stress salin. De même les combinaisons de stress froid et sécheresse d'une part et stress salin couplé à l'AAB d'autre part, engendrent les mêmes profils d'expression que la blessure chez *Arabidopsis* (Cheong *et al.* 2002). Les gènes induits par les stress abiotiques codent notamment des enzymes impliquées dans la voie des phospholipides, dans le métabolisme des acides gras (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki 2006) ou encore dans le métabolisme des sucres (Atienza *et al.* 2004). Les stress abiotiques peuvent également engendrer la production de protéines chaperonnes (Wang *et al.* 2003 ; Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki 2006), d'enzymes de détoxification (Seki *et al.* 2002), de molécules osmorégulatrices (Cushman et Bohnert 2000 ; Maruyama *et al.* 2004 ; Verslues *et al.* 2006), de transporteurs d'eau et d'ions (Wang *et al.* 2003), ainsi que de protéines kinases (Guo *et al.* 2001 ; Knight et Knight 2001). Des protéines aux propriétés anti-oxydantes (Shen *et al.* 1997 ; Langridge *et al.* 2006), des déhydrines (Close 1997 ; Verslues *et al.* 2006 ; Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki 2006), des protéines impliquées

dans le développement embryonnaire -late embryogenesis abundant protein ou protéines LEA- (Thomashow 1999 ; Cushman et Bohnert 2000 ; Yu et Griffiths 2001), ainsi que des protéines PR (Derckel *et al.* 1998 ; Yu et Griffiths 2001 ; Chinnusamy *et al.* 2006 ; Langridge *et al.* 2006) peuvent également être synthétisées en réponse à divers stress biotiques et abiotiques.

L'exposition au froid induit chez les plantes l'expression de facteurs de transcription et de gènes COR -cold-regulated- (Thomashow 1999 ; Xiong *et al.* 2002a ; Chinnusamy *et al.* 2006). Ces gènes sont également induits en réponse à la sécheresse chez le seigle (Yu et Griffiths 2001). Les protéines codées par les gènes COR présentent des propriétés biochimiques équivalentes aux protéines LEA (Yu et Griffiths 2001). Ces protéines permettent de stabiliser la membrane et les protéines membranaires (Yu et Griffiths 2001 ; Bravo *et al.* 2003 ; Langridge *et al.* 2006).

Chez l'orge une carence en eau mène à la surexpression des gènes codant l'allène oxyde synthase (AOS), des protéines de réponse à l'AJ, des protéines LEA et des protéines impliquées dans l'osmoprotection (Talame *et al.* 2007). La combinaison entre un stress froid et une faible luminosité conduit à l'induction des gènes impliqués dans le métabolisme des sucres (Atienza *et al.* 2004). Les gènes codant des GST (gluthation-S-transférase), enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse du glutathion, sont également induits en réponse à divers stress abiotiques (Frova 2003 ; Atienza *et al.* 2004).

1.4.2.7.2. Cas particulier des protéines PR

Les protéines PR ("Pathogenesis Related proteins") sont définies comme des protéines induites en réponse à l'attaque de pathogènes ou en réponse à des composés capables de mimer une telle attaque (Van Loon *et al.* 1994 ; Van Loon 1999). Elles constituent ainsi une composante des réponses de défense actives chez les plantes. Elles sont produites aussi bien lors de la mise en place des mécanismes de défense en réponse à des stress biotiques (Hammond-Kosack et Jones 1996 ; Penninckx *et al.* 1996 ; Peltonen 1999) qu'à des stress abiotiques (Schutzendubel et Polle 2002 ; Chinnusamy *et al.* 2004 ; Chinnusamy *et al.* 2006 ; Verslues *et al.* 2006). Dans ce dernier cas elles peuvent être appelées PR-like mais ce terme n'est que peu utilisé (Van Loon *et al.* 2006). La difficulté à définir les différences entre les protéines PR et les protéines "PR-like" a conduit à l'adoption du terme protéines PR pour l'ensemble de ces protéines (Van Loon *et al.* 2006).

Tableau 6 : Les 17 familles de protéines PR (Van Loon *et al.* 2006).

Family	Type member	Properties
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown
PR-2	Tobacco PR-2	β -1,3-glucanase
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Tobacco ‘R’	Chitinase type I, II
PR-5	Tobacco S	Thaumatin-like
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor
PR-7	Tomato P ₆₉	Endoproteinase
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III
PR-9	Tobacco “lignin-forming peroxidase”	Peroxidase
PR-10	Parsley “PR1”	Ribonuclease-like
PR-11	Tobacco “class V” chitinase	Chitinase, type I
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase
PR-16	Barley OxOLP	Oxalate-oxidase-like
PR-17	Tobacco PRp27	Unknown

Elles ont été découvertes dans des feuilles de tabac infectées par le virus de la mosaïque du tabac (Gianinazzi *et al.* 1970 ; Van Loon et Van Kammen 1970). Depuis, de nombreux travaux ont montré que ces protéines s'accumulent suite à une infection (virus, viroïdes, bactéries, champignons), divers traitements chimiques (AJ, AS, H₂O₂) et des stress abiotiques tels que les blessures, le froid, un stress salin ou les UV (Van Loon 1999 ; Van Loon *et al.* 2006). Elles ont même été localisées dans le pistil et certains travaux relatent une régulation développementale dans les fleurs et les fruits (Lotan *et al.* 1989 ; Liljeroth *et al.* 2005). Certaines protéines PR possèdent une activité antifongique et parfois antibactérienne (Schultheiss *et al.* 2003). Elles sont majoritairement acides et localisées dans l'espace extracellulaire. Les isoformes basiques sont localisées dans la vacuole (Stintzi *et al.* 1993 ; Bryngelsson *et al.* 1994 ; Kitajima et Sato 1999).

Chez le tabac, l'expression des gènes codant les protéines PR acides est généralement induite au cours de la résistance systémique acquise *via* l'AS (Friedrich *et al.* 1995 ; Dempsey *et al.* 1999). Pour les gènes codant les PR basiques, leur induction est indépendante de l'AS (Vidal *et al.* 1997) mais dépendante de l'ET (Deikman 1997).

Dix-sept familles (Tableau 6) de protéines PR ont été répertoriées à ce jour (Van Loon *et al.* 2006). Elles sont classées en fonction de leur mécanisme d'action, de leur structure, de leur parenté sérologique et de leurs homologies de séquence (Van Loon 1999).

1.4.3. Embryogenèse pollinique et gènes de défense

Nous avons vu que la réussite de l'embryogenèse pollinique dépendait du prétraitement. Ces dernières années, plusieurs travaux ont montré des variations d'expression de gènes ainsi que la production de différentes protéines durant l'embryogenèse pollinique chez diverses espèces. Des comparaisons entre l'embryogenèse pollinique et l'embryogenèse somatique ont permis de supposer l'implication de certains gènes dans le processus de réorientation du programme de la microspore (Maraschin *et al.* 2005b).

Les gènes dont l'expression est modifiée durant l'embryogenèse pollinique sont :

- des gènes intervenant en réponse à l'AAB (Reynolds et Crawford 1996 ; Van Bergen *et al.* 1999 ; Maraschin *et al.* 2005b ; Tsuwamoto *et al.* 2007) ou aux cytokinines (Kyo *et al.* 2000) ;

- des gènes codant des protéines intervenant dans la protection cellulaire telles que des "Heat Shock Proteins" (Zivy *et al.* 1992 ; Devaux et Zivy 1994 ; Binarova *et al.* 1997 ; Cordewener *et al.* 1997 ; Zhao *et al.* 2003) qui augmentent la thermotolérance (Schöffl *et al.*

1998 ; Muñoz-Amatriaín *et al.* 2006) ou la Glutathion-S-Transférase (Vrinten *et al.* 1999 ; Muñoz-Amatriaín *et al.* 2006 ; Joosen *et al.* 2007 ; Malik *et al.* 2007 ; Tsuwamoto *et al.* 2007) qui est associée à la protection de la cellule contre les effets nocifs des EAO (Maraschin *et al.* 2006) ;

- des gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme carboné voient leur expression réprimée (Maraschin *et al.* 2006 ; Muñoz-Amatriaín *et al.* 2006) ;

- plusieurs travaux ont montré l'induction de gènes codant des protéases durant l'embryogenèse somatique (Jamet *et al.* 1990 ; Thibaud-Nissen *et al.* 2003 ; Mitsushashi *et al.* 2004). Il apparaît qu'il en est de même pour l'embryogenèse pollinique chez *Brassica napus* (Boutilier *et al.* 2005) et l'orge (Maraschin *et al.* 2006) ;

- des gènes induits lors de la formation de l'embryon zygotique ou somatique peuvent également être sur-exprimés lors de la formation de l'embryon pollinique (Boutilier *et al.* 1994 ; Toonen *et al.* 1997 ; Perry *et al.* 1999 ; Vrinten *et al.* 1999 ; Baudino *et al.* 2001 ; Boutilier *et al.* 2002 ; Maraschin *et al.* 2006 ; Joosen *et al.* 2007 ; Tsuwamoto *et al.* 2007), tels que les gènes *BABY BOOM*, *LEAFY COTYLEDON 1* et *2* ou *LIPID TRANSFER PROTEIN* (PR14) par exemple.

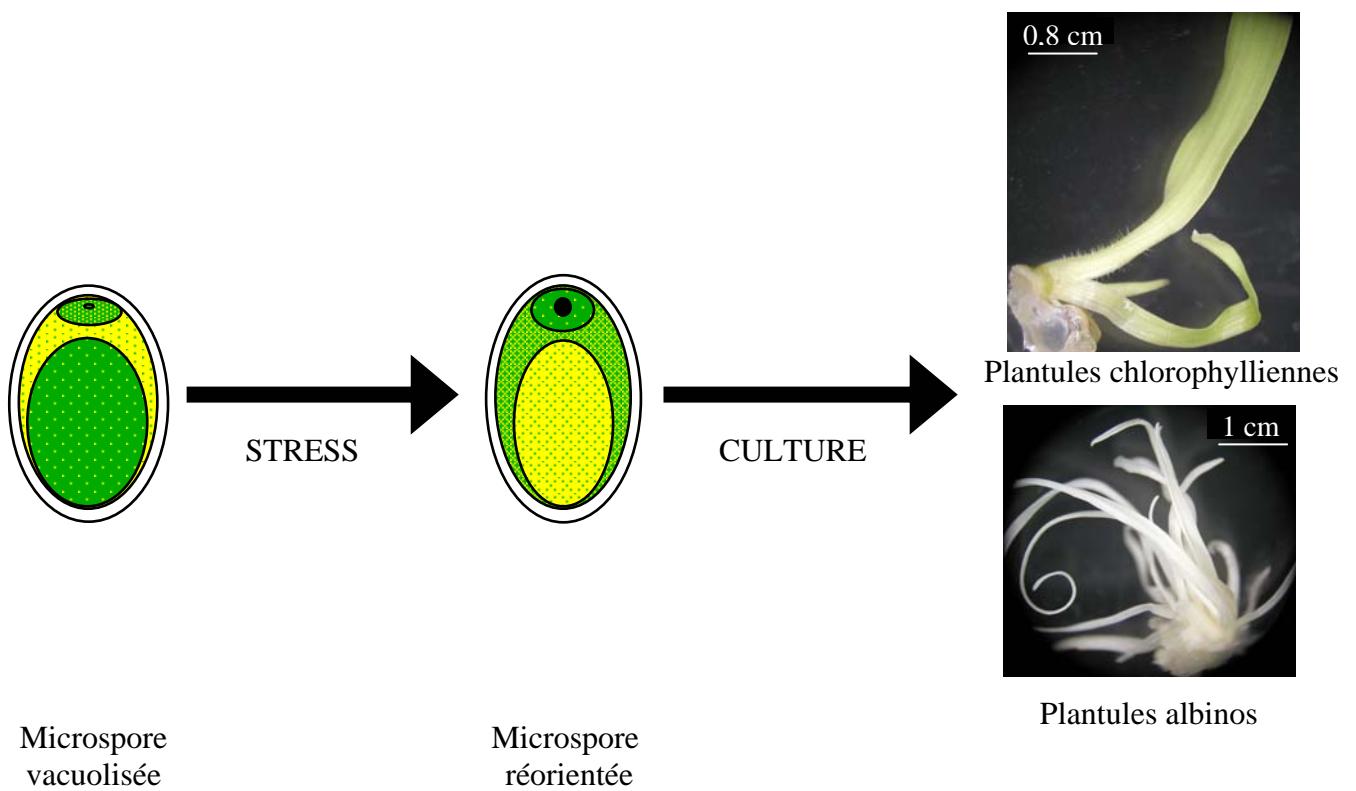
L'ensemble de ces travaux porte sur la culture de microspores, après le prétraitement ou durant la phase de culture. Quelques travaux récents commencent à préciser les mécanismes induits lors de l'embryogenèse pollinique. Durant la culture de microspores isolées chez le maïs, la formation de l'embryon engendre une sécrétion de protéines glycosylées : des "ArabinoGalactan Proteins" ou AGP (Paire *et al.* 2003) et des oligosaccharides sont secrétés dans le milieu (Borderies *et al.* 2004). Des travaux précédents ont montré la sécrétion de chitinases dans le milieu lors de la culture *in vitro* de suspensions cellulaires d'orge (Kragh *et al.* 1991), de riz (Inui *et al.* 1996) et de carotte (Van Hengel *et al.* 1998). Les chitinases avaient été identifiées comme responsables de la synthèse d'oligosaccharides dans les suspensions cellulaires d'orge (Kragh *et al.* 1991) et lors de l'embryogenèse somatique de chicorée sauvage (Helleboid *et al.* 1998 ; Helleboid *et al.* 2000). En conclusion de leurs travaux, Borderies *et al.* (2004) proposaient alors que la production des oligosaccharides était due au clivage des AGP par les chitinases, bien qu'ils n'aient pas vérifié leur synthèse lors de leurs expériences. Ces travaux étaient les premiers à démontrer la synthèse de protéines spécifiques à l'embryogenèse pollinique (Paire *et al.* 2003 ; Borderies *et al.* 2004).

L'utilisation de banques EST (Boutilier *et al.* 2005 ; Maraschin *et al.* 2006 ; Malik *et al.* 2007) et de puces à ADN (Muñoz-Amatriaín *et al.* 2006 ; Joosen *et al.* 2007) a permis

d'identifier des modifications d'expression de nombreux gènes et de confirmer les suppositions émises précédemment. Les travaux de Maraschin *et al.* (2006) et de Muñoz-Amatriaín *et al.* (2006), menés sur culture de microspores d'orge suite à un traitement au mannitol, ont confirmé la modification d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme, le développement cellulaire ou la protection cellulaire, ainsi que des gènes codant des facteurs de transcription et des gènes impliqués dans la réponse aux stress et la défense (Maraschin *et al.* 2006 ; Muñoz-Amatriaín *et al.* 2006). La réorientation de la microspore nécessite des modifications d'expression de nombreux gènes et facteurs de transcriptions, engendrant d'importants changements métaboliques. Ainsi chez l'orge le gène *Bi1* (Bax inhibitor), qui intervient dans l'inhibition de la mort cellulaire programmée est induit (Maraschin *et al.* 2006). Chez le colza, aucun gène impliqué dans la mort cellulaire programmée n'est induit (Joosen *et al.* 2007 ; Malik *et al.* 2007). L'inhibition de la mort cellulaire programmée semble donc nécessaire pour permettre la réorientation de la microspore.

L'ensemble des résultats montrent l'expression de ces gènes pendant la phase de culture des microspores, mais personne ne s'est encore intéressé à l'expression de ces gènes pendant le prétraitement, qui est, rappelons-le, la phase clé de la technologie HD.

Objectifs du doctorat



-  Quels facteurs influent sur la réussite de l'embryogenèse pollinique ?
-  Comment améliorer le rendement en plantules chlorophylliennes ?
-  L'application du stress induit-il une réponse de défense dans les anthères ?

L'embryogenèse pollinique conduit à la régénération de plantules albinos chez l'orge. Ce frein à l'amélioration et à la sélection par cette technique est pour le moment mal compris et non maîtrisé. Le doctorat a visé dans un premier temps à améliorer l'obtention de plantules HD chlorophylliennes chez les cvs. récalcitrants d'orge (*Hordeum vulgare* L.). Au plan fondamental, nous avons cherché à comprendre les mécanismes déclenchés par le prétraitement et permettant la réorientation de la microspore en focalisant sur les défenses activées par le stress. Le cv. d'hiver Igri régénère une majorité de plantules chlorophylliennes et le cv. de printemps Cork régénère une majorité de plantules albinos. Malgré cette différence de pourcentage de plantules chlorophylliennes régénérées, ces deux cvs présentent les mêmes paramètres de culture (Carreda et Clément 1999). Nous les avons donc utilisé comme modèle d'étude afin de tenter de mettre en évidence une différence de réaction pouvant expliquer les variations de comportement obtenues en embryogenèse pollinique.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à l'amélioration et à l'optimisation du protocole de culture d'anthères. Afin de favoriser la régénération de plantules chlorophylliennes, nous avons testé :

- les effets du sulfate de cuivre sur la culture d'anthères chez le cv. d'hiver Igri ainsi que chez les cvs. de printemps Cork, Madras, Prisma, Douchka et Scarlett réputés récalcitrants à la régénération de plantules chlorophylliennes. Les travaux préliminaires (Wojnarowicz *et al.* 2002 - publication II) ayant montré une amélioration de la régénération de plantules chlorophylliennes chez le cv. modèle Igri, nous avons voulu tester l'effet du sulfate de cuivre sur les cvs. récalcitrants ;
- l'influence de la saison à laquelle la technique est appliquée sur le rendement en plantules chlorophylliennes. La bibliographie relatant l'influence de la saison sur l'embryogenèse pollinique (Ritala *et al.* 2001), il semblait opportun de tester ce paramètre sur nos cvs. ;
- l'influence de la position de l'épi sur le plateau de tallage. Les talles présentent des différences au niveau de l'assimilation en azote et en carbone (Kirby *et al.* 1985) ainsi qu'une différence d'exposition à la lumière (Abeledo *et al.* 2004) selon leur position sur le plateau de tallage. Nous avons donc voulu tester si les différences physiologiques dues à la position de l'épi sur le plateau de tallage influaient sur la culture d'anthères.

Les résultats sont présentés sous forme de publications dont certaines sont déjà parues et les autres soumises ou en préparation pour soumission imminente.

Publication 2 : Wojnarowicz G, **Jacquard C**, Devaux P, Sangwan RS, Clément C (2002).

Influence of copper sulfate on anther culture in barley (*Hordeum vulgare L.*)

Plant Science 162 : 843 - 847. FI : 1,605

Nous avons testé différentes concentrations de sulfate de cuivre pour chacune des étapes de l'embryogenèse pollinique chez le cv. d'hiver Igri. La concentration de 10 µM dans les milieux de prétraitement et de culture a donné les meilleurs résultats. En effet cette concentration permet d'augmenter la survie des microspores durant le prétraitement, la réponse des anthères, le nombre de plantules régénérées, ainsi que le pourcentage de plantules chlorophylliennes régénérées.

Publication 3 : **Jacquard C**, Nollin F, Hécart C, Zuka A, Graudal D, Rashal I, Sangwan RS,

Devaux P, Mazeyrat-Gourbeyre F and Clément C. Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. Soumise à Plant Biotechnology Journal.

Suite aux résultats positifs obtenus pour le cv. d'hiver Igri, nous avons testé l'effet du sulfate de cuivre sur la culture d'anthères chez les cvs. de printemps. Une concentration de 10 µM permet d'induire la formation d'HD chlorophylliennes à partir de cvs. régénérant 100% d'albinos et d'augmenter le pourcentage de plantules chlorophylliennes régénérées chez les cvs. particulièrement récalcitrants à l'embryogenèse pollinique.

Publication 4 : **Jacquard C**, Asakaviciute R, Hamalian A, Sangwan RS, Devaux P, Clément C (2006).

Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis and albinism. Plant Cell Rep 25 : 375-381. FI : 2,173

Nous avons suivi l'influence de la saison sur les résultats obtenus par culture d'anthères pendant deux ans, ainsi que l'effet de la position de l'épi sur le plateau de tallage, chez les cvs. de printemps Cork et d'hiver Igri. Pour les deux cvs., la période de janvier à juillet s'est avérée optimale pour une régénération maximale de plantes mais le pourcentage de plantules chlorophylliennes régénérées ne semble pas affecté par la saison. Par contre, il évolue en fonction de la talle dont proviennent les anthères. Les épis issus de la deuxième talle

permettent d'obtenir des pourcentages de plantules chlorophylliennes bien supérieurs aux autres talles, en particulier pour les cvs. connus pour régénérer essentiellement des albinos.

La deuxième partie du document concerne la caractérisation physiologique des mécanismes induits par le stress du prétraitement. Nous avons étudié l'expression des gènes induits par le stress pendant la phase de prétraitement et la réorientation du programme de la microspore par PCR quantitative temps réel. Une cinétique rapprochée nous a permis de mettre en évidence des inductions et répressions plus ou moins précoces selon les gènes. Nous nous sommes intéressés à l'expression des gènes impliqués dans la réponse aux stress et plus particulièrement à ceux codant pour les protéines PR, ainsi que les protéines impliquées dans les voies de synthèse des phénylpropanoïdes, de l'AJ, ou encore des EAO.

Publication 5 : **Jacquard C, Mazeyrat-Gourbeyre F, Devaux P, Baillieul F, Clément C.**

Microspore embryogenesis in barley: anther pretreatment stimulates plant defence gene expression. En préparation

Nous avons étudié l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse à divers stress abiotiques durant le développement pollinique *in vivo* ainsi que pendant la phase de prétraitement chez les deux cvs. d'orge Cork et Igri. Un burst oxydatif est détecté dès 48 heures après la mise en prétraitement dans les anthères des deux cvs. Ceci permet de confirmer la perception du stress par l'anthere et l'accumulation d'EAO en réponse à cette perception. Le suivi de différents gènes de réponse aux stress a confirmé l'induction de l'expression des gènes codant des protéines PR, ainsi que divers gènes impliqués dans la voie de synthèse des phénylpropanoïdes et de l'AJ pendant le développement pollinique chez l'orge. Pendant la phase de prétraitement les gènes PR ainsi que les gènes codant des protéines de détoxification des EAO sont induits. L'ajout de sulfate de cuivre dans le milieu de prétraitement engendre également une induction des divers gènes testés mais de façon plus modérée.

2. Résultats - Discussion

Publication II

Influence of copper sulfate on anther culture in barley (*Hordeum vulgare L.*)

Wojnarowicz G, **Jacquard C**, Devaux P, Sangwan RS et Clément C (2002). Plant Science 162 : 843-847



Influence of copper sulfate on anther culture in barley (*Hordeum vulgare* L.)

G. Wojnarowicz^a, C. Jacquard^a, P. Devaux^b, R.S. Sangwan^c, C. Clément^{a,*}

^a Laboratoire de Biologie et Physiologie, Végétales, Université de Reims Champagne Ardenne, UFR Sciences, URVVC UPRES EA 2069, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

^b Laboratoire de Biotechnologies, Florimond Desprez, BP 41, 59242 Cappelle en Pévèle, France

^c Université de Picardie Jules Verne, Androgenèse et Biotechnologies, 33 rue Saint-Leu, 80039 Amiens, France

Received 6 December 2001; received in revised form 20 February 2002; accepted 20 February 2002

Abstract

In order to improve the yield of androgenesis in barley, copper sulfate was tested during the successive steps of anther culture at various concentrations. The best results were obtained when copper sulfate was added at 10 µM (100 fold higher than the control) during both the pretreatment and the culture phases. Under these conditions, the rate of responding anthers increased from 57.3 to 72.3%, the number of regenerated plantlets from 2.4 to 11.1 per responding anther and the proportion of albino plantlets was reduced from 13 to 10.8%. The addition of copper sulfate during plantlet regeneration did not further improve the yield of androgenesis. The positive influence of copper sulfate was characterized by an increase of microspore survival during anther culture and by a synchronization of the first symmetric division around the seventh day of culture. © 2002 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Anther culture; Copper; *Hordeum vulgare* L.; Microspore behavior; Pretreatment

1. Introduction

The obtention of doubled haploid through anther or microspore culture represents a modern tool for the improvement of cultivated species enabling plant breeders to produce homozygous lines in a few months. In barley and other cereals, the use of androgenesis has generated number of cultivars currently available and cultivated in many countries. However, several lines remain recalcitrant for microspore embryogenesis, mostly for genotypic reasons [1]. Furthermore, numerous cultivars cannot be used for improvement through androgenesis, because, they produce exclusively albino plantlets [2]. Therefore, the optimization of the microspore/anther culture protocol remains of considerable interest for plant breeders.

Interestingly, several recent reports suggest the positive influence of copper during in vitro culture of various explants in barley [3,4] and other cereals [5]. The increase of copper sulfate in the culture medium increases the yield of plant regeneration from callus cultures [6], allows the production of green plantlets during more than 1 year from scutellum-derived callus in recalcitrant lines [3], and improves the behavior of polyembryonic cultures of scutellum [4]. In barley, the optimal concentration of copper sulfate needs to be adjusted according to the type of explant and the cultivar used. For example, the optimal concentration of copper for plant regeneration from callus cultures in recalcitrant lines can reach up to 500 fold the one commonly used in culture media [6].

In cereals, copper has key roles in the anther during pollen development since it affects both tapetum and pollen metabolism [7,8]. Copper deficiencies induces tapetum dysfunctioning whereas pollen undergoes abnormal polyploidy and inhibition of DNA synthesis. In most cases, copper deficiency leads to pollen abortion and male sterility. Moreover, copper is involved in many

Abbreviations: cv., cultivar; cvs., cultivars; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; FDA, fluorescein diacetate.

* Corresponding author. Tel./fax: +33-3-26-913339.

E-mail address: christophe.clement@univ-reims.fr (C. Clément).

other physiological processes, especially regarding chlorophyll synthesis and photosynthesis [9].

Despite the beneficial influence of copper on regeneration during in vitro culture of Cereals and its importance during both pollen development and plant physiology, poor information is available concerning the effect of copper on androgenesis. Owing to previous observations regarding the role of copper in cereal anther physiology [7,8] and the influence of copper on in vitro plant physiology [3,4,6], we have investigated the possible effect of copper during anther culture in barley, focusing on both the yield of androgenesis and the behavior of microspores during this process.

2. Material and methods

2.1. Plant material

The winter barley (*Hordeum vulgare* L.) cv. Igri was used for this study since it has been used for years as a model for the optimization of the anther culture protocol. Plants were obtained as previously described [10]. Spikes were collected when the microspores were at the uninucleate stage.

2.2. Anther pretreatment

Spikes were sterilized in ethanol 70° and were pretreated at 4 °C in the dark during 3–4 days in mannitol (62 g/l) as described previously [11]. The pretreatment medium was supplemented with various concentrations of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1, 2, 5, 7, 10, 12, 15, 18, 20 µM).

In each spike, the anthers from proximal and distal spikelets were removed. The anthers from the central flowers were solely conserved for anther culture, representing approximately 30 anthers per spike. For each test, at least 300 anthers were used from ten different spikes.

2.3. Anther culture

After pretreatment, anthers were cultivated according to Caredda et al. [11]. The medium including copper sulfate at 0.1 µM was considered as the control whereas the culture medium was supplemented with various concentrations of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1, 2, 5, 7, 10, 12, 15, 18, 20 µM) during the experiments.

2.4. Haploid plantlet regeneration

After 3–4 weeks of culture, microspore derived embryos were treated as described previously for plant regeneration [11]. Using the optimal concentration of copper sulfate during the pretreatment and the culture

phase, various concentrations of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5, 10, 15, 20 µM) were tested during the experiments. Green and albino androgenetic plantlets were counted after 2 weeks on the regeneration medium. The G/A ratio represented the proportion of green versus albino regenerated plantlets.

2.5. Preliminary test

In order to check the influence of copper on androgenesis, respectively, during the anther pretreatment, anther culture and plant regeneration, a preliminary test was performed using $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ at 5 µM [3,4] separately during the successive phases of androgenesis and finally in all media.

2.6. Microspore viability and occurrence of the first symmetric division

The viability of microspores and microspore derived structures was estimated during the whole androgenetic process using the FDA test [12]. In order to check the occurrence of the first symmetric division, the pretreated microspores were followed during the first 10 days of culture using the DAPI test [13]. Each test was performed three times using three anthers from three different spikes and from 500 microspores per anther. The control was represented by the conditions described previously [11], which corresponded to 0.1 µM of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

3. Results

3.1. Preliminary test

In the control conditions, 57.3% of anthers responded providing 276.7 plantlets per 100 responding anthers and the green/albino ratio (G/A) was 6.7, meaning that 87% of regenerated plantlets were chlorophyllous (Table 1). Copper sulfate used at 5 µM separately during anther pretreatment or anther culture had globally no influence

Table 1
Influence of copper sulfate during the different steps of anther culture

Copper sulfate (µM)	RA (%)	RP/100 RA	GP/100 RA	G/A ratio
Control 0.1-0.1-0.1	57.3	276.7	240.7	6.7
5-0-0	57	342.8	252.6	2.8
0-5-0	58	340	267.6	3.7
5-5-0	67	527.3	456	6.4
5-5-5	67	378.7	307.2	4.3

In the first column, the successive numbers correspond to the respective concentration of copper sulfate (µM) in the pretreatment—culture—regeneration media. RA, responding anthers; RP/100 RA, regenerated plantlets per 100 responding anthers; GP/100 RA, green plantlets per 100 responding anthers; G/A ratio, green/albino ratio.

on the yield of androgenesis. In both cases, the anther response was not significantly modified. The total number of regenerated plantlets increased by 20% but the G/A ratio decreased conversely, leading finally to approximately the same number of green haploid plantlets than the control. However, copper sulfate had a beneficial effect on androgenesis when added in both the pretreatment and the culture media. The G/A ratio was similar to the control but the anther response thus increased by 10% and the number of regenerated plantlets was enhanced two fold. Using copper sulfate 5 μM during the whole process including regeneration generated better results than the control though less efficient than in the previous case. The optimal combination was thus to add copper sulfate during anther pretreatment and culture: the number of green haploid plantlets was 456 for 100 responding anthers against 240.7 in the control experiment.

3.2. Influence of copper sulfate concentration during anther pretreatment and culture

Adding copper sulfate from 1 to 20 μM during both anther pretreatment and culture globally improved the yield of androgenesis in the barley winter cv. Igri (Table 2). The anther response was increased when copper sulfate was used at concentrations between 5 and 18 μM reaching up to 73.6% at 15 μM . The quantity of regenerated plantlets was the most affected parameter by copper sulfate. All the tested concentrations of copper sulfate enhanced the number of regenerated plantlets when compared with the control. The optimal concentration was 10 μM , allowing the formation of 1245 plantlets per 100 responding anthers.

The effect of copper sulfate on albinism varied according to the concentration of copper in the media. At low (1 and 2 μM) and high (15–20 μM) concentrations, the G/A ratio was lower than 3. The best results were obtained at 10 μM , since the G/A ratio increased

Table 2
Influence of copper sulfate concentration on the yield of anther culture

Copper sulfate (μM)	RA (%)	RP/100 RA	GP/100 RA	G/A ratio
Control 0.1	57.3	276.7	240.7	6.7
1	59.2	366	235.3	1.8
2	57	806	537.3	2
5	67	527.3	456	6.4
7	65	556	488.1	7.2
10	72.3	1245	1111.1	8.3
12	63	280.1	176.6	5.2
15	73.6	378	273	2.6
18	71.4	423.5	301.2	2.4
20	64.6	328	240.5	2.7

RA, responding anthers; RP/100 RA, regenerated plantlets per 100 responding anthers; GP/100 RA, green plantlets per 100 responding anthers; G/A ratio, green/albino ratio.

from 6.7 (control) up to 8.3, meaning that 89.2% of regenerated plantlets were chlorophyllous. Finally, the total yield of androgenesis was considerably enhanced using copper sulfate at 10 μM . The number of chlorophyllous haploid plantlets increased by 400%, reaching 1111.1 per 100 responding anthers against 240.7 in the control conditions.

3.3. Effect of copper sulfate concentration during plantlet regeneration

The addition of copper sulfate (5, 10, 15 or 20 μM) in the regeneration medium did not improve the yield of androgenesis when compared with the control, whatever the concentration tested (Table 3). However, using copper sulfate at 10 μM , the G/A ratio reached 10.8 (91.5% of green plants) though the number of green regenerated plantlets per 100 responding anthers was approximately the half (653.8) of the control (1111.1).

3.4. Effect of 10 μM copper sulfate on microspore viability

The viability of microspores was considered as 100% at the time of sampling. After pretreatment, 34% of microspores remained alive using 0.1 μM copper sulfate (control) in the pretreatment medium whereas it was higher than 50% whatever the concentration of copper sulfate tested, with a maximum of 88.2% at 15 μM (Table 4). After 1 week of culture, the microspore survival was higher in the presence of copper sulfate, reaching 26.3% at 15 μM against 3.7% in the control. During the last 2 weeks of culture, the viability of microspores/microspore derived structures decreased drastically though it remained higher in the presence of high concentrations of copper sulfate.

3.5. Effect of 10 μM copper sulfate on the timing of the first symmetric division

The first symmetric microspore division took place from the fourth to the eighth day of culture. In the

Table 3

Influence of copper sulfate during regeneration after anther pretreatment and culture in the presence of 10 μM CuSO₄ in the media

Copper sulfate (μM)	RP/100 RA	GP/100 RA	G/A ratio
Control 0.1	1245	1111.1	8.3
5	355.8	290.6	4.5
10	748.4	653.8	10.8
15	358.4	297.4	4.9
20	378.5	308.9	4.4

RP/100 RA, regenerated plantlets per 100 responding anthers; GP/100 RA, green plantlets per 100 responding anthers; G/A ratio, green/albino ratio.

Table 4

Influence of copper sulfate on microspore viability (%) during anther culture

Copper sulfate (μM)	Sampling	After pretreatment	1d	2d	5d	7d	10d	15d	21d
Control 0.1	100	34							
5	100	80	17	14.8	6	3.7	1.5	1.5	0.4
10	100	50.7	73.5	44	27.6	14.7	7	4.1	3.8
15	100	88.2	40	35	30	15.7	5.7	4.2	3.8
20	100	51.3	69.8	47.5	39.7	26.3	10	8.4	2.8

d, day of culture.

control experiment, the maximum intensity of microspore division was registered at the fourth and the fifth days of culture, corresponding, respectively, to 35.1 ± 6 and $24.2 \pm 9\%$ (Fig. 1). When copper sulfate ($10 \mu\text{M}$) was added during both pretreatment and anther culture, the first microspore division was delayed. Most of microspore mitoses (92.6%) occurred between the sixth and the eighth days of culture, and the maximum $55.3 \pm 8\%$ was reached at the seventh day of culture.

4. Discussion

Copper has a beneficial effect on anther culture in the barley winter cv. Igri, improving both quantitative and qualitative yield of androgenesis. When copper sulfate is added at $10 \mu\text{M}$ during anther pretreatment and culture, the anther response is increased by 15% and the number of green androgenetic plants by 400%. These results are in accordance with data previously reported in barley considering the interest of optimizing the copper concentration in culture media [3,4,6].

Two parameters of the in vitro culture seem to be affected by copper: the step of the androgenesis and the concentration used. The beneficial effect of copper is optimal during pretreatment and culture, suggesting that the physiological events leading to microspore reorientation and green plant regeneration occur during pollen development or during the earliest steps of androgenesis [11]. Besides, the addition of copper sulfate

during regeneration has no positive effect following androgenesis [5] in the contrary to polyembryonic culture of scutellum [3,4].

The adjustment of copper concentration appears to be a key point in promoting plant regeneration [6] but it depends upon the type of in vitro culture and the cv. tested. In barley, optimizing the anther culture protocol, copper sulfate at $10 \mu\text{M}$ gives the best results whereas the optimal concentration for somatic embryogenesis from scutellum is $5 \mu\text{M}$ [3,4]. Anyway, it seems that cereals have special needs concerning copper, especially when cultivated in vitro [6]. Usual plant tissue culture media contain low concentrations of copper. Regarding androgenesis in barley, the control medium [11] contains $0.1 \mu\text{M}$ of copper whereas our results show that the optimal concentration ($10 \mu\text{M}$) is 100 fold higher. Similarly, performing embryonic culture from scutellum, the optimized concentration of copper sulfate in the media is increased 50 fold when compared with the MS medium. This means that the copper content of culture medium requires special attention in cereals. Moreover, considering that some lines of barley regenerate exclusively albino plants following anther culture [11], it is likely that various copper sulfate concentrations may initiate the regeneration of green plants from these cvs.

The addition of copper sulfate improves the behavior of barley microspores during androgenesis, in particular increasing their survival during the whole process. Copper deficiency is known to drastically affect plant reproduction [14–17]. In the anther of cereals, the lack of copper alters tapetum physiology inducing cell hypertrophy [7,18] and modifications of RNA metabolism [8]. This results in disturbances of nucleus metabolism in the microspore [8] and reduction of pollen fertility [8,19]. Therefore, performing anther culture in barley, the increase of both microspore viability and anther response in the presence of high copper sulfate concentrations is in accordance with previous data and confirm the beneficial influence of appropriate concentrations of copper on pollen physiology.

In this study, though the production of haploid green plants is considerably increased, the influence of copper on albinism is not so spectacular. In the cv. used, the albinism does not represent an obstacle to androgenesis

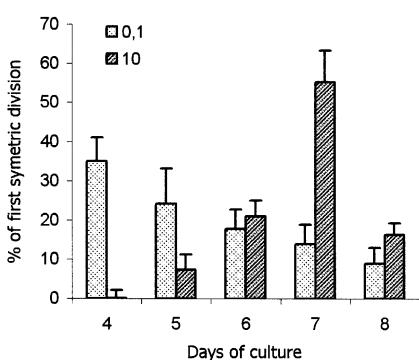


Fig. 1. Occurrence of the first symmetric division in the microspore during anther culture in presence of various copper sulfate concentrations (μM).

but considering the role of copper in chlorophyll synthesis and photosynthesis [9], the addition of copper sulfate during anther culture may be of interest for the obtention of green plants in albino producing lines.

References

- [1] E.T. Larsen, I.K.D. Tuvesson, S.B. Andersen, Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture, *Theor. Appl. Genet.* 82 (1991) 417–420.
- [2] S. Caredda, C. Clément, Androgenesis and albinism in Poaceae: influence of genotype and carbohydrates, in: C. Clément, E. Pacini, J.C. Audran (Eds.), *Anther and Pollen: From Biology to Biotechnology*, Springer, Berlin, Heidelberg, Tokyo, 1999, pp. 211–228.
- [3] M.J. Cho, W. Jiang, P.G. Lemaux, Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism, *Plant Sci.* 138 (1998) 229–244.
- [4] A.M. Nuutila, J. Hamalainen, L. Mannonen, Optimization of media nitrogen and copper concentrations for regeneration of green plants from polyembryogenic cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.), *Plant Sci.* 151 (2000) 85–92.
- [5] Y.-D. Guo, S. Pulli, An efficient androgenic embryogenesis and plant regeneration method through isolated microspore culture in timothy (*Phleum pratense* L.), *Plant Cell Rep.* 19 (2000) 761–767.
- [6] L. Dahleen, Improved plant regeneration from barley callus cultures by increased copper levels, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 43 (1995) 267–269.
- [7] A.W. Jewell, B.G. Murray, B.G. Alloway, Light and electron microscope studies on pollen development in barley (*Hordeum vulgare* L.) grown under copper sufficient and deficient conditions, *Plant Cell Environ.* 11 (1988) 273–281.
- [8] Z. Azouaou, A. Souvré, Effects of copper deficiency on pollen fertility and nucleic acids in the durum wheat anther, *Sex Plant Reprod.* 6 (1993) 199–204.
- [9] W. Maksymiec, Effect of copper on cellular processes in higher plants, *Photosynthesis* 34 (1997) 321–342.
- [10] S. Caredda, P. Devaux, R.S. Sangwan, C. Clément, Differential development of plastids during microspore embryogenesis in barley, *Protoplasma* 208 (1999) 248–256.
- [11] S. Caredda, C. Doncoeur, P. Devaux, R.S. Sangwan, C. Clément, Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.), *Sex Plant Reprod.* 13 (2000) 95–104.
- [12] J. Heslop-Harrison, Y. Heslop-Harrison, Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate, *Stain Technol.* 45 (1970) 115–120.
- [13] A. Touraev, M. Pfosser, O. Vicente, E. Heberle-Bors, Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores; towards a unified model of induction of microspores: pollen embryogenesis, *Planta* 200 (1996) 144–152.
- [14] P. Adams, C.J. Graves, G.W. Winsor, Some effects of copper and boron deficiencies on the growth and flowering of *Chrysanthemum morifolium*, *J. Sci. Food Agric.* 26 (1975) 1899–1909.
- [15] C.J. Graves, J.F. Sutcliffe, An effect of copper deficiency on the initiation and development of flower buds of *Chrysanthemum morifolium* grown in solution culture, *Ann. Bot.* 38 (1974) 729–738.
- [16] B. Dell, Male sterility and anther structure in copper deficient plants, *Ann. Bot.* 48 (1981) 599–608.
- [17] W. Bussler, Physiological functions and utilization of copper, in: J.F. Loneragan, H.D. Robson, R.D. Graham (Eds.), *Copper in Soil and Plant*, Academic Press, Sydney, Australia, 1981, pp. 213–234.
- [18] B.J. Alloway, A.W. Jewell, B.G. Murray, Effects of subclinical copper deficiency on pollen development and yield cereals, in: P. Morard (Ed.), *Proceedings of the Second International Symposium on Role of Micronutrients in Agriculture*, Toulouse, France, 1986, pp. 31–40.
- [19] R.D. Graham, Male sterility in wheat plants deficient in copper, *Nature* 254 (1975) 514–515.

Nous avons testé l'ajout de sulfate de cuivre dans les milieux sur les résultats obtenus en culture d'anthères chez le cv. d'hiver Igri. Nous avons constaté que l'addition de cuivre dans les milieux améliore le pourcentage de réponse des anthères, la viabilité des microspores ainsi que la régénération de plantules.

Une concentration de 10 µM de sulfate de cuivre dans les différents milieux permet d'améliorer de façon significative le pourcentage de plantules chlorophylliennes régénérées, le faisant passer de 87 à 91,5%. Une concentration supérieure à 10 µM permet d'améliorer la réponse et la régénération mais diminue très fortement le pourcentage de plantules chlorophylliennes.

L'augmentation de la concentration en cuivre dans le milieu de régénération abaisse le pourcentage de plantules chlorophylliennes, sauf pour une concentration de 10 µM, et diminue le nombre total de plantules régénérées de près de 40%.

L'ajout de 10 µM de sulfate de cuivre dans les milieux de prétraitement et de culture mais pas dans le milieu de régénération permet d'obtenir un nombre maximal de plantules régénérées (5 fois plus que sans cuivre) avec un pourcentage de plantules chlorophylliennes supérieur à 89%. Cette concentration semble donc être la meilleure pour optimiser le protocole d'embryogenèse pollinique chez le cv. d'orge d'hiver Igri.

L'ajout de cuivre dans les milieux permet d'améliorer les rendements de la technique pour le cv. Igri. Il nous a semblé intéressant de tester les effets du sulfate de cuivre pour des cvs. récalcitrants ou produisant exclusivement des plantules albinos.

Publication III

**Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley:
effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars**

**Jacquard C, Nollin F, Hécart C, Zuka A, Graudal D, Rashal I,
Sangwan RS, Devaux P, Mazeyrat-Gourbeyre F and Clément C.**
Article soumis à Plant Biotechnology Journal

Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars

Cédric Jacquard¹, Frédérique Nollin¹, Carine Hécart¹, Dace Gaudal², Isaak Rashal², Rajbir S. Sangwan³, Pierre Devaux⁴, Florence Mazeyrat-Gourbeyre¹, Christophe Clément^{1*}

¹ Université de Reims Champagne-Ardenne, UFR Sciences, Stress Défenses et Reproduction des Plantes, 51687 Reims Cedex 2, France

² LU Bioloģijas institūts, Miera ielā 3, LV-2169 Salaspils, Latvia

³ Université de Picardie Jules Verne, Androgenèse et Biotechnologies, 33, rue Saint-Leu, 80039 Amiens, France

⁴ Florimond Desprez, Laboratoire Biotechnologies, BP 41, 59242 Cappelle en Pévèle, France

* Correspondence (tel/fax + 33 3 26 91 33 39; e-mail christophe.clement@univ-reims.fr)

cedric.jacquard@univ-reims.fr

izaks@email.lubi.edu.lv

frederique.nollin@reims.inra.fr

rajbir.sangwan@sc.u-picardie.fr

hecartcarine@hotmail.com

pierre.devaux@florimond-desprez.fr

florence.gourbeyre@univ-reims.fr

dace@email.lubi.edu.lv

Running title: Copper and microspore embryogenesis in barley

Summary

In cereals, albinism in microspore-derived plants is a major problem, particularly in the recalcitrant cultivars; however, the factors controlling it are not well understood. Here we report the positive influence of copper on both the production of doubled haploid (DH) plants through microspore embryogenesis in many well known recalcitrant cultivars of *Hordeum vulgare*, and on the kinetic of programmed cell death (PCD) that developed during *in vivo* development of microspores which could have interfered with the process of normal microspore embryogenesis. In addition, we show that the presence of copper sulphate in the anther pretreatment medium have permitted to obtain green doubled haploid plants from those cultivars and F1 hybrids known to produce exclusively albino plants using classical procedures. This should enable breeders in the future to exploit the genetic diversity of these recalcitrant cultivars/hybrids using DH technology. Besides, examining the fate of nucleus in the various anther cell layers, we could demonstrate that the kinetic of PCD was different in anthers of barley chosen cultivars, which gave opposite results with regards to albinism. However, there was no direct correspondence between the nucleus PCD degeneration characteristic in the anther cell layers and the rate of albinism. Also, copper had no influence on the PCD kinetic in these cultivars. It was thus concluded that the albinism following microspore embryogenesis was not due to the nuclear degeneration in the anther but to another unknown phenomenon that could affect specifically the plastids during microspore/pollen development.

Keywords: albinism; anther culture; barley; copper; plastids; programmed cell death.

Abbreviations: cv.: cultivar; cvs.: cultivars; SE: standard error

Introduction

Microspore embryogenesis (ME) consists in regenerating haploid plants from microspores. The gametophytic pollen programme of the microspore is arrested by a stressing pretreatment and reoriented towards a sporophytic embryo programme (Touraev et al. 1997). The microspore thus behaves like a proper zygote that develops into an embryo that further regenerates into haploid or spontaneous doubled haploid (DH) plants, as well as tri- or tetraploid plants (Devaux and Pickering 2005; Kasha 2005). In haploid plants, chromosome doubling is necessary to restore the diploid number of chromosomes and to get entirely homozygous DH plants. DH technology using microspores can be performed either from cultures of isolated microspores or from anther containing the microspores (Davies 2003; Jacquard et al. 2003). The technology was first described at the mid sixties and was optimized in the last three decades in most cultivated species. Studies carried out on DH technology from microspores are mainly focused on two aspects.

The first one consists in understanding the fundamental aspects of microspore biology that lead to stop its initial developmental programme and to develop according to another programme. In this respect rapeseed and barley were used as model plants to study this phenomenon. Most recent studies deal with transcriptome and proteome analysis of microspores during the induction of the ME process (Hosp et al. 2006; Joosen et al. 2007). It was shown that the stressing pretreatment blocks the expression of pollen-related genes (Maraschin et al. 2006), whereas new sets of genes concerning various physiological aspects are stimulated. In reoriented microspores of barley, genes involved in sugar metabolism, stress response and proteolysis are up-regulated (Maraschin et al. 2006; Muñoz-Amatriaín et al. 2006), whereas in rapeseed protein synthesis, glycolysis, and ascorbate metabolism are stimulated (Joosen et al. 2007). The microspore derived embryos are now used as a model system to study both embryo development and plant cell totipotency.

Whatever, a number of genes can now be associated with the induction of ME. In rapeseed several markers of ME induction were identified that can be co-regulated at both the gene and protein expression level (Joosen et al. 2007; Malik et al. 2007). Following in parallel gene expression in developing proper embryos and reoriented microspores, it was clearly demonstrated that the microspores are fully established in the new zygotic programme after 7 days of culture (Malik et al. 2007). Afterwards and despite their haploid state the *in vitro* reoriented microspores strictly follow the same pathways as the proper zygote obtained through *in vivo* fertilization (Maraschin et al. 2006; Joosen et al. 2007; Tsuwamoto et al. 2007).

The second aspect of ME research is devoted to optimize all the steps of the protocol from the plant growth conditions up to the adjustment of culture media. Nowadays, ME has been described for more than 250 plant species though efficient protocols are available for only 20 of them (Maluszinsky et al. 2003). For a long time the stress inducing pretreatment has been identified as the key point for the male DH technology. The main stresses used in this purpose are carbon starvation, osmotic pressure, coldness, drug treatment or pH variations (Touraev et al. 1997; Barinova et al. 2004; Shariatpanahi et al. 2006), alone or combined. Many species still remain recalcitrant for ME, either because appropriate pretreatment is not yet optimized, or because microspores are not sensitive to stress. Even within a successful species, there are usually recalcitrant genotypes (Caredda and Clément 1999).

In cereals, albinism is an additional obstacle to the use of ME in some cvs. Cereals are sensitive to albinism as soon as they are cultivated *in vitro* (Dahleen 1995; Cho et al. 1998; Nuutila et al. 2000) and ME is no exception. All the cultivated cereals were tested for ME and all of them revealed to be affected by albinism, the importance of the phenomenon depending on the genotype (Caredda and Clément 1999). Barley has been the most investigated species in this respect. Up to 100% of the regenerated haploid plants are albinos, devoid of chlorophyll with undifferentiated pro-plastids (Caredda et al. 2000). Programmed cell death (PCD) may be involved in albinism. Under normal conditions, pollen grains undergo progressive PCD from the microspore stage (Wang et al. 1999a, 1999b) until the end of pollen development (Varnier et al. 2005). In barley microspores and next pollen grains plastids are likely affected by this phenomenon. Indeed, plastids progressively degenerate during pollen maturation and next pollen tube growth, mainly maintaining the function of starch accumulation restitution for pollen tube elongation (Mogensen 1996). The time when plastid degradation is triggered in the microspore may interfere with albinism. In cvs. producing exclusively albino plants following ME, plastids of the microspore are already affected as early as the sampling uninucleate microspore stage (Caredda et al. 2000), meaning that the initial state of the plastids at sampling is determinant for the regeneration of green plants.

Copper is involved in many physiological processes. Copper deficiency is known for a long time to generate male sterility (Dell 1981), especially in cereals (Alloway et al. 1986; Jewell et al. 1988; Azouaou and Souvré 1993). Copper is also required for chlorophyll biosynthesis and photosynthesis (Maksymiec 1997). Besides, the influence of copper in the ME process was tested using the model winter cv. Igri of barley with significant positive effects: when 10 µM copper sulphate is added to the pretreatment medium, the number of DH plants obtained through anther culture is drastically enhanced and the proportion of albino

Table 1 Yield of anther culture response of 5 cvs. and 7 hybrids of barley in response to various concentrations of copper sulphate during anther pretreatment. pretr.: pretreatment; reg.: regenerated; resp.: responding.

Cvs. or hybrids	[CuSO ₄] µM pretr.	Plated anthers	% resp anthers	Reg. plants per 100 resp. anthers	% green reg. plants
Cork	0	825	54.7	259.8	1.4
	10	800	62.7	298.9	20.1
	20	600	51.3	287.7	8.8
Douchka	0	375	23.5	296.2	0.0
	10	375	24.5	397.7	2.4
	20	350	6.7	213.1	4.1
Madras	0	425	42.8	263.1	9.9
	10	850	46.1	336.5	18.1
	20	350	45.3	337.5	31.6
Prisma	0	325	31.9	211.4	0.0
	10	375	29.7	260.5	4.9
	20	300	20.6	302.6	11.8
Scarlett	0	425	47.3	309.2	7.2
	10	1000	45.3	401.8	20.1
	20	400	34.7	552.9	17.0
Ansia/ Dziugiai	0	640	2.5	62.5	40.0
	10	600	9	48.2	92.3
Dziugiai/ Ansia	0	490	26.9	14.4	0.0
	10	600	11.5	23.2	100.0
Primus/ Anni	0	600	11.0	72.7	0.0
	10	620	9.1	21.4	33.3
Saana/ Maja	0	600	6.0	25.0	44.4
	10	610	6.6	20.1	100.0
Aura/ Abava	0	610	4.6	50.0	14.3
	10	600	25.0	40.0	80.0
Merlin/S W1291/D anuta	0	300	50.3	14.8	18.5
	10	360	46.1	24.9	53.0
Danuta/ 6131	0	300	90.7	30.9	2.9
	10	300	44.0	27.4	18.2

plants is significantly reduced. The beneficial effects are reflected by an improvement of microspore survival during the process and by the synchronization of the first microspore symmetric division (Wojnarowicz et al. 2002).

Altogether these data strongly suggest that copper sulphate may help in obtaining green haploid plants from cvs./hybrids that usually produce low amounts of doubled haploids or exclusively albino plantlets. In this paper, we attempted to get green haploid plants from such cvs./hybrids through the ME process using various concentrations of copper sulphate during the pretreatment. Moreover, in order to further understand the interference of copper with the ME process and albinism, we followed the effect of copper on both plastid ultrastructure and PCD in whole anthers.

Results

Effect of copper sulphate on the yield of ME

The use of 10 or 20 µM copper sulphate during the pretreatment allowed to regenerate green microspore derived plants in all the tested cvs. and hybrids (Table 1). The results were particularly spectacular with those producing exclusively albino plants with traditional media such as Douchka, Prisma, Dziugiai/Ansia and Primus/Anni. In most cases, the optimal concentration was 10 µM but it should be noticed that in Scarlett, Douchka and Prisma cvs. the optimal concentrations of copper sulphate appeared to be 20 µM. The most spectacular effects were registered in Dziugiai/Ansia and Primus/Anni, in which the percentage of green plants reached respectively 33.3 and 100% despite the decrease in the proportion of responding anthers. In the other cvs. and hybrids, this percentage was increased by 2 to 15 when compared to the control.

Copper sulphate concentrations higher than 20 µM lead to a decrease of all tested parameters. Especially 40 and 80 µM resulted in the absence of any response and any plantlet regeneration, these concentrations being toxic for anther and leading to their progressive browning.

Overall, the improvement of green plant production was considerable. Indeed, the increase of green plant percentage was accompanied by an increase of plant production in most cases (except for the Primus/Anni and the Aura/Abava cvs.). For example in the Cork cv., the combination of plant production and percentage of green plants resulted in the obtaining of 1.4 to 20.1 green regenerated plants for 100 responding anthers.

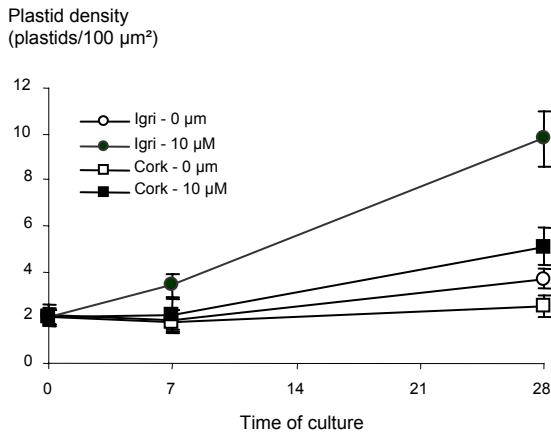


Fig. 1: Fluctuation of plastid density in microspores and microspore derived structures. Open circle: Igri cv. without copper, full circle: Igri cv. with 10 μM copper sulphate, Open square: Cork cv. without copper, full square: Cork cv. with 10 μM copper sulphate.

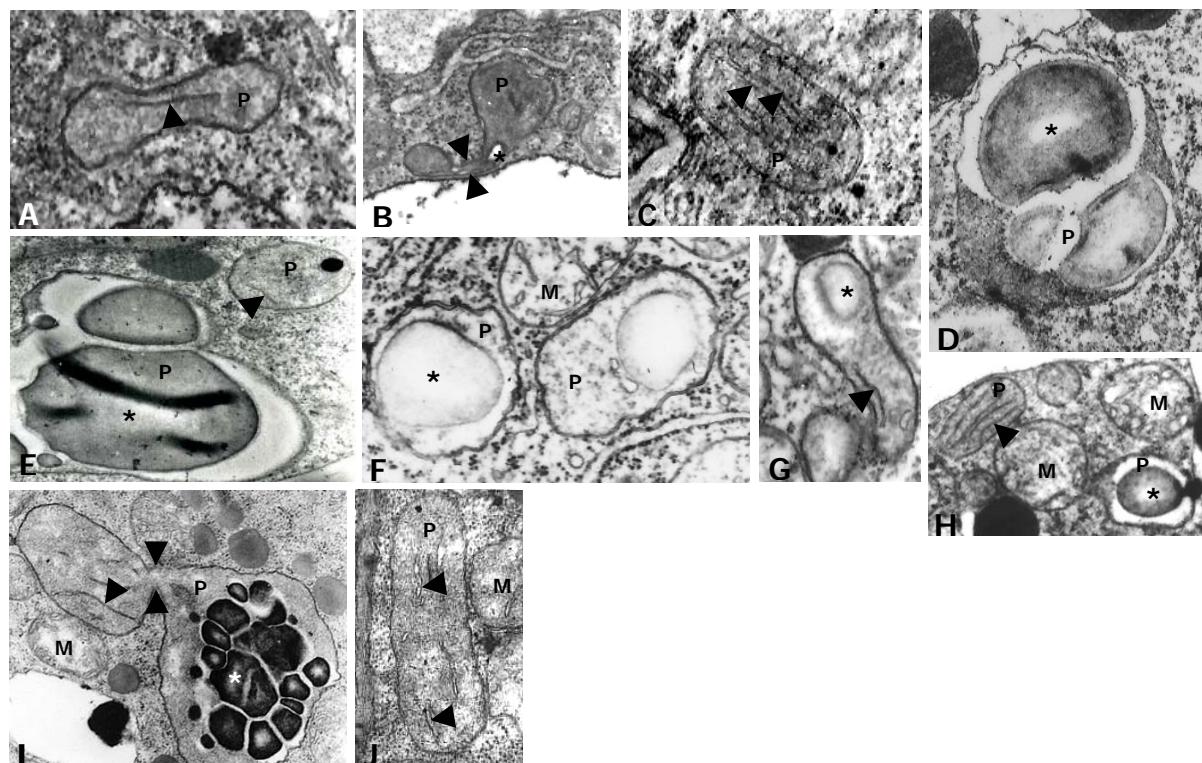


Fig. 2: Variations of plastid features during ME in the winter cv. Igri. **A-E.** Without copper sulphate in the pretreatment medium. **A.** At sampling. Plastids (P) were elongated and had single thylakoid in the stroma (arrowhead). X 33,000. **B.** After pretreatment. Some plastids divided (opposite arrowheads) and starch (star) may accumulate. X 25,000. **C.** 7 days of culture. Type 1 plastids (P) characterized by elongated shape and thylakoid (arrowheads) development. X 27,000. **D.** 7 days of culture. Type 2 plastid (P) characterized by spherical shape and huge starch (star) accumulation. X 25,000. **E.** After 28 days of culture, both type of plastids coexisted. X 20,000. **F-H.** Including 10 μM copper sulphate in the pretreatment medium. **F.** After pretreatment. Starch grains (star) were more developed in the plastids (P). X 23,000. M: mitochondria. **G.** After pretreatment. Beside starch, some thylakoids could be detected in the stroma (arrowhead). X 17,000. **H.** 7 days of culture, type 1 plastids were highly provided with thylakoids (arrowhead), whereas type 2 plastids exclusively contained starch (star). X 10,000. **I.** 14 days of culture. Plastids divided (opposite arrowheads). Starch (star) was degraded in type 2 plastids and thylakoids (arrowhead) elongated in type 1 plastids. X 7,000. **J.** 28 days of culture. Most of plastids (P) were of type 1 with elongated shape and developing thylakoids. X 12,000.

Effect of copper on plastids

Using traditional concentrations of copper sulphate in the media, the plastid density in microspores and further in microspore derived embryos was identical in both Igri and Cork cvs.: it increased from 2 to an average of 3.5 plastids per $100 \mu\text{m}^2$ (Figure 1). When 10 μM copper sulphate was added in the pretreatment medium, the density of plastids was enhanced by 2 in the winter cv. Igri and by 3 in the spring cv. Cork, meaning that plastids divided more intensely in the presence of copper.

In the Igri cv., plastids in the microspore at sampling exhibited elongated shape with a few thylakoids but no starch (Figure 2A). After pretreatment without copper, starch appeared in the stroma and some plastids begun to divide (Figure 2B). After 7 days of culture, two types of plastids could be distinguished. The type 1 was characterized by an ellipsoidal shape, a few thylakoids and small starch grains if any (Figure 2C). In the type 2, plastids were more spherical and the stroma was mostly occupied by starch grains (Figure 2D). In microspore derived embryos after 14 and 28 days of culture, both types of plastids coexisted but starch had considerably increased in the stroma of type 2 plastids (Figure 2E). In the presence of copper, the plastid structure was not affected during the pretreatment though starch grains were bigger (Figures 2F, G). After 7 days of cultures plastids of both types 1 and 2 could be detected but the proportion of type 2 decreased (Figure 2H). After 2 weeks of culture, plastid division was stimulated in parallel with thylakoid development, whereas plastids of type 2 had regressed in a greater extent (Figure 2I). After 28 days of culture, most of plastids were of type 1 exhibiting elongated shape and developed thylakoids (Figure 2J).

The effects of copper sulphate on plastid shape was more drastic in the Cork cv. At the time of sampling, most of plastids were dividing and included several starch grains, as well as some thylakoids (Fig. 3A). After pretreatment, their feature was not modified so far (Figure 3B). In microspore derived structures (few cells) after 7 days of culture, plastids of both types 1 and 2 were detected, though starch was less developed in type 2 when compared to the Igri cv. (Figures 3C, D). After 14 and 28 days of culture, both types of plastids were present. In type 2 starch had considerably developed and occupied most of the plastid volume (Figure 3E). The presence of copper sulphate in the pretreatment medium favoured the accumulation of starch in the stroma (Figure 3F). No significant differences were noticed at 7 and 14 days of culture. After 28 days, microspore derived embryos were shared in two populations: (i) those with plastids of both types, the type 2 being the most well represented (Figure 3G), (ii) those in which plastids of type 2 were strongly modified. In the latter starch was reduced in the stroma, thylakoids developed and prolamellar bodies (crystalline reserves of proteins and

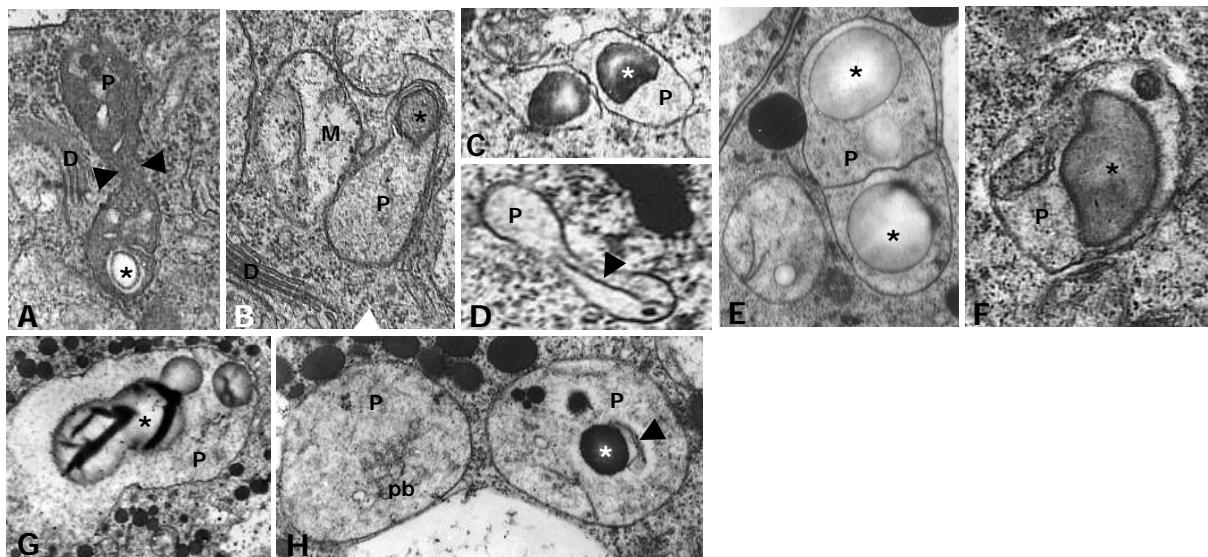


Fig. 3: Variations of plastid features during ME in the spring cv. Cork. **A-E.** Without copper sulphate in the pretreatment medium. **A.** Sampling stage. Dividing (opposite arrowheads) plastids (P) including small starch (star) grains. D: dictyosome. X 25,000. **B.** After pretreatment. Plastids (P) were not modified so far. M: mitochondria. X 20,000. **C.** 7 days of culture. Plastid of type 2 mainly containing starch (star). X 18,000. **D.** Plastid of type 1 characterized by the absence of starch and some thylakoids (arrowhead). X 18,000. **E.** 28 days. Starch occupied most of the type 2 plastid volume. X 8,000. **F-H.** Including 10 μ M copper sulphate in the pretreatment medium. **F.** After pretreatment. Starch accumulated much more than without copper. X 25,000; **G.** 28 days. Type 2 plastid (P) containing huge starch (star) grains and diluted stroma. X 5,000. **H.** 28 days. Evolution of type 2 plastids. Starch (star) was reduced in the stroma whereas prolamellar bodies (pb) could be observed and new thylakoids (arrowhead) appeared. X 15,000.

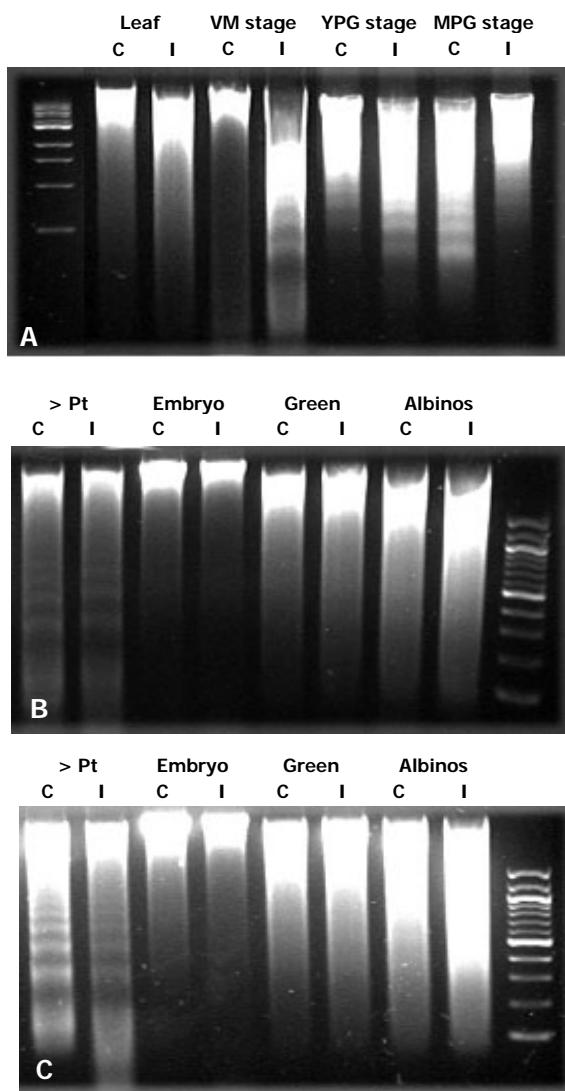


Fig. 4: Detection of DNA laddering in anthers at various stages of pollen development and during the process of ME. **A.** During *in vivo* pollen development. No DNA laddering in the leaves (control). DNA laddering in the anthers of the Igri cv. at both the VM and YPG stages. DNA laddering in the Cork cv. at the YPG and MPG cvs. **B.** During ME without copper sulphate. DNA laddering in the pretreated anthers of both Igri and Cork cvs., but not in the microspore derived embryos nor in the haploid green or albino plantlets. **C.** During ME with copper sulphate during the pretreatment. Similar results than in B. C: spring cv. Cork, I: winter cv. Igri, MPG: mature pollen grain stage, VM: vacuolated microspore stage, YPG: young pollen grain stage.

RNAs) could be detected (Figure 3H). The proportion of these microspore derived embryos corresponded to the percentage of green regenerated plantlets.

Effect of copper on PCD in anthers and microspore derived structures

The kinetic of anther DNA fragmentation during pollen development was not the same in the 2 tested cvs. At sampling (VM stage) DNA laddering could be detected in the Igri cv. but not in the Cork cv. (Figures 4A, B, C). Just after pollen mitosis, DNA fragmentation could be observed in anthers of both cvs., whereas at the mature pollen grain stage, DNA laddering could be observed only in the Cork cv. At the end of pretreatment DNA ladders were obtained from entire anthers of both cvs. whatever the pretreatment medium did contain copper sulphate or not (Figure 4B). Later on, DNA from microspore derived embryos or from young microspore derived plantlets did not exhibit DNA ladders. The presence of copper sulphate in the pretreatment medium had no influence on this parameter (Figure 4C).

Location of PCD affected nuclei

The use of Hoechst 33342 stain on cytological anther sections enabled to identify which cell type was affected by PCD DNA cleavage as revealed by chromatin condensation. At the microspore mother cell stage, none of the anther cells showed any sign of PCD (Figure 5A). The first hallmarks of PCD appeared in the tapetum of the Igri cv. at the young microspore stage (Figure 5B), but not in the Cork cv. During microspore vacuolation (sampling stage), the chromatin of tapetum nuclei was condensed in the Igri cv. (Figure 5C) but not in the Cork one (Figure 5D). After pollen mitosis, tapetal cells of the Igri cv. were at the final stage of hydrolysis (Figure 5E), whereas those of the Cork cv. presented the first signs of nucleus degradation (Figure 5F). At the mature pollen grain stage, both tapetum and middle layers had disappeared in the Igri cv. (Figure 5G). At the same moment in the Cork cv. the tapetum nucleus was still present and the middle layers were not affected by chromatin condensation (Figure 5H).

As revealed in Figure 4, the presence of copper sulphate in the pretreatment medium did not modify the feature of nucleus chromatin in the microspore nor in the other anther cell types of the Igri cv. but accelerated the occurrence of PCD in the anther of the Cork cv. although microspores were still at the microspore stage (data not shown).

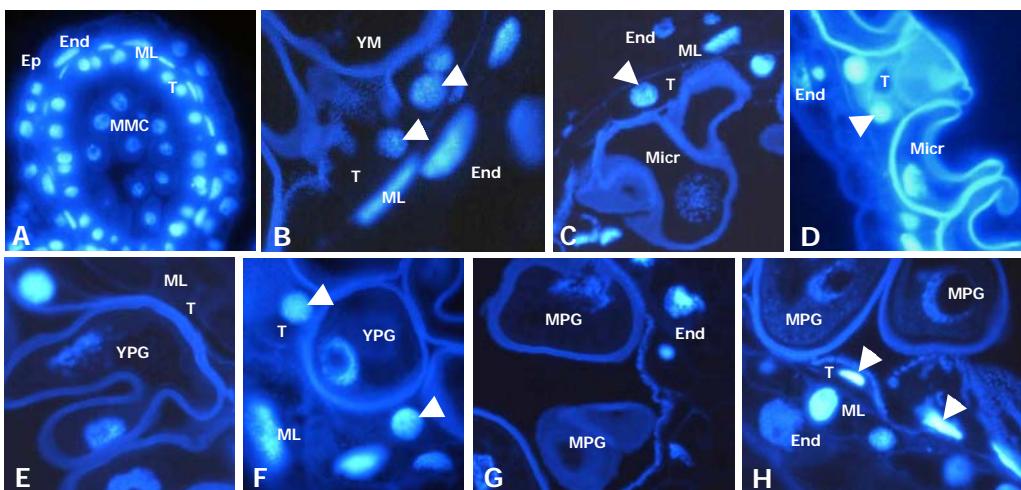


Fig. 5: Detection of nuclei affected by PCD. **A.** In the anther of the Igri cv. at the microspore mother cell (MMC) stage. Anther locule containing the microspore mother cells surrounded by 4 cell layers including the binucleate tapetum (T), the middle layers (ML), the endothecium (End) and the epidermis (Ep). X 30. **B.** Young microspore (YM) stage in the Igri cv. Chromatin condensation (arrowheads) in the tapetum. X 200. **C.** Microspore (Micr) vacuolation in the Igri cv. Progressive shrinkage of tapetal (T) cells. X 150. **D.** Vacuolated microspore (Micr) stage in the Igri cv. Disorganization of tapetal cells and intensification of chromatin condensation (arrowhead). X 100. **E.** Young pollen grain (YPG) stage in the Igri cv. Tapetal (T) cells entirely degraded. X 200. **F.** Young pollen grain (YPG) stage in the Cork cv. Nuclei of the tapetum (T) showing the first signs of chromatin condensation (arrowheads). X 200. **G.** Mature pollen grain (MPG) stage in the Igri cv. Both tapetum and middle layers had disappeared. X 200. **H.** Mature pollen grain (MPG) stage in the Cork cv. Tapetum (T) and middle layers (ML) with high chromatin condensation. X 200.

Discussion

Effect of copper on the yield of ME

The results presented here show that copper considerably increases the yield of microspore embryogenesis in barley. The positive effects are reflected by the increase in most cases of both the number of regenerated plantlets and the proportion of green *versus* albino plantlets. For the first time it was possible to regenerate green DH plants through anther culture using copper sulphate in cvs./hybrids known to regenerate exclusively albino plants. This may reinforce the potential of DH technology in breeding programmes in the future by making available the genetic diversity of these cvs.

The influence of copper on the ME process has been already observed, but only in the model winter cv. Igri (Wojnarowicz et al. 2002). In this work the positive effect mainly consisted in increasing the number of regenerated plantlets but had slight effects on the proportion of albino regenerated plantlets that is quite high (88.7%) with low concentrations of copper sulphate. The results presented here demonstrate that increasing copper concentration helps overcoming albinism following ME in recalcitrant cvs.

Whatever the biotechnological purpose, all cereals are sensitive to albinism when cultivated *in vitro*. This was illustrated using ME (Caredda and Clément 1999) or other *in vitro* culture systems (Dahleen 1995). Usual plant tissue culture media contain low concentrations of copper i.e. the MS medium includes only 0.1 µM of copper sulphate. Our results confirm that the optimal concentration (10 µM) for the regeneration of green DH plantlets in barley after anther culture is 100 fold higher. Similarly, performing embryonic culture from scutellum, the optimized concentration of copper sulphate in the media is increased 50 fold when compared to the MS medium (Cho et al. 1998).

The optimization of copper sulphate concentration in the culture media may be combined with other parameters to further improve the rate of green DH plants in recalcitrant cvs. Indeed numerous parameters were optimized separately such as the period of the year (Jacquard et al. 2006), the growth conditions of the donor plant (Cistué et al. 2003, Szarejko 2003), the position of the spike on the tillering plate (Jacquard et al. 2006), the regulation of the osmotic pressure, the use of isolated microspore culture instead of anther culture (Li and Devaux 2005) and the nature of the osmolites (Li and Devaux 2001, Wojnarowicz et al. 2004).

Effect of copper on plastids

The presence of copper sulphate in the pretreatment results in (i) progressive starch hydrolysis in type 2 plastids, (ii) plastid divisions and (iii) synchronous development of internal membranes. The presence of prolamellar bodies in microspore derived embryos after 4 weeks of culture further indicates that copper sulphate induces amyloplast dedifferentiation into proplastids before entering chloroplast development. Similar results were obtained using *in vitro* culture of grapevine tissues (Romeu-Moreno et al. 1999) or soybean cells (Bernal et al. 2006).

The effect of copper sulphate is delicate to interpret since copper is both an essential (Henriques 1989) and toxic (Zengin et al. 2007) element depending on the concentration (Cook et al. 1997). In our case copper may act either as a required element for chlorophyll synthesis (Henriques 1989, Maksymiec 1997) that is lacking in albino plants or as a toxic stressing compound (Drazkiewicz et al. 2004) which effect results in microspore proplastid development into chloroplast. Whatever, the state of plastid in the microspore at sampling is closely correlated to the regeneration of albino plants through ME (Caredda et al. 2000). Since it is known that copper deficiency induces chlorosis in barley leaves as revealed by a decrease of chlorophyll content (Deriu et al. 2007), it is logical to conclude from our results that the formation of albino plants is due, at least partly, to a lack of copper at the time of sampling.

Microspore embryogenesis and programmed cell death

For the first time, we could demonstrate that a developmental process such as PCD in the anther has different kinetics of development in two cvs. of the same species. PCD in the anther wall sporophytic tissues permits to progressively remove useless cell layers beginning with tapetum at the onset of meiosis and next extending to other cell types (Varnier et al. 2005). PCD is also involved in anther opening by degrading the stomium cells (Sanders et al. 2005), allowing pollen release at maturity. In our case, both DNA laddering and nucleus chromatin condensation indicate that PCD is triggered as early at the young microspore stage in the winter cv. Igri and only at pollen mitosis in the spring cv. Cork. This may be an adaptive process linked to the annual cycle of each cv.

However, the differential triggering of PCD in the anther of both Igri and Cork cvs. cannot be associated with the greater proportion of albino plants following ME in Cork. Indeed, we have previously shown that plastids in Cork microspores have entered a degeneration process at the young microspore stage, whereas those in the Igri cv. are still

functional (Caredda et al. 2000), allowing to regenerate higher proportion of green plants. Using traits linked to the state of the nucleus, we have shown in this work that the anther of the Igri cv. is affected by PCD earlier than the anther of the Cork cv. This suggests that the progressive degradation of plastids in the microspores and next in the pollen grains of barley (Mogensen 1996) is independent of the PCD that occurs in the anther diploid cells.

Further it is known that pollen is affected by PCD that begins in the microspores (Wang et al. 1999a, 1999b) and continues after pollen mitosis in the vegetative cell (Varnier et al. 2005). It is thus plausible to conclude that the occurrence of PCD in the gametophytic haploid microspore/pollen grain is not regulated following the same pathway than the sporophytic diploid anther wall tissues.

The anther pretreatment generates the synchronization of PCD in the whole anther of both cvs. as previously described (Wang et al. 1999a, 1999b). The presence of copper sulphate during the pretreatment does not modify this process when looking at the genomic DNA in the whole anther. However the difference in the response in terms of albinism indicates that copper acts on microspore plastids, enabling them to provide green plants *in fine*.

Further studies are necessary to deepen two aspects of this work. It should be known whether the sporophytic diploid or the gametophytic haploid part of the anther is affected by the pretreatment in particular by copper sulphate. Besides, elucidating the differential triggering of PCD in the anther wall and the microspores/pollen grains may help further understanding the kinetic of plastid degradation and thus the origin of albinism.

Experimental procedures

Plant material

Several cvs. and F1 hybrids were used in this work. For fundamental studies about PCD, two cvs. of two-rowed barley (*Hordeum vulgare* L.) were used, the winter cv. Igri and the spring cv. Cork. The first was considered as the positive control and the latter as a negative control regarding the expected percentage of green plant regeneration (Carreda et al. 2000).

In order to test the effects of copper sulphate in the pretreatment medium on the yield of ME following anther culture four other spring cvs. were used from Florimond Desprez France (Madras, Prisma, Scarlet and Douchka) and seven F1 hybrids from Latvia (Ansiai/Dziugiai, Primus/Anni, Aura/Abava, Danuta 6/131, Dziugai/Ansiai, Saana/Maja and

MerlinSW129/Danuta). These cvs. and F1 hybrids were chosen because they had low rates of DH production or because they produce exclusively albino plants.

Growth conditions

Plants were obtained as described previously (Jacquard et al. 2003). The vigour of the donor plant is a crucial point for the success of ME. Therefore, during plant growth, any form of stress such as pesticide treatment, dehydration or important temperature variations was avoided. The sole preventive treatment against disease consisted in sulphur evaporation during two consecutive nights and applied once a month.

Seeds were germinated on moistened filter paper in a closed Petri dish for 4 days at room temperature. Seedlings were planted in 20 cm diameter pots containing a mixture of peat moss and soil (1:1). Plantlets were grown in the greenhouse at 25°C (night and day) for a week under a 16 h photoperiod ($300\text{--}350 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at approximately 80% of relative humidity. Five NPK (12.12.17) granules were added in each pot the 4th and the 8th week for the 12 spring cvs./hybrids and the 10th and 14th week for the Igri cv. For the winter cv. Igri, seedlings were vernalized for 8 weeks at 4°C (night and day) using a 12 h photoperiod at low light intensity ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Both Igri (vernalized) and spring cvs. seedlings were strictly grown in the same conditions, i.e. in the greenhouse at 25°C. Natural light was provided between May and August (without shadow equipment) and it was supplemented, from September to April, with artificial sodium lighting (400 Watts Sodiclaude) to maintain a photon flux density of $300\text{--}350 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the soil surface.

Spike sampling and sterilization

Spikes were collected when the awns appeared outside the upper leaf. This corresponded to the mid to late uninucleate stage (Jacquard et al. 2003). The developmental stage was checked for each spike by collecting three anthers from flowers located in the middle of the spike. The anthers were squashed in acetic carmine (5% carmine (w/v) in 45% (v/v) acetic acid boiled for 1 h and filtered) on a glass slide. Acetic carmine binds to DNA and delineates the location and the number of nuclei in the microspore. Spikes were then sterilized in ethanol 70% for 5 min and rinsed in sterile distilled water for 5 min. In each spike, the anthers from proximal and distal spikelets were removed because the developmental stage of microspores is not synchronous with the others. The anthers from the central flowers were solely conserved for anther culture, representing approximately 30 anthers per spike (Szarejko 2003).

Anther pretreatment

Thirty anthers collected from the same spike were incubated in a 5.5 cm diameter Petri dish in 10 ml of a medium containing mannitol (62 g/l) providing an osmotic pressure of 180 mosm/l. Anthers were pretreated at 4°C in the dark for 4 days at 80% relative humidity. The pretreatment medium was supplemented with various concentrations of CuSO₄·5H₂O (10, 20, 40 and 80 µM).

Anther culture

After pretreatment, anthers were transferred, without rinsing, onto the culture medium (Jacquard et al. 2003): KH₄NO₃ (0.166 g/l), KNO₃ (1.9 g/l), MgSO₄·7H₂O (0.374 g/l), H₂PO₄ (0.17 g/l), CaCl₂ (0.022 g/l), H₃BO₃ (6.2 mg/l), ZnSO₄·4H₂O (8.6 mg/l), KI (0.83 mg/l), Na₂MoO₄·2H₂O (0.25 mg/l), CuSO₄·5H₂O (2.5 mg/l), MnSO₄·4H₂O (22.3 mg/l), Fe-Na-EDTA (40 mg/l), glutamine (752 mg/l), maltose (60 g/l), mannitol (32 g/l). The pH was then adjusted at 5.6. Then agarose (7 g/l), myoinositol (0.1 mg/l), thiamine-HCl (0.4 g/l), as well as filter sterilized IAA (2mg/l) and BAP (1mg/l) were added.

Twenty-five anthers were plated per 5.5 cm diameter Petri dish. The dishes were sealed with 1 layer of parafilm and maintained in the culture chamber at 26±2°C, with 85% relative humidity, in the dark for 21–28 days.

Plantlet regeneration

As soon as microspore-derived embryos measured approximately 1–2 mm, responding anthers were collected and transferred onto a regeneration medium (Jacquard et al. 2003). The differences between the regeneration and the culture medium corresponded to the replacement of maltose (60 g/l) to sucrose (30 g/l), the replacement of agarose (7 g/l) to agar washed (6 g/l) and the lower concentrations of plant growth regulators (0.4 mg/l for both IAA and BAP). The Petri dishes were maintained in the culture chamber at 26±2°C and 85% of relative humidity with a 16 h photoperiod, at 100 µE m⁻² s⁻¹. After 2 weeks on the regeneration medium, the number of green and albino plantlets was counted.

Microscopy

The effects of copper was only investigated in the spring cv. Cork that provides low amount of green plants and compared to the winter cv. Igri that was used as a control according to Caredda et al. (2000). Anthers were fixed for 24 hours at room temperature in

2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) with 1% (w/v) sucrose and 1% (v/v) Tween 20. Then the samples were rinsed three times for 5 min in distilled water before being dehydrated in an alcohol series and embedded in historesin.

To identify cells affected by PCD, semi-thin (1 µm) sections were cut with a Leica® Jung RM 2055 microtome. Sections were stained with 5 µM Hoechst 33342 for 15 min in the dark, washed with a phosphate buffer saline Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0.1 M, NaCl 9% and examined under an Olympus BH-2 fluorescence microscope.

To follow the ultrastructure of plastids during the ME process, ultra-thin sections were harvested on 150-mesh copper grids with a diamond knife on a Reichert OM U2 ultratome, stained with uranyl acetate/lead citrate, and examined on a JEOL JEM 100S electron microscope at 80 kV.

DNA extraction and analysis

DNA was extracted according to Varnier et al. (2005). Anthers were ground with liquid nitrogen into a fine powder which was stored at – 80°C until use. The powder (200 mg) was suspended in β-mercaptoethanol (5 µl) and Sarkosyl 20% (100 µl). Next, 300 µl of extraction buffer (EDTA 25 mM, NaCl 250 mM, SDS 0,5% (w/v), Tris 200 mM, pH 8) were added and the whole mixture was incubated at 65°C for 10 min. Polyvinylpolypyrrolidone (6%, 24 mg) and acetate ammonium 7,5 M (200 µl) were added. Samples were mixed and incubated for 15 min in ice before centrifugation at 10,000 g during 10 min. The supernatant was mixed with an equal volume of chloroform/isoamyl alcohol (24:1, v/v) and centrifuged for 10 min at 10,000 g. DNA was precipitated by adding an equal volume of isopropanol to the supernatant. Samples were centrifuged for 10 min at 10,000 g. The pellet was washed with 70% ethanol and resuspended in distilled water (30 µl). Contaminating RNAs were removed by incubation at 37°C for 30 min in the presence of RNase (1 mg ml⁻¹). After addition of ammonium acetate 4 M (35 µL) and 95% ethanol (175 µl), samples were mixed and immediately centrifuged 20 min at 10,000 g. The pellet was washed with 80% ethanol and centrifuged 10 min at 10,000 g. The pellet was next dried and resuspended in distilled water. DNA samples (500 ng) were run on a 1% (w/v) agarose gel at 110 V for 45 min. The DNA was stained with SYBR Green I (1/10,000) and revealed under UV. As a control, 500 mg of leaves were treated according to the same protocol.

Statistical analyses

For ME at least 300 anthers from 12 different spikes were used for each test. Cytological features (Figure 1) were the results of 12 independent counts performed for each condition with the standard error (SE) calculated. The data presented are means (\pm SE) of at least 12 measurements performed on 12 different spikes from different donor plants. A difference was considered significant at $P=0.05$. For DNA analysis, the experiments were performed at least three times on samples collected from three different plants.

References

- Alloway, B.J., Jewell, A.W. and Murray, B.G. (1986) Effects of subclinical copper deficiency on pollen development and yield cereals. In: *Proceedings of the Second International Symposium on Role of Micronutrients in Agriculture*, Toulouse, France, pp. 31- 40.
- Azouaou, Z. and Souvré, A. (1993) Effects of copper deficiency on pollen fertility and nucleic acids in the dandurum wheat anther. *Sex. Plant Reprod.*, **6**, 199- 204.
- Barinova, I., Clément, C., Martiny, L., Baillieul, F., Soukupova, H., Heberle-Bors, E. and Touraev, A. (2004) The regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snapdragon by medium pH. *Planta*, **219**, 141-156
- Bernal, M., Sánchez-Testillano, P., del Carmen Risueño, M. and Yruela, I. (2006) Excess copper induces structural changes in cultured photosynthetic soybean cells. *Funct. Plant Biol.*, **33**, 1001-1012.
- Caredda, S. and Clément, C. (1999) Androgenesis and albinism in Poaceae: influence of genotype and carbohydrates. In: *Anther and pollen: from biology to biotechnology* (Clément, C., Pacini, E. and Audran J.C., eds), pp. 211-226. Springer, Berlin, Heidelberg, Tokyo: Springer.
- Caredda, S., Doncœur, C., Devaux, P., Sangwan, R.S. and Clément, C. (2000) Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Sex. Plant Reprod.*, **13**, 95-104.
- Cho, M.J., Jiang, W. and Lemaux, P.G. (1998) Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. *Plant Sci.*, **138**, 229- 244.
- Cistué, L., Valles, M.P., Echavarri, B., Sanz J.M., Castillo, A. (2003) Barley anther culture. In: *Doubled haploid production in crop plants* (Maluszynski, M., Kasha, K., Forster, B.P. and Szarejko, I., eds), pp. 29-34.A manual. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers.
- Cook, C.M., Kostidou, A., Vardaka, E. and Lanaras, T. (1997) Effects of copper on the growth, photosynthesis and nutrient concentrations of *Phaseolus* plants. *Photosynthetica*, **34**, 179-193.
- Dahleen, L. (1995) Improved plant regeneration from barley callus cultures by increased copper levels. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **43**, 267-269.
- Davies, P.A. (2003) Barley isolated microspore culture (IMC) method. In: Doubled haploid production in crop plants, a manual (Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P. and Szarejko, I. eds), pp 49-52. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers.
- Dell, M. (1981) Male sterility and anther structure in copper deficient plants. *Ann. Bot.*, **48**, 599- 608.
- Deriu, D., Calace, N., Bianca, M. and Pietroletti, M. (2007) Morphological and physiological responses of barley plants grown on soils characterized by metal toxicity and metal deficiency. *Ann. Chim.*, **97**, 153-162.
- Devaux, P. and Pickering, R.A. (2005) Haploids in the improvement of Poaceae. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 56. Haploids in crop improvement II* (Palmer, C.E., Keller, W.E. and Kasha, K.J. eds), pp. 215-242. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Drażkiewicz, M., Skórzyńska-Polit, E., and Zbigniew, K. (2004) Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *Biometals*, **17**, 379-387.
- Henriques, F.S. (1989) Effects of copper deficiency on the photosynthetic apparatus of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J. Plant Physiol.*, **135**, 453-458.
- Hosp, J., Maraschin, S.F., Touraev, A. and Boutilier, K. (2006) Functional genomics of microspore embryogenesis. *Euphytica* (in press)
- Jacquard, C., Wojnarowicz, G., Clément, C. (2003) Anther culture in barley. In: *Doubled haploid production in crop plants. A manual* (Maluszynski, M., Kasha, K. Forster, B.P. and Szarejko, I., eds), pp. 21-27. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers.

- Jacquard, C., Asakavicuté, R., Sangwan, R.S., Devaux, P. and Clément, C. (2006) Endogenous physiological traits of donor plant affecting anther culturability in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Rep.*, **25**, 375-381.
- Jewell, A.W., Murray, B.G. and Alloway, B.J. (1988) Light and electron microscope studies on pollen development in barley (*Hordeum vulgare* L.) grown under copper sufficient and deficient conditions. *Plant Cell Environ.*, **11**, 273-281.
- Joosen, R., Cordewener, E., Supena, E.D.J., Vorst, O., Lammers, M., Maliepaard, C., Zeilmaker, T., Miki, B., America, T., Custers, J. and Boutilier, K. (2007) Combined transcriptome and proteome analysis identifies pathways and markers associated with the establishment of rapeseed microspore-derived embryo development. *Plant Physiol.*, **144**, 155-172.
- Kasha, K.J. (2005) Chromosome doubling and recovery of doubled haploid plants. In: *Haploids in Crop Improvement II* (Palmer, D., Keller, W., and Kasha, K., eds), pp 123-152. Heidelberg: Springer.
- Li, H. and Devaux, P. (2001) Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. *Plant Cell Rep.*, **20**, 475-481.
- Li, H. and Devaux, P. (2005) Isolated microspore culture overperforms anther culture for green plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Acta Phys. Plant.*, **27**, 611-619.
- Maksymiec, W. (1997) Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthesis*, **34**, 321-342.
- Malik, M.R., Wang, F., Dirpaul, J.M., Zhou, N., Polowick, P.L., Ferrie, A.M.R. and Krochko, J.E. (2007) Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiol.*, **144**, 134-154.
- Maluszynsky, M., Kasha, K.J. and Szarejko, I. (2003) Published doubled haploid protocols in plant species. In: *Doubled haploid production in crop plants. A manual* (Maluszynski, M., Kasha, K. Forster, B.P. and Szarejko, I., eds), pp. 309-335. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers.
- Maraschin, S.F., Caspers, M., Potokina, E., Wülfert, F., Graner A., Spaink, H.P., and Wang, M. (2006) cDNA array analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis. *Physiol. Plant.*, **127**, 535-550.
- Mogensen, H.L. (1996) The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *Amer. J. Bot.*, **83**, 383-404.
- Muñoz-Amatriaín, M., Svensson J.T., Castillo AM1, Cistué, L., Close, T.J. and Valles, M.P. (2006). Transcriptome analysis of barley anthers: effect of mannitol treatment on microspore embryogenesis. *Physiol. Plant.*, **127**, 551-560.
- Nuutila, A.M., Hamalainen, J. and Mannonen, L. (2000) Optimisation of media nitrogen and copper concentration for regeneration of green plant from polyembryogenic culture of barley. *Plant Sci.*, **151**, 85-92.
- Romeu-Moreno, A. and Mas, A. (1999) Effects of copper exposure in tissue cultured *Vitis vinifera*. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2519-2522.
- Sanders, P.M., Bui, A.Q., Le, B.H. and Goldberg, R.B. (2005). Differentiation and degeneration of cells that play a major role in tobacco anther dehiscence. *Sex. Plant Reprod.*, **17**, 219-241.
- Shariatpanahi, M.E., Bal, U., Heberle-Bors, E. and Touraev, A. (2006) Stresses applied for the reprogramming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiol. Plant.*, **127**, 519-534.
- Szarejko, I. (2003) Anther culture for doubled haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *Doubled haploid production in crop plants. A manual* (Maluszynski, M., Kasha, K. Forster, B.P. and Szarejko, I., eds), pp. 35-42. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers.
- Touraev, A., Vicente, O. and Heberle-Bors, E. (1997) Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci.*, **2**, 297-302.
- Tsuwamoto, R., Fukuoka, H. and Takahata Y. (2007) Identification and characterization of genes expressed in early embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. *Planta*, **225**, 641-652.
- Varnier, A.L., Mazeyrat-Gourbeyre, F., Sangwan, R.S. and Clément, C. (2005) Programmed cell death progressively models the development of anther sporophytic tissues from the tapetum and is triggered in the pollen grain during maturation. *J. Struct. Biol.*, **152**, 118-228.
- Wang, M., Hoekstra, S., van Bergen, S., Lamers, G.E.M., Oppedijk, B.J., van der Heijden, M.W., de Priester, W. and Schilperoort, R.A. (1999a) Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant Mol. Biol.*, **39**, 489-501.
- Wang, M., van Bergen, S., Lamers, G.E.M., Oppedijk, B.J. and Schilperoort, R.A. (1999b) Programmed cell death during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. In: *Anther and pollen: from biology to biotechnology* (Clément, C., Pacini, E. and Audran J.C., eds), pp. 201-209. Springer, Berlin, Heidelberg, Tokyo: Springer.
- Wojnarowicz, G., Jacquard, C., Devaux, P., Sangwan, R.S. and Clément, C. (2002) Influence of copper sulfate on anther culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci.*, **162**, 843-847.
- Wojnarowicz, G., Caredda, S., Devaux, P., Sangwan R.S. and Clément, C. (2004) Effects of different osmoticia on androgenesis and albinism in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Plant Physiol.*, **161**, 747-755.
- Zengin, F.K. and Kirbag, S. (2007) Effects of copper on chlorophyll, proline and abscisic level of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings. *J. Environ. Biol.*, **28**, 561-566.

Nous avons testé l'ajout de sulfate de cuivre dans les milieux de prétraitement et de culture chez quelques cvs. de printemps et hybrides régénérant principalement des plantules albinos. Nos résultats indiquent qu'une concentration de cuivre trop importante est létale pour les anthères. La concentration optimale varie selon les cvs., mais dans tous les cas une concentration supérieure à 40 µM est néfaste. Pour tous les cvs. testés, ce sont les concentrations de 10 µM ou 20 µM qui donnent les meilleurs résultats.

Au niveau de la régénération et notamment du pourcentage de plantules chlorophylliennes, les résultats bénéfiques du cuivre observés chez le cv. modèle Igri (publication II) se sont confirmés chez les cvs. de printemps (publication III). L'ajout de sulfate de cuivre engendre une augmentation du nombre de plantules chlorophylliennes régénérées mais peut engendrer une diminution du nombre total de plantules régénérées chez les hybrides. Un ajout de 10 µM de cuivre chez le cv. Cork engendre une régénération de plantules chlorophylliennes 20 fois supérieure à celle obtenue sur milieu classique. Autre résultat spectaculaire, les cvs. Douchka et Prisma ainsi que les hybrides Dziugiai/Ansia et Primus/Anni régénèrent des plantules chlorophylliennes lorsque du cuivre est ajouté. C'est la première fois que des plantules HD chlorophylliennes sont obtenues avec ces cvs.

Nos résultats recommandent donc l'ajout de sulfate de cuivre dans les milieux de prétraitement et de culture pour l'embryogenèse pollinique chez l'orge. La concentration est à définir en fonction du cv. utilisé mais semble être comprise entre 10 et 20 µM. L'utilisation de sulfate de cuivre semble donc être une bonne solution pour optimiser l'embryogenèse pollinique et améliorer les rendements en plantules chlorophylliennes chez les céréales.

Nos travaux ont montré que le processus de MCP intervient dans les anthères lors du développement pollinique ainsi que durant le prétraitement. Le cv. Igri présente une MCP plus précoce que le cv. Cork. Les travaux de Caredda et al. (2000) avaient montré une altération précoce des chloroplastes chez le cv. Cork qui pourrait être à l'origine de la régénération de plantules albinos chez ce cv. Nos résultats permettent de penser que cette dégradation chloroplastique ne semble pas liée au processus de MCP impliqué dans la maturation de l'anthère et qu'un autre phénomène est impliqué affectant spécifiquement les plastes.

L'orge étant une céréale annuelle, il semblait important d'analyser les résultats obtenus en culture d'anthères en fonction de la saison à laquelle la technique était appliquée, ainsi qu'en fonction de la position de l'épi sur le plateau de tallage.

Publication IV

**Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position
on microspore embryogenesis and albinism.**

**Jacquard C, Asakaviciute R, Hamalian A, Sangwan RS, Devaux P,
Clément C (2006). Plant Cell Reports 25 : 375 - 381**

C. Jacquard · R. Asakaviciute · A. M. Hamalian ·
R. S. Sangwan · P. Devaux · C. Clément

Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis and albinism

Received: 22 April 2005 / Revised: 1 October 2005 / Accepted: 1 October 2005 / Published online: 6 January 2006
© Springer-Verlag 2005

Abstract The effect of donor plants annual cycle and anther/spike position on the production of microspore-derived plants and albinism were studied. We used the winter cv. Igri and the spring cv. Cork, known to respond similarly in anther culture but to produce 78% and 2% of green plants, respectively. In both cvs. the number of microspore-derived plants was significantly higher when the anthers were collected from January to July than from August to December. However, during this period the proportion of albino plants was not altered. Conversely, the anther response decreased from 76.6 to 31.5% in Igri and from 58.8 to 32.0% in Cork when the donor spike originates from the main shoot or the fourth tiller. Significantly, anthers collected from spike of the second tiller enabled us to drastically increase the proportion of regenerated green plantlets, by 16% in Igri and 1800% in Cork.

Keywords Albinism · Anther culture · Barley · Seasonal variation · Tillering effect

Communicated by H. Lötz

C. Jacquard · A. M. Hamalian · C. Clément (✉)
Université de Reims Champagne-Ardenne, UFR Sciences,
Stress Défenses et Reproduction des Plantes,
51687 Reims Cedex 2, France
e-mail: christophe.clement@univ-reims.fr

R. Asakaviciute
Voke branch of Lithuania Institute of Agriculture,
Zalioji a. 2, Traku Voke,
LT-02232 Vilnius, Lithuania

R. S. Sangwan
Université de Picardie Jules Verne, Androgenèse et
Biotechnologies,
33, rue Saint-Leu,
80039 Amiens, France

P. Devaux
Florimond Desprez, Laboratoire Biotechnologies,
BP 41,
59242 Cappelle en Pévèle, France

Abbreviations BBCH: Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Bundessortenamt und CHemische Industrie · cv.: cultivar · cvs.: cultivars · MS: main shoot · SE: standard error

Introduction

The obtention of doubled haploid plants provides a useful tool, enabling plant-breeding cycles to be reduced in time (Devaux and Pickering 2005). Two systems have been developed for the large-scale production in barley: microspore embryogenesis (anther and microspore culture) and interspecific hybridization with *Hordeum bulbosum* L. (Devaux 2003; Hayes et al. 2003; Kasha et al. 2003; Szarejko 2003). The use of microspore embryogenesis and interspecific hybridization in barley has generated a number of cultivars (cv.) currently available and cultivated in many countries (Devaux et al. 1996; Cistué et al. 2003; Szarejko 2003). However, several cultivars cannot be used for improvement through this technique because of albino plantlet regeneration (Caredda and Clément 1999). In some genotypes, up to 100% of microspore-derived plants may be albinos according to the protocol used (Caredda et al. 2000), preventing breeders improving the cultivar using microspore embryogenesis. Thus, optimization of the protocol aiming at increasing the regeneration of green plantlets remains of considerable interest.

Many factors influence the androgenic response in barley and are mostly related either to the physiological conditions during the development of the donor plant or the in vitro growth conditions at each step of the process. In this respect, anther pretreatment is the most important phase. A stress is necessary to switch the gametophytic program of the microspores to the sporophytic developmental pathway, giving rise to haploid embryos (Jähne and Lorz 1995; Touraev et al. 1996a). This microspore reorientation is most often provided by imposing stress such as coldness (Olsen 1987), osmotic stress (Hoekstra et al. 1992), lack of

nutrients (Tourea et al. 1996a), heat-shock (Tourea et al. 1996b), pH variation (Barinova et al. 2004), or any combination of these stresses (Carreda and Clément 1999). The composition of both culture and regeneration media is also critical in terms of green plant regeneration, especially considering the carbon source (Scott and Lyne 1994; Carreda et al. 1999; Naegeli et al. 1999; Wojnarowicz et al. 2004).

Recent reports suggest a positive effect of copper during in vitro culture of various explants in barley (Cho et al. 1998; Nuutila et al. 2000) especially using anther culture (Wojnarowicz et al. 2002). The increase of copper sulphate in the culture medium increases plant regeneration from callus culture (Dalheen 1995), allows the production of green plantlets from scutellum-derived callus in recalcitrant lines (Cho et al. 1998) and significantly increases the percentage of green plant regeneration in the winter cultivar Igri (Wojnarowicz et al. 2002).

The growth conditions of the donor plant development regulate the physiology of the anther in the spike and thus greatly influences microspore response in anther culture (Cistué et al. 2003; Szarejko 2003). Both winter and spring cvs. of barley are annual plants, meaning that their development fluctuates during the annual cycle. In Europe, winter cultivars are sown between September and November because of the requirement for vernalization (Kirby et al. 1985). For spring cvs. mid-February to mid-March is the optimum date for sowing especially when particular malt quality is required (Le Bail and Meynard 2003).

The annual cycle also influences flower physiology and biotechnology. In safflower the flowering cycle fluctuates within the year. Most of the nitrogen nutrition occurs during pre-anthesis and when grains are sown in autumn or spring. The accumulation of nitrogen reserve is thus affected and flowering is delayed (Koutroubas et al. 2004). Similarly in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Kymppi), the competence of isolated microspores for embryogenesis varies all through the year (Ritala et al. 2001). The annual clock may thus have an influence on various biotechnological processes using ephemeral organs such as flowers or anthers. These data thus suggest to further investigate the effect of the annual cycle on plant production from anther culture.

Another aspect that may impact spike physiology, and subsequently the production of anther culture, is the position of the spike on the donor plant. Some cereal shoots develop a plate of tillering, meaning that the shoot base generates several reproductive shoots throughout the year. The formation of the tiller is related to the development of the leaves (Kirby et al. 1985). This developmental process is of importance since it conditions the capacity of the plant to collect solar radiation and further determines plant growth and total yield (Garcia del Moral et al. 1984; Dofing and Karlsson 1993). Most reports regarding tillering deal with the relationship between tillering and leaf emergence, i.e. the leaf number and the tillering are correlated and dependent on both the photoperiod and the temperature (Slafer and Rawson 1995; Abeledo et al. 2004). However no data are available regarding the effect of the spike position on the plate of tillering on microspore reactivity following anther culture.

In this paper, we attempted to take into account the endogenous physiological parameters of the spike optimizing the yield of microspore embryogenesis in barley using anther culture. For this aim, we accurately followed the results obtained throughout the year and according to the position of the spike (tiller number) on the plant. To further appreciate the effects of those two parameters on albinism, we used the winter cv. Igri and the spring cv. Cork known to produce 87% and less than 2% respectively of green plants following anther culture (Carreda et al. 2000).

Materials and methods

Plant material

Two cultivars of two-rowed barley (*Hordeum vulgare* L.) were used for this study, the winter cv. Igri and the spring cv. Cork. The first was considered as the positive control and the latter as a negative control regarding the expected percentage of green plant regeneration (Carreda et al. 2000).

Growth conditions

Plants were obtained as described previously (Jacquard et al. 2003). The experiments were carried out for two consecutive years by the same experimenter. Plants were sown twice a month using seeds from Florimond Desprez. The dates reported in the Results section corresponded to the time of anther sampling.

The vigor of the donor plant is a crucial point for the success of microspore embryogenesis. During plant growth, any form of stress such as pesticide treatment, dehydration or important temperature variations was avoided. The sole preventive treatment against disease consisted in sulphur evaporation during two consecutive nights and applied once a month. Seeds were germinated on moistened filter paper in a closed Petri dish for 4 days at room temperature and ambient light. Seedlings were planted in 20 cm diameter pots containing a mixture of peat moss and earth (1:1). Plantlets were grown in the greenhouse at 25°C (night and day) for a week under a 16 h photoperiod (300–350 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at approximately 80% of relative humidity. Five NPK (12.12.17) granules were added in each pot the 4th and the 8th week for the Cork cv. and the 10th and 14th week for the Igri cv. Plants were examined each day in order to detect the appearance of tillers. The number of leaves on the main shoot (MS) and each tiller were counted according to BBCH scale (Lancashire et al. 1991). For the winter cv. Igri, seedlings were vernalized for 8 weeks at 4°C (night and day) using a 12 h photoperiod at low light intensity (100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Both Igri (vernalized) and Cork seedlings were strictly grown in the same conditions, i.e. in the greenhouse at 25°C. Natural light was provided between May and August (without shadow equipment) and it was supplemented, from September to April, with artificial sodium lighting

(400 Watts Sodiclaude) to maintain a photon flux density of $300\text{--}350 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the soil surface.

Spike sampling and sterilization

Spikes were collected when the awns appeared outside the upper leaf. This corresponded to the mid to late uninucleate stage (Jacquard et al. 2003), which corresponded to the optimal stage of microspore competence (Cistué et al. 2003; Szarejko 2003). The developmental stage was checked for each spike by collecting three anthers from flowers located in the middle of the spike. The anthers were squashed in acetic carmine (5% carmine (w/v) in 45% (v/v) acetic acid boiled for 1 h and filtered) on a glass slide. Acetic carmine binds to DNA and delineates the location and the number of nuclei in the microspore. Spikes were then sterilized in ethanol 70% for 5 min and rinsed in sterile distilled water for 5 min. In each spike, the anthers from proximal and distal flowers were removed because these flowers are not synchronous with the others (Szarejko 2003).

Anther pretreatment

Thirty anthers collected from the same spike were incubated in a 5.5 cm diameter Petri dish in 10 ml of a medium containing mannitol (62 g/l) providing an osmotic pressure of 180 mosm/l. Anthers were pretreated at 4°C in the dark for 4 days at 80% relative humidity.

Anther culture

After pretreatment, anthers were transferred, without rinsing, onto the culture medium (Jacquard et al. 2003): KH₄NO₃ (0.166 g/l), KNO₃ (1.9 g/l), MgSO₄·7H₂O (0.374 g/l), KH₂PO₄ (0.17 g/l), CaCl₂ (0.022 g/l), H₃BO₃ (6.2 mg/l), ZnSO₄·4H₂O (8.6 mg/l), KI (0.83 mg/l), Na₂MoO₄·2H₂O (0.25 mg/l), CuSO₄·5H₂O (2.5 mg/l), MnSO₄·4H₂O (22.3 mg/l), Fe–Na–EDTA (40 mg/l), glutamine (752 mg/l), maltose (60 g/l), mannitol (32 g/l). The pH was then adjusted at 5.6. Thus agarose (7 g/l), myoinositol (0.1 mg/l), thiamine–HCl (0.4 mg/l), as well as filter sterilized NAA (2 mg/l) and BAP (1 mg/l) were added.

Twenty-five anthers were plated per 5.5 cm diameter Petri dish. The dishes were sealed with parafilm and maintained in the culture chamber at 26±2°C, with 85% relative humidity, in the dark for 21–28 days.

Plantlet regeneration

When microspore-derived embryos measured approximately 1–2 mm, responding anthers were collected and transferred onto a regeneration medium (Jacquard et al. 2003). The differences between the regeneration and the culture medium corresponded to the replacement of maltose (60 g/l) to sucrose (30 g/l), the replacement of agarose

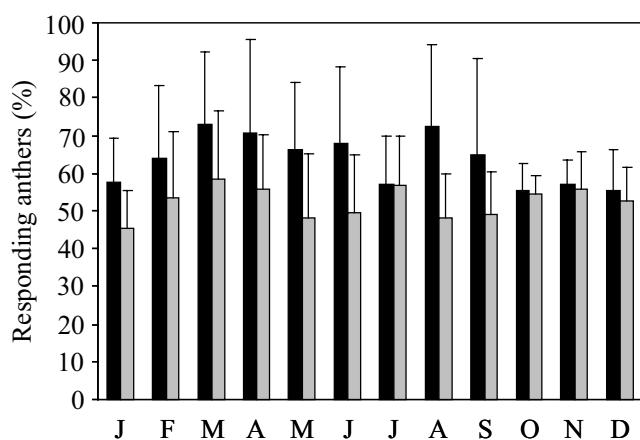


Fig. 1 Percentage of responding anthers throughout the year. Results were scored after 28 days of culture. J: January; F: February; M: March; A: April; M: May; J: June; J: July; A: August; S: September; O: October; N: November; D: December. ■ Winter cv. Igri; □ spring cv. Cork

(7 g/l) to agar washed (6 g/l) and the lower concentrations of plant growth regulators (0.4 mg/l NAA and BAP). The Petri dishes were maintained in the culture chamber at 26±2°C and 85% of relative humidity with a 16 h photoperiod, at $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. After 2 weeks on the regeneration medium, the number of green and albino plantlets were counted.

Statistical analyses

At least 300 anthers from 12 different spikes were used for each test. Twelve independent counts were made for each condition and the standard error (SE) calculated. The data presented are means ($\pm\text{SE}$) of at least 12 measurements performed on 12 different spikes from different donor plants. Mean comparisons were made with the Student's *t* test. A difference was considered significant at $P=0.05$.

Results

Influence of the annual cycle

The data presented were collected during two successive years and provided similar results each year. All through the year, the anther response was higher in the winter cv. Igri than in the spring cv. Cork, though not statistically significant (Fig. 1). In the winter cv. Igri, the response varied from 55.3±7.3 to 72.8±19.5% whereas it fluctuated between 45.7±9.76 and 58.6±18.1% in the spring cv. Cork. It should be noted however that in the winter cv. Igri, two peaks of higher anther response were registered in March and August, whereas in the spring cv. Cork, three peaks were identified in March, July and November.

Regarding plantlet regeneration, the number of haploids was two- to threefold higher in the winter cv. Igri, but both cvs. exhibited a similar profile within the year (Fig. 2). A progressive increase of regeneration occurred from

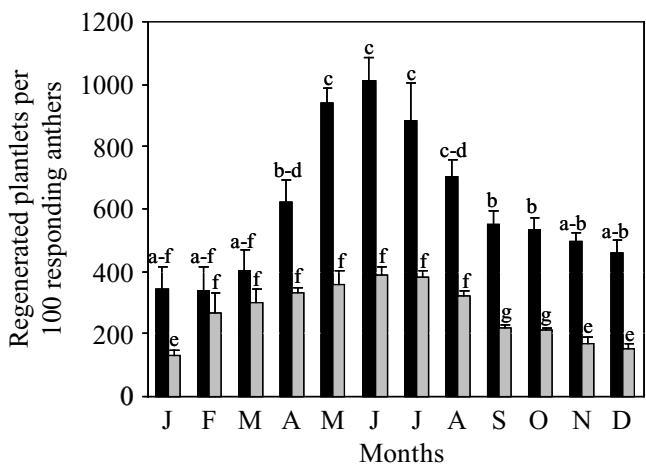


Fig. 2 Plantlet regeneration throughout the year. Results were scored after 15 days of regeneration. Means for a considered parameter were not significantly different when followed by the same letter ($P>0.05$). J: January; F: February; M: March; A: April; M: May; J: June; J: July; A: August; S: September; O: October; N: November; D: December.

■ Winter cv. Igri; □ spring cv. Cork

January to July, followed by a regular decrease from August to December. The most favourable period was registered between April and August in both cvs. The maximum was reached in June and corresponded to 1009.8 ± 76.6 regenerated plantlets per 100 responding anthers in the winter cv. Igri, against 392.6 ± 30.9 in the spring cv. Cork.

The quality of the regenerated plantlets has to be taken into account in the final yield, in particular regarding the proportion of albinism. The percentage of green plants was also affected by the annual cycle. In the winter cv. Igri, the percentage of green plants fluctuated between 70.9 ± 4.0 and $87.6\pm1.8\%$ with a maximum $87.6\pm1.8\%$ in August (Fig. 3a). In the spring cv. Cork green plants were scarce all over the year and the registered differences were not significant (Fig. 3b), though two peaks appeared in February and in August, corresponding to 3.2 ± 1.7 and $3.4\pm2.8\%$ respectively.

Influence of spike position on the tiller

In accordance with the previous data, this set of experiments was carried out between June and September in order to get the optimal response. In both cvs. the number of responding anthers decreased when the donor spike was far from the main shoot on the plate of tillering (Fig. 4). In the winter cv. Igri, the number of responding anthers progressively decreased from $76.6\pm10.6\%$ when anthers were collected on the main shoot, down to $31.5\pm14.2\%$ when anthers were collected on the fourth tiller. Similarly, in the spring cv. Cork, the percentage of responding anthers decreased from 58.8 ± 10.3 to $32.0\pm13.3\%$.

The number of regenerated plantlets following anther culture fluctuated similarly (Fig. 5). Whatever the position of the donor spike on the plant, the number of regenerated plantlets was threefold better in the winter cv. Igri when

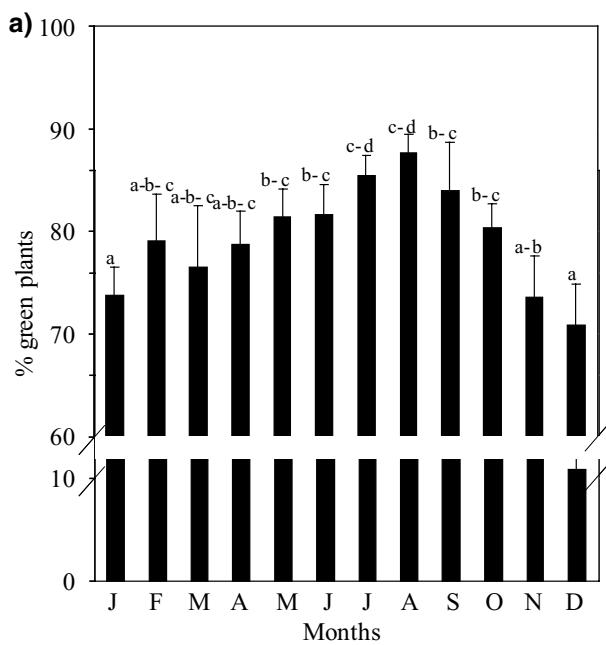


Fig. 3 **a** Green plantlet regeneration in the winter cv. Igri throughout the year. Results were scored after 15 days of regeneration. Means for a considered parameter were not significantly different when followed by the same letter ($P>0.05$). J: January; F: February; M: March; A: April; M: May; J: June; J: July; A: August; S: September; O: October; N: November; D: December. **b** Green plantlet regeneration in the spring cv. Cork throughout the year. Results were scored after 15 days of regeneration. Means for a considered parameter were not significantly different when followed by the same letter ($P>0.05$). J: January; F: February; M: March; A: April; M: May; J: June; J: July; A: August; S: September; O: October; N: November; D: December

compared to the spring cv. Cork. In both cvs. the highest number of plantlets was obtained when the anthers were harvested from the main shoot, reaching 1205.3 ± 135.0 plantlets per 100 responding anthers in the winter cv. Igri and 396.1 ± 29.5 in the spring cv. Cork. Using anthers from the fourth tiller, the number of haploid plantlets per 100 responding anthers was 509.1 ± 150.5 in the winter cv. Igri, against 191.1 ± 29.6 in the spring cv. Cork.

The most striking result was obtained when looking at the proportion of albino plantlets (Fig. 6a and b). In both cvs.

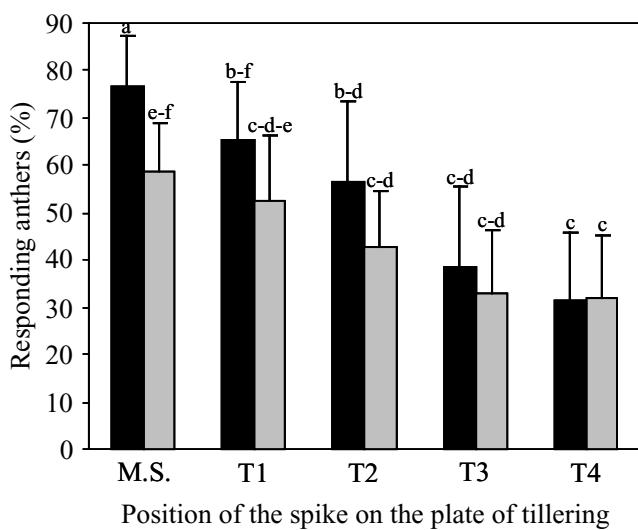


Fig. 4 Fluctuation of anther response according to the spike position on the plate of tillering. Results were scored after 28 days of culture. Means for a considered parameter were not significantly different when followed by the same letter ($P>0.05$). M.S.: Main Shoot; T1: Tiller no. 1; T2: Tiller no. 2; T3: Tiller no. 3; T4: Tiller no. 4. ■ Winter cv. Igri; □ spring cv. Cork

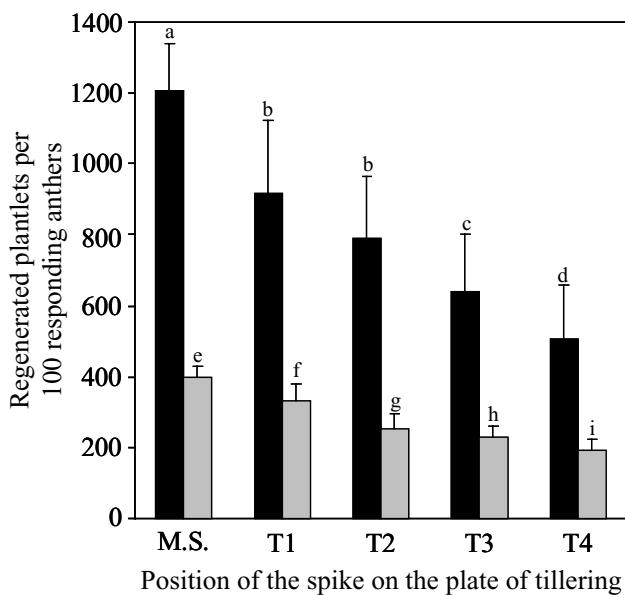


Fig. 5 Fluctuation of plant regeneration according to the spike position on the plate of tillering. Results were scored after 15 days of regeneration. Means for a considered parameter were not significantly different when followed by the same letter ($P>0.05$). M.S.: Main Shoot; T1: Tiller no. 1; T2: Tiller no. 2; T3: Tiller no. 3; T4: Tiller no. 4. ■ Winter cv. Igri; □ spring cv. Cork

the proportion of green plants was homogeneous when the anthers were collected either from the main shoot or from the first, third or the fourth tiller. It corresponded to 78% in the winter cv. Igri and to 2% in the spring cv. Cork. The most notable data were obtained when the anthers were collected from the second tiller. Indeed, the percentage of green plants thus significantly increased from 78.8 ± 2.4 to $89.2\pm3.5\%$ in the winter cv. Igri and from 1.8 ± 1.0 to

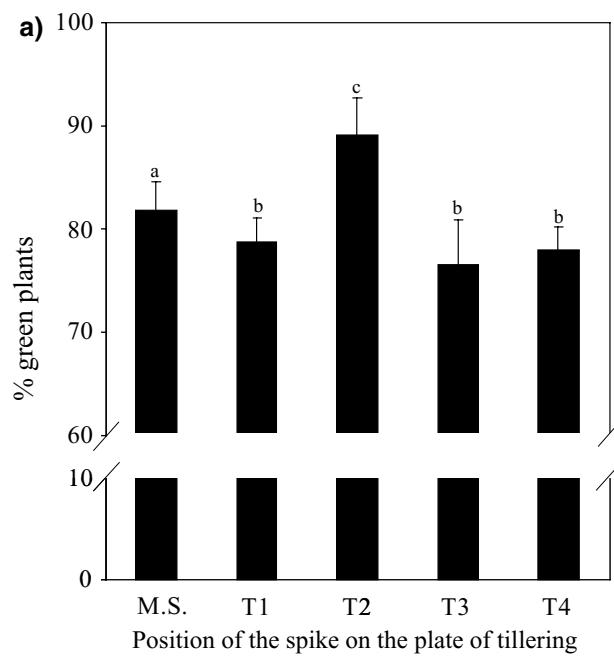


Fig. 6 **a** Green microspore-derived plantlets regeneration in the winter cv. Igri according to the spike position on the tillering plate. Results were scored after 15 days of regeneration. Means for a considered parameter were not significantly different when followed by the same letter ($P>0.05$). M.S.: Main Shoot; T1: Tiller no. 1; T2: Tiller no. 2; T3: Tiller no. 3; T4: Tiller no. 4. **b** Green microspore-derived plantlets regeneration in the spring cv. Cork according to the spike position on the tillering plate. Results were scored after 15 days of regeneration. Means for a considered parameter were not significantly different when followed by the same letter ($P>0.05$). M.S.: Main Shoot; T1: Tiller no. 1; T2: Tiller no. 2; T3: Tiller no. 3; T4: Tiller no. 4

$38.7\pm12.6\%$ in the spring cv. Cork, known to produce almost exclusively albino plantlets following anther culture.

Discussion

The data presented here provides further evidence that the physiology of the donor spike is a crucial point for the

success of anther culture in barley. Both the annual cycle and the position of the spike on the plant interfere not only with the yield of anther culture but also with the quality of regenerated plantlets in terms of albinism. These results are of importance since they may contribute to the regeneration of green haploid plants from recalcitrant cvs. of barley previously known to produce mostly albino plants.

Annual cycle and anther culture

Considering the total yields derived from anther culture, the best results were obtained in both cvs. when the spikes were sampled from April to August. These results are in agreement with previous studies performed using either anther culture (Jähne et al. 1991) or isolated microspores in barley (Ritala et al. 2001). In this respect, it should be noticed that there are no differences between anther and isolated microspore culture, meaning that the annual clock affects both the anthers and the microspores. In this case, the sporophytic tissues of the anther does not protect the microspores against external influence (Pulido et al. 2005).

We suggest that the percentage of green plant regeneration is affected differently by the annual clock in the two cvs. Indeed, the best sampling period for the winter cv. Igri extended from May to October. In the spring cv. Cork, despite the low percentage of green plants reported, the best sampling months corresponded to February and August. Since no information is available on this topic in the literature to date, further studies might focus on other recalcitrant cvs.

Influence of tiller position

For the first time, we demonstrated that the position of the tiller on the plate of tillering has an impact on both the number of regenerated plantlets and the percentage of green plants. Information about the differential physiology of tillers in barley and in other cereals (i.e. wheat and rice) is scarce. The plate of tillering is a part of shoot growing horizontally on the soil. One trait that has been improved in the recent years by barley breeders is the increase of tillering and the ability of tillers to catch photosynthetically active radiations, aiming at improving photoassimilation (Abeledo et al. 2004).

Nevertheless, it is likely that there is a negative gradient of assimilates in the plate from the main shoot to the fourth tiller, especially considering nutrients originating from the roots. This is supported by previous work demonstrating that tillering is affected by internal factors, due to an increase in competition among the plant organs for carbon assimilate or nitrogen compounds (Kirby et al. 1985). This means that the spike on the fourth tiller is less supplied with nutrients than the one on the main shoot. Owing to the importance of the physiological state of the spike for the success of microspore embryogenesis in barley (Mouritzen and Holm 1994; Jacquard et al. 2003), the progressive starvation of the spikes along the tillering plate could explain that the yield of anther culture is lower when the donor spike is far away from the main shoot.

The enhanced positive effect of the second tiller on the rate of green regeneration is much more difficult to interpret. The appearance of tillers is dependant on the development of the vegetative organs, especially the roots (Friend 1965). It has been demonstrated in *Arabidopsis thaliana* that there is a gradient of plant growth regulators (auxin) along the root, with a higher concentration in the middle (Stals and Inzé 2001; Casimiro et al. 2003). Similarly, the second tiller in the centre of the plate could be the site of special concentration for plant growth regulators transferred to the spike, promoting the regeneration of green plantlets from anthers collected from this spike. In the spring cv. Cork, it has been demonstrated that the androgenic albinism is due to early degradation of plastids in the microspores (Caredda et al. 2000). A particular hormonal balance in the spike of the second tiller could influence plastid behaviour in the microspores (Reinbothe et al. 1993) and thus the rate of albino plant formation.

The tiller effect on androgenetic albinism may be deepened thoroughly in all the cereal crops producing mostly albino plantlets following anther culture. Further, it has been shown recently that the use of appropriate concentrations of copper sulphate in the anther culture media is effective in reducing the proportion of albino plantlets (Wojnarowicz et al. 2002). This suggests undertaking a further experimental design to test the effect of copper sulphate on anthers originating from the second tiller in recalcitrant cultivars.

Acknowledgement The authors thank Dr Steve Millan for the English correction of the manuscript.

References

- Abeledo LG, Calderini DF, Slafer GA (2004) Leaf appearance, tillering and their coordination in old and modern barleys from Argentina. *Field Crops Res* 86:23–32. DOI: 10.1016/S0378-4290(03)00168-0
- Barinova I, Clément C, Martiny L, Baillieul F, Soukupova H, Heberle-Bors E, Touraev A (2004) Regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snapdragon by medium pH. *Planta* 219:141–146. DOI: 10.1007/s00425-003-1202-5
- Caredda S, Clément C (1999) Androgenesis and albinism in Poaceae: influence of genotype and carbohydrates. In: Clément C, Pacini E, Audran JC (eds) Anther and pollen: from biology to biotechnology. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 211–228
- Caredda S, Devaux P, Sangwan RS, Clément C (1999) Differential development of plastids during microspore embryogenesis in barley. *Protoplasma* 208:248–256
- Caredda S, Doncoeur C, Devaux P, Sangwan RS, Clément C (2000) Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley. *Sex Plant Reprod* 13:95–104. DOI: 10.1007/s004970000043
- Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci* 8:165–171. DOI: 10.1016/S1360-1385(03)00051-7
- Cho MJ, Jiang W, Lemieux PG (1998) Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decrease albinism. *Plant Sci* 138:229–244. DOI: 10.1016/S0168-9452(98)00162-9

- Cistué L, Valles MP, Echavarri B, Sanz JM, Castillo A (2003) Barley anther culture. In: Maluszynski M, Kasha K, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled haploid production in crop plants. A manual. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 29–34
- Dahleen L (1995) Improved plant regeneration from barley callus cultures by increased copper levels. *Plant Cell Tissue Org Cult* 43:267–269
- Devaux P (2003) The *Hordeum bulbosum* (L.) method. In: Maluszynski M, Kasha K, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled haploid production in crop plants. A manual. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 15–20
- Devaux P, Pickering RA (2005) Haploids in the improvement of Poaceae. In: Palmer CE, Keller WE, Kasha KJ (eds) Biotechnology in agriculture and forestry, vol 56. Haploids in crop improvement II. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 215–242
- Devaux P, Zivy M, Kilian A, Kleinhofs A (1996) Doubled haploids in barley. In: Scoles G, Rossnagel B (eds) Proceedings of the V international oat conference and VII international barley genetics symposium, , Saskatoon, pp 213–222
- Dofing SM, Karlsson MG (1993) Growth and development of uniculm and conventional-tillering barley lines. *Agron J* 85:58–61
- Friend DJC (1965) Tillering leaf production in wheat as affected by temperature and light intensity. *Can J Bot* 43:1063–1076
- Garcia del Moral LF, Ramos JM, Recalde L (1984) Tillering dynamics of winter barley as influenced by cultivar and nitrogen fertilizer: a field study. *Crop Sci* 24:179–181
- Hayes P, Corey A, DeNoma J (2003) Doubled haploid production in barley using the *Hordeum bulbosum* (L.) technique. In: Maluszynski M, Kasha K, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled haploid production in crop plants. A manual. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 5–14
- Hoekstra S, Van Zijderveld MH, Louwerse JD, Heidekamp F, Van der Mark F (1992) Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. *Plant Sci* 86:89–96. DOI: 10.1016/0168-9452(92)90182-L
- Jacquard C, Wojnarowicz G, Clément C (2003) Anther culture in barley. In: Maluszynski M, Kasha K, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled haploid production in crop plants. A manual. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 21–27
- Jähne A, Lazzeri PA, Jäger-Gussem M, Lörz H (1991) Plant regeneration from embryogenic cell suspensions derived from anther cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 82:74–80
- Jähne A, Lörz H (1995) Cereal microspore culture. *Plant Sci* 109:1–12. DOI: 10.1016/0168-9452(95)04149-O
- Kasha KJ, Simion E, Oro R, Shim YS (2003) Barley isolated microspore culture protocol. In: Maluszynski M, Kasha K, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled haploid production in crop plants. A manual. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 43–48
- Kirby EJM, Appleyard M, Fellowes G (1985) Leaf emergence and tillering in barley and wheat. *Agronomie* 5:193–200
- Koutroubas SD, Papakosta DK, Doitsinis A (2004) Cultivar and seasonal effects on the contribution of pre-anthesis assimilates to safflower yield. *Field Crops Res* 90:263–274. DOI: 10.1016/j.fcr.2004.03.009
- Lancashire PD, Bleiholder H, Langenlütdecke P, Stauss R, Van den Boom T, Weber E, Witzen-Berger A (1991) An uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Ann Appl Biol* 119:561–601
- Le Bail M, Meynard JM (2003) Yield and protein concentration of spring malting barley: the effects of cropping systems in the Paris Basin (France). *Agronomie* 23:13–27. DOI: 10.1051/agro: 2002029
- 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
- Naegeli M, Schmid JE, Stamp P, Buter B (1999) Improved formation of regenerable callus in isolated microspore culture of maize: impact of carbohydrates, plating density and time of transfer. *Plant Cell Rep* 19:177–184. DOI: 10.1007/s002990050730
- Nuutila AM, Hamalainen J, Mannonen L (2000) Optimisation of media nitrogen and copper concentration for regeneration of green plants from polyembryogenic cultures of barley. *Plant Sci* 151:85–92. DOI: 10.1016/S0168-9452(99)00202-2
- Olsen FL (1987) Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare*. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources. *Carlsberg Res Commun* 52:393–404
- Pulido A, Bakos F, Castillo A, Valles MP, Barnabas B, Olmedilla A (2005) Cytological and ultrastructural changes induced in anther and isolated-microspore cultures. *J Struct Biol* 149:170–181. DOI: 10.1016/j.jsb.2004.10.009
- Reinbothe S, Reinbothe C, Parthier B (1993) Methyl Jasmonate-regulated translation of nuclear-encoded chloroplast proteins in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Biol Chem* 268:10606–10611
- Ritala A, Mannonen L, Oksman-Caldentey M (2001) Factors affecting the regeneration capacity of isolated barley microspores (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Rep* 20:403–407. DOI: 10.1007/s002990100345
- Scott P, Lyne RL (1994) The effect of different carbohydrate sources upon the initiation of embryogenesis from barley microspores. *Plant Cell Tissue Org Cult* 36:129–133
- Slafer GA, Rawson HM (1995) Photoperiod x temperature interactions in contrasting wheat genotypes: time to heading and final leaf number. *Field Crops Res* 44:73–83. DOI: 10.1016/0378-4290(95)00077-1
- Stals H, Inzé D (2001) When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci* 8:359–364. DOI: 10.1016/S1360-1385(01)02016-7
- Szarejko I (2003) Anther culture for doubled haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). In: Maluszynski M, Kasha K, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled haploid production in crop plants. A manual. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 35–42
- Touraev A, Indrianto A, Wratschko I, Vicente O, Heberle-Bors E (1996a) Efficient microspore embryogenesis in wheat induced by starvation at high temperature. *Sex Plant Reprod* 9:209–215
- Touraev A, Pfosser M, Vicente O, Heberle-Bors E (1996b) Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta* 200:144–152
- Wojnarowicz G, Caredda S, Devaux P, Sangwan RS, 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. DOI: 10.1078/0176-1617-01061
- Wojnarowicz G, Jacquard C, Devaux P, Sangwan RS, Clément C (2002) Influence of copper sulfate on anther culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci* 162:843–847. DOI: 10.1016/S0168-9452(02)00036-5

Afin d'optimiser le protocole de culture d'anthères chez l'orge, nous avons suivi les résultats obtenus en fonction des saisons. L'orge étant une céréale, elle possède un plateau de tallage. Nous nous sommes donc également intéressés à l'impact de la position de l'épi sur le plateau sur les résultats obtenus en embryogenèse pollinique.

L'embryogenèse pollinique donne des résultats qui fluctuent en fonction de la saison à laquelle la technique est utilisée, bien que les conditions de culture des plantes mères et des anthères soient fixées. Les épis prélevés sur des plantes cultivées durant les 7 premiers mois de l'année produisent plus de plantules que ceux prélevés sur des plantes d'automne ou d'hiver. Seule la quantité totale de plantules régénérées varie en fonction de la saison car le pourcentage de plantules chlorophylliennes ou le pourcentage de réponse des anthères reste plus ou moins constant.

La position de l'épi sur le plateau de tallage influe également sur les résultats obtenus par culture d'anthères. Plus l'épi prélevé se trouve sur une talle éloignée du brin maître et plus la réponse et le nombre de plantules régénérées diminuent. Le résultat le plus surprenant réside dans le fait que les anthères des épis issus de la deuxième talle produisent un pourcentage de plantules chlorophylliennes beaucoup plus élevé que les autres épis. Chez le cv. Cork, ce pourcentage atteint 39% contre 2% de moyenne avec les autres talles. Les raisons biologiques de ce phénomène restent indéterminées et doivent être éclaircies.

Ces différents résultats fournissent donc de nouvelles pistes d'amélioration des rendements obtenus par embryogenèse pollinique chez les céréales. Ainsi l'utilisation de la technique durant les mois les plus favorables couplée à une attention particulière portée à la position de l'épi sur le plateau de tallage, permettraient l'obtention d'un maximum de plantules exploitables.

Les résultats obtenus avec les publications II, III et IV ont donc montré que les rendements en embryogenèse pollinique peuvent être améliorés et qu'il est possible d'envisager l'utilisation de cette technique sur des cvs. jusqu'à présent récalcitrants. A ce niveau, nous avions donc optimisé le protocole, mais nous ne connaissions toujours pas la cause des différences observées entre les cvs. au niveau de la régénération de plantules chlorophylliennes.

Nous avons donc décidé d'étudier l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress pendant le prétraitement afin de mieux comprendre les mécanismes déclenchés par le stress initial.

Publication V

Microspore embryogenesis in barley: anther pretreatment stimulates plant defence gene expression

Jacquard C, Mazeyrat-Gourbeyre F, Devaux P, Baillieul F, Clément C (2007). En préparation.

Microspore embryogenesis in barley: anther pretreatment stimulates plant defence gene expression

Cédric Jacquard¹ · Florence Mazeyrat-Gourbeyre¹ · Pierre Devaux² · Fabienne Baillieul¹ · Christophe Clément^{1*}

¹ Université de Reims Champagne-Ardenne, URVVC UPRES EA 2069, UFR Sciences, Laboratoire Stress Défenses et Reproduction des Plantes, 51687 Reims Cedex 2, France

² Florimond Desprez, Laboratoire Biotechnologies, BP41, 59242 Cappelle en Pévèle, France

* Corresponding author: christophe.clement@univ-reims.fr

Abstract. Microspore embryogenesis (ME) consists in reorienting the gametophytic pollen programme of the microspore towards a new embryo sporophytic programme. This process requires a stressing pretreatment that is usually performed in the anther for several days. Despite the universal use of the stress, there are only poor investigations about the physiological processes that occur in the anther during this step. In order to further understand the mechanisms triggered by stressing conditions, we followed the anther reaction by measuring the expression of stress related genes in two cvs. of barley (*Hordeum vulgare L.*) differing in their response to ME. Genes encoding enzymes involved in the oxidative stress, in the synthesis of jasmonic acid and those encoding PR proteins were up-regulated in the whole anther, indicating that the anther perceives the stress and reacts by triggering general plant defence mechanisms. In particular, both GST and Chit 2b genes can be considered as good markers of anther reactivity owing to their kinetic and rate of induction. Besides, the effect of copper sulphate was characterized by a moderation in the expression of up-regulated genes, which may be correlated with its positive effect on the yield of ME. The relationships between the anther wall layers and the developing microspores appeared as a key point in the understanding of the ME process.

Keywords Anther culture · Barley · Copper · Defence mechanisms · Pretreatment · Stress

Abbreviations

AGPs	Arabinogalactan proteins
DH	Doubled haploid
JA	Jasmonic acid
ME	Microspore embryogenesis
NBT	Nitro blue tetrazolium
ROS	Reactive oxygen species

Introduction

The production of doubled haploid (DH) plants is a useful tool for breeding many crop species (Devaux and Pickering 2005, Forster et al. 2007). This technology has generated a number of cultivars currently available and cultivated all over the world (Devaux et al. 1996; Cistué et al. 2003; Szarejko 2003). The most used system for large-scale DH production in barley is microspore embryogenesis (ME) through either anther or isolated microspore culture (Davies 2003; Kasha and Maluszynski 2003; Szarejko 2003). Microspores are initially destined to develop into pollen grains but can be reprogrammed and behave like a zygote, thus, developing into a haploid embryo (Kimber and Riley 1963).

A stress is necessary to switch the gametophytic pollen program of the microspore towards a new sporophytic embryo developmental pathway (Touraev et al. 1996a; Maraschin et al. 2005a; Shariatpanahi et al. 2006a). The success of the DH technology from male gametophytes depends on stress quality (Heberle-Bors 1985), meaning that the pretreatment is the key step of ME. Several abiotic stresses alone or in combination can be used to trigger ME such as coldness (Kiviharju and Pehu 1998; Gonzalez and Jouve 2005; Labbani et al. 2005), heat-shock (Custers et al. 1994; Touraev et al. 1996a; Touraev et al. 1996b; Rimberia et al. 2005), osmotic shock (Hoekstra et al. 1992; Caredda et al. 2000; Touraev et al. 2001; Li and Devaux 2003; Wojnarowicz et al. 2004), pH variation (Barinova et al. 2004), lack of nutrients (Touraev et al. 1996a), heavy metals like lithium (Zonia and Tupy 1995), or copper sulphate (Wojnarowicz et al. 2002). Nevertheless, many species remain recalcitrant to microspore embryogenesis and regenerate albino plantlets (Caredda and Clément 1999). For example, in barley, the winter cv. Igri regenerates approximately 90% of green plantlets whereas the spring cv. Cork produces exclusively albino plantlets (Caredda and Clément 1999; Caredda et al. 2000). This problem may be overcome by the addition of copper-sulphate during anther pretreatment and culture (Wojnarowicz et al. 2002; Jacquard et al. 2008).

In plants, abiotic stresses induce physiological changes (Knight and Knight 2001; Langridge et al. 2006), as revealed by modifications in cellular and molecular processes (Chinnusamy et al. 2006; Langridge et al. 2006; Verslues et al. 2006; Talame et al. 2007). The application of stress is followed by adaptive mechanisms including water uptake, accumulating of solutes, modifying of cells properties or accumulation of protective proteins, allowing to restore the initial state and to limit stress damages to plant tissues (Netting 2002; Verslues et al. 2006). Several regulation pathways are usually triggered in such process, involving calcium, abscissic acid, ethylene, jasmonic acid, salicylic acid or reactive oxygen

species (Netting 2002; Verslues et al. 2006). These signal molecules induce modifications in the expression of many genes that represent the cell response enabling to overcome the stress (Chinnusamy et al. 2004; Langridge et al. 2006). In the case of ME, it has been shown that the expression of transcription factors common with zygotic and somatic embryogenesis are also induced during the process (Vrinten et al. 1999; Baudino et al. 2001; Boutilier et al. 2002; Joosen et al. 2007; Malik et al. 2007; Tsuwamoto et al. 2007).

In this respect the transcriptome of barley reoriented microspores following mannitol pretreatment was recently studied in details. It could be shown that the stressing pretreatment blocks the expression of pollen-related genes (Maraschin et al. 2006), whereas new sets of genes related to sugar metabolism, stress response and proteolysis are stimulated (Maraschin et al. 2006; Muñoz-Amatriaín et al. 2006). These results enabled to identify molecular markers associated with the induction of ME in barley. However these works only deal with microspores collected at the end of pretreatment and which are already reoriented. The various events that occur in the whole anther during the early steps of pretreatment and that really trigger the change of microspore programme were not yet investigated.

In order to understand in details the physiological effects of the stressing pretreatment in the anther, we decided to follow the occurrence of stress responses at various steps of the process. In this optic, we followed both the $O_2^{\bullet-}$ generation in the anther tissue and the expression of 11 stress-related genes. The work was performed (i) in both the winter cv. Igri and the spring cv. Cork, which represent a nice model for the investigation of ME in barley (Caredda et al. 2000) and (ii) in the presence/absence of copper sulphate owing of its effect on the process of ME (Jacquard et al. 2008).

Materials and methods

Plant material, growth conditions and anther pretreatment

We used two-rowed barley (*Hordeum vulgare* L.) cvs., namely the winter cv. Igri and the spring cv. Cork from the Florimond Desprez company. Plants were obtained as described previously (Jacquard et al. 2003; Jacquard et al. 2006). Spikes were collected at the uninucleate microspore stage (Cistué et al. 2003; Szarejko 2003). The stage of pollen development was followed using the Hoechst 33342 nucleus staining according to Varnier et al. (2005).

Table 1: Primers used for real-time RT-PCR. Optimal oligonucleotide sequences for real-time RT-PCR were predicted by primer express program to prevent faint PCR products as primer dimer and false amplicon

Genes	Accession number	Primer sequence forward 5'- -3'	Primer sequence reverse 5'- -3'
<i>Actin</i>	U21907	TGG GTCAACTATGTTCCCGG	GTGCCACCACCTTGATCTTCA
<i>Elongation factor 1 alpha (ef1α)</i>	L11740	GATAGTTGTTTAGTCGTTGGTTATT	CACCAACACAACCGAACGATAC
<i>13-Lipoxygenase (Lox)</i>	AJ507212	CTGCACGGATTATGCACTGG	TACAAGGCCGTCGATGGAGG
<i>Allene Oxide Synthase (AOS)</i>	AJ250864	GCATGCATCTGTTCGGTTCT	GGCTTATTACACTGGCAAGATTG
<i>Allene Oxide Cyclase (AOC)</i>	AJ308488	ATCTGCATCCTGATCCAGCAC	CTGATGTGCCGTAGTCGC
<i>Oxalate Oxidase (OxO)</i>	Y14203	CGAGATCGGCATGGTGATG	CACGCACCACCCCTGGAGTA
<i>Glutathion-S-Transferase (GST)</i>	AF109194	CAGTGCCTGCCTGGATATT	GCCGCAAGCCTACCAACA
<i>Barwin</i>	Y10814	ACTGGGACACCGTCTCGC	AATCTAGTCGCCAGTCGA
<i>Chitinase (Chit2b)</i>	X78672	CGATCGGAAGGACCTTGT	GCCGTCATCCAGAACCAA
<i>Glucanase (Gluc)</i>	M62907	GCCATGTTCAACGAGAACCCAG	CGACTTGTCCGGGTTGAAGA
<i>PR1</i>	X74939	GTCTGCAACAACAACGGCG	TTCTGTCCAACAACATTCCCG
<i>PR10</i>	AY2207346	ATGAGCAAGTAGCCCGGTGTT	GAAAAACTCAATACACACCCAAAC
<i>Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL)</i>	X97313	CGCAAACCGAGCTTGGACTA	TCACTGGTTGGCAAGGTATT

We followed the expression of stress related-genes during both *in vivo* development and *in vitro* pretreatment. For *in vivo* development, we collected anthers at the sampling stage (T0), 48 h and 96 h later (young pollen grain stage).

For *in vitro* culture, spikes were collected at the uninucleate microspore stage, then sterilized in ethanol 70% and rinsed in sterile distilled water. In each spike, the anthers from proximal and distal flowers were removed because these flowers are not synchronous with the others (Szarejko 2003). Thirty collected anthers from the same spike were incubated in a 5.5 cm diameter Petri dish in 10 mL of a medium containing mannitol (62 g/l), providing an osmotic pressure of 180 mosm/L, and copper sulphate (10 µM) or not. Anthers were pretreated at 4°C in the dark at 80% of relative humidity and sampled after 0, 3, 6, 9, 15, 24, 36, 48, 72 and 96 h for RNAs extraction.

NBT Staining

$\text{O}_2^{\bullet-}$ was detected *in situ* as described by Doke (1983) with some modifications. Before the pretreatment and after 48 h and 96 h, anthers were immersed in 0.1% NBT (yellow nitroblue tetrazolium), 10 mM NaN_3 and 50 µM NADPH. After 20 min staining at room temperature under light, the NBT-treated anthers were placed in 95% (v/v) ethanol to stop the reaction, remove pigments, and preserve the tissue integrity.

RNA extraction, RT-PCR and quantitative Real-Time RT-PCR analysis

One hundred and eighty anthers (approximately 50 mg), collected from 6 different spikes, were collected for each sample and ground in liquid nitrogen. Total RNAs were isolated with Extract All® protocol (Eurobio) according to the manufacturer's instructions.

RNAs were reverse transcribed with SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen™) according to the manufacturer's instructions. We used barley *actin* and *eflα* genes to normalise the different samples for differences in the amount of plant RNA (Gjetting et al. 2004). We followed expressions of 11 genes involved in the different plant stress response pathways (Table 1).

PCR conditions were those described by Bézier *et al.* (2002): 95°C for 15 s (denaturation) and 60°C for 1 min (annealing/extension) for 40 cycles on a GeneAmp 5700 Sequence Detection System (PE Biosystems). Transcript level was calculated using the standard curve method and normalized against barley *actin* and *eflα* genes as an internal controls (Gjetting et al. 2004). The sample at the sampling stage (T0) was used as a reference sample for each cultivar. Experiments were repeated 5 times in duplicate.

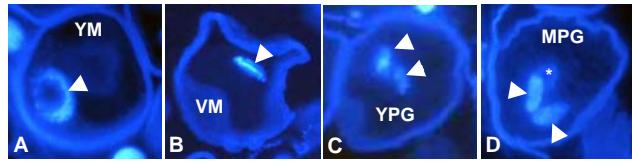


Fig. 1: **A.** Young microspore (YM) characterized by its round shape nucleus (arrowhead). X 450. **B.** Vacuolated microspore (VM) with typical lens shape nucleus (arrowhead). X 450. **C.** Young pollen grain (YPG) including the 2 nuclei (arrowheads), one in the vegetative and one in the generative cell. X 450. **D.** Mature pollen grain (MPG) with two sperm cells (arrowheads) and the vegetative cell (star). X 450.

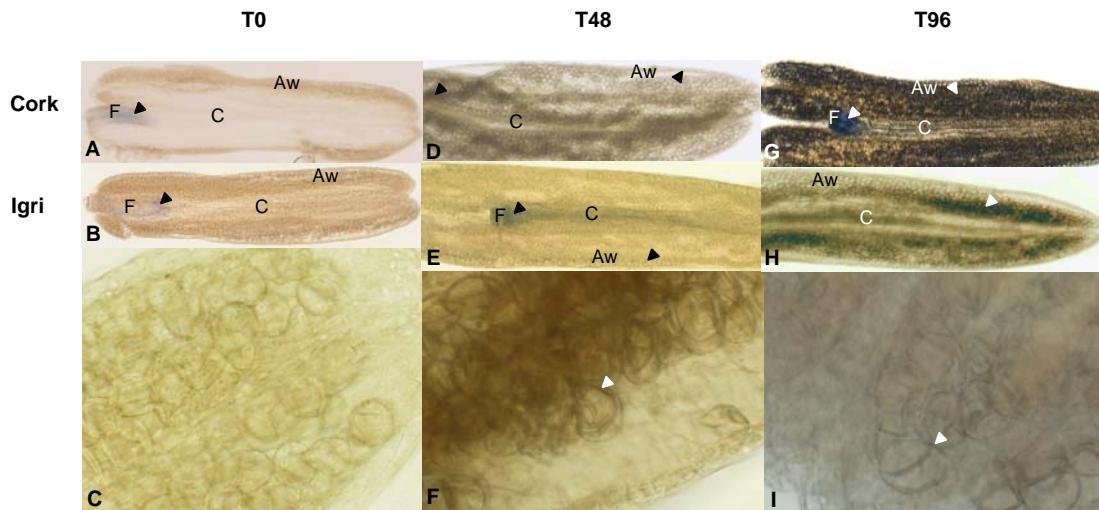


Fig. 2: Histochemical localization of O_2^- generation in anthers at sampling (T0), after 48 h (T48) and after 96 h (T96) of pretreatment by nitroblue tetrazolium (NBT) staining. NBT forms a blue-dark formazan precipitate upon reduction by superoxide. F: filament ; Aw: anther wall ; C: connective. **A.** Cork anther at sampling (T0). Typical blue staining was detected in the filament (arrowhead). X 15. **B.** Igri at T0. Blue staining was visible in the filament (arrowhead). X 15. **C.** Focus on Igri microspore at T0. No staining was visible in vacuolated microspores. X 150. **D.** Cork at T48. Anther wall exhibited moderate blue staining (arrowhead). X 20. **E.** Igri at T48. Dark-blue staining was visible in the upper part of the filament, in the connective tissue and in a less extent in the anther wall (arrowheads). X 20. **F.** Focus on Cork microspore at T48. Dark coloration was detected on microspore wall (arrowhead). X 150. **G.** Cork at T96. Dark-blue staining was visible in filament and anther wall (arrowhead). X 20. **H.** Igri at T96. Anther wall exhibited dark staining (arrowhead). X 20. **I.** Focus on Igri microspore at T96. Dark staining was detected on microspore wall (arrowhead). X 150.

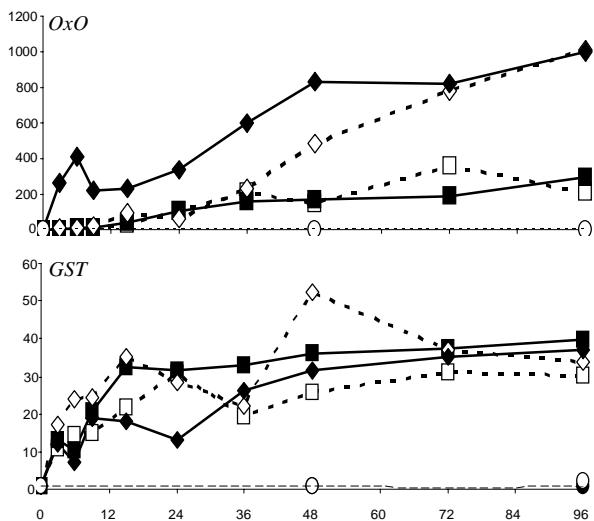


Fig. 3: Expression levels of OxO and GST genes were quantified by real-time RT-PCR during anther pretreatment (3, 6, 9, 15, 24, 48, 72 and 96 hours) and *in vivo* development. -□- Igri mannitol pretreated anthers ; -■- Igri mannitol and copper sulphate pretreated anthers - ●- Igri pollen development ; -◇- Cork mannitol pretreated anthers ; -◆- Cork mannitol and copper sulphate pretreated anthers - ○- Cork pollen development

Results

Kinetic of pollen development

We have defined the kinetic of pollen *in vivo* development in order to compare the data with the duration of anther pretreatment. Pollen development was synchronous in the 2 cvs. At the time of sampling, microspores were at the uninucleate stage, as revealed by the round shape nucleus (Fig. 1A). Most of the microspores reached the late uninucleate stage 48 h afterwards (Fig. 1B), the young pollen grain stage after 96 h (Fig. 1C) and the mature pollen grain stage one day later (Fig. 1D).

Superoxide radical detection

At the time of sampling, no reaction was visible in the anther wall or in the microspores, except in the upper part of the filament of the both cvs. (Figs. 2A, B, C). After 48 h of pretreatment, dark blue typical stain was observed in the anther wall of the Cork cv. (Fig. 2D), in the connective tissue of the Igri cv. (Fig. 2E) and the staining was positive on the pollen wall (Fig. 2F). The staining was more intense at the end of anther pretreatment, especially in the spring cv. Cork (Figs 2G, H). At that time the reaction was also positive in the pollen wall (Fig. 2I).

Genes encoding enzymes protecting against oxidative stress

Both *OxO* and *GST* genes were studied (Fig. 3). The transcript level of both genes did not fluctuate significantly in the anther during *in vivo* pollen development. In Igri the expression of the *OxO* gene was similar in anthers pretreated with and without copper. The expression was stimulated after 15 h of treatment and slowly increased thereafter until the end of pretreatment to reach a 200-fold induction factor. In Cork transcript accumulation was much higher than in Igri, reaching up to 1,000 fold at 96 h, but the expression profile depended on copper sulphate. In the absence of copper sulphate, there was a regular increase of expression between 24 and 96 h of pretreatment. With copper sulphate a strong induction was observed after 6 h of pretreatment (induction factor close to 400), followed by a more progressive increase until 48 h. The induction factor thus reached 800 and next slightly augmented until the end of pretreatment.

The expression of the *GST* gene was similar in presence or absence of copper sulphate except at 48 h in the Cork cv. In Igri, the expression increased during the first 24 h and thus remained constant. In Cork without copper, a first peak was noticed after 15 hours and a

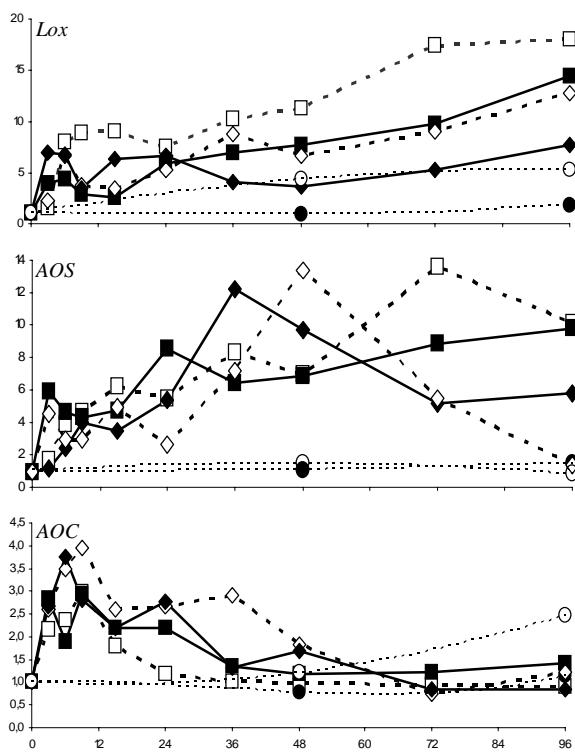


Fig. 4: Expression levels of Lox, AOS and AOC genes were quantified by real-time RT-PCR during anther pretreatment (3, 6, 9, 15, 24, 48, 72 and 96 hours) and *in vivo* development. ---□--- Igri mannitol pretreated anthers; —■— Igri mannitol and copper sulphate pretreated anthers - ●— Igri pollen development ; ---◇--- Cork mannitol pretreated anthers ; —◆— Cork mannitol and copper sulphate pretreated anthers - ○— Cork pollen development

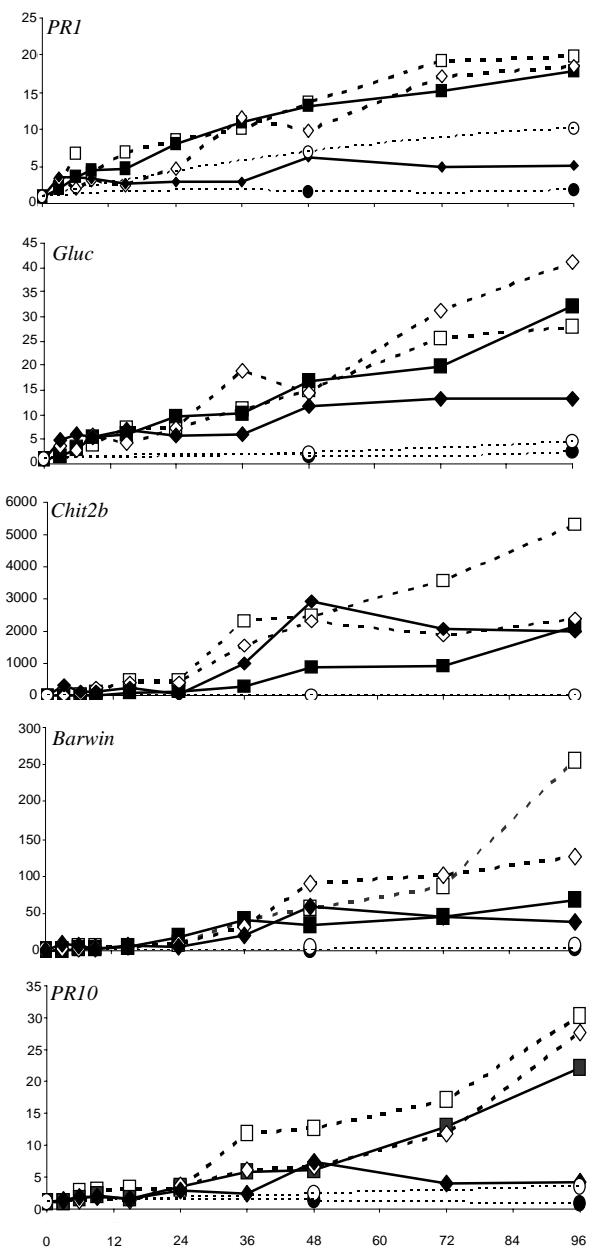


Fig. 5: Expression levels of selected five PR-genes were quantified by real-time RT-PCR during anther pretreatment and *in vivo* development. ---□--- Igri mannitol pretreated anthers; —■— Igri mannitol and copper sulphate pretreated anthers - ●— Igri pollen development ; ---◇--- Cork mannitol pretreated anthers —◆— Cork mannitol and copper sulphate pretreated anthers - ○— Cork pollen development

second one at 48 h. In the presence of copper, the first peak appeared after only 3 h and a second one at 9 h. In both cases, the induction factor was in the range of 30 at 48 and 96 h.

Genes encoding enzymes involved in JA biosynthesis

Here again the expression of the 3 *Lox*, *AOS* and *AOC* genes were only poorly or not induced in the anthers during *in vivo* pollen development (Fig. 4). When the medium was devoid of copper sulphate the *Lox* gene expression was induced in the anthers of both cvs. within 6 h after the onset of pretreatment. The transcript level next increased during the whole of pretreatment with a final induction factor slightly higher in Igri than in Cork. Globally the induction profile of this gene was similar to the one above in copper sulphate treated anthers but at a lower level. In Igri anthers the expression of the *AOS* gene progressively increased during pretreatment whether the medium contained copper sulphate or not. In Cork anthers, a peak of expression was observed after 36 or 48 h depending on the presence of copper. Regarding the *AOC* gene, its expression was slightly stimulated in the first hours of pretreatment whatever the cv. and the presence of copper and then decreased to the basal level.

Genes encoding PR proteins

In this respect *PR1*, *Gluc*, *PR10*, *Barwin* and *Chit 2b* were followed and appeared as the most responsive genes to the pretreatment conditions (Fig. 5). During *in vivo* pollen development their expression was stimulated but with low induction factors. It should be noticed however that in Cork, the transcript level of the *PR1* gene was similar to the level in copper sulphate treated anthers.

During pretreatment the anthers of the 2 tested cvs. did not react in the same way (Fig. 5). In Igri, the transcript level of the 5 genes augmented during anther pretreatment. The increase was regular considering both *PR1* and *Gluc* genes. In the case of *PR10*, *Barwin* and *Chit 2b*, the expression suddenly augmented at 24 h and continued to increase regularly thereafter until the end of pretreatment. Despite a global similar profile, some differences among various gene expressions could be noticed. First the induction factor was in the same range considering *PR1*, *Gluc* or *PR10* genes, reaching 20-30 after 4 days of treatment. In the meantime, the expression of the *Barwin* gene was enhanced by 270. The most spectacular induction was registered following the *Chit 2b* gene since the expression was multiplied by up to 5,300 at the end of pretreatment without copper sulphate. Second the presence of copper sulphate did not modify *PR1* or *Gluc* transcript levels when compared to the treatment

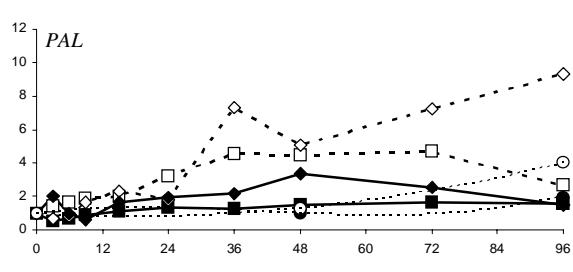


Fig. 6: Expression levels of *PAL* were quantified by real-time RT-PCR during anther pretreatment (3, 6, 9, 15, 24, 48, 72 and 96 hours) and *in vivo* development. - - □ - - Igri mannitol pretreated anthers ; - ■ - Igri mannitol and copper sulphate pretreated anthers - ● - Igri pollen development ; - - ◆ - - Cork mannitol pretreated anthers ; - - ♦ - - Cork mannitol and copper sulphate pretreated anthers - ○ - Cork pollen development

without copper but it generated a lower induction of expression for *PR10*, *Barwin* and *Chit 2b* genes.

In Cork gene expression in anthers treated without copper could be compared to the one in Igri, except the *Chit 2b* and the *Barwin* genes for which the maximum of induction was measured at 48 h and remained stable thereafter. When compared to *in vivo* pollen development, the addition of copper sulphate in the pretreatment medium resulted in the absence of significant stimulation of *PR1* and *PR10* gene expression and a lower induction (only 3 fold) of the *Gluc* gene expression. In the meantime the *Barwin* transcript level was similarly to the one in Igri, whereas, there was no significant difference in the transcript level of the *Chit 2b* gene related to the presence of copper sulphate.

Gene encoding an enzyme involved in the phenylpropanoid biosynthesis pathway

In both cvs. the expression of the *PAL* gene was not significantly stimulated during *in vivo* pollen development (Fig. 6). In absence of copper sulphate, the *PAL* transcript level remained stable during the first 24 h but next increased 5 fold in Igri and up to 10 fold in Cork until the end of the pretreatment. In the presence of copper, there was weak or no stimulation of the *PAL* gene expression either in Igri or in Cork.

Discussion

Our results show that barley anthers are able to perceive abiotic stressing conditions very early during pretreatment and to respond by triggering various aspects of stress related physiology.

An oxidative burst occurs in anthers during pretreatment

The pretreatment induces an oxidative burst in anthers as revealed by the formation of $O_2^{\bullet-}$ that gives rise to hydrogen peroxide H_2O_2 . This result indicates that the anther is sensitive to pretreatment. Indeed oxidative burst is one of the earliest response of plant cells to various types of stresses (Bolwell et al. 2002; Rentel et al. 2004) and leads to reactive oxygen species (ROS) accumulation (Bhattacharjee 2005). Among ROS, H_2O_2 may have a central role in the anthers as diffusible signal molecule allowing selective induction of defence-related genes (Varnova et al. 2002). Since the NBT positive reaction was mainly detected in the anther wall layers and poorly in the microspores, the question remains however whether the microspores, which represent the targets of the process, also develop an oxidative burst and thus react to the stress of pretreatment.

In addition, the pretreatment stimulates the *OxO* expression. Oxalate oxidase is a germin-like protein which degrades oxalate into H₂O₂ and CO₂ (Woo et al. 1998). The expression of *OxO* gene is either constitutive in some reproductive tissues (Dunwell et al. 1998), or induced following pathogen attack (Dunwell et al. 1998) and upon environmental stresses (Hurkman et al. 1994; Zhang et al. 1995; Zhou et al. 1998), especially in barley (Hurkman and Tanaka 1996). In our system, the production of ROS during the pretreatment is coherent with the expression of this gene (Woo et al. 1998).

Our results also show that there is an induction of *GST* expression in the anther during pretreatment. The stimulation of this gene expression may be correlated with 3 processes that occur in the anther. First GSTs are involved in cell protection against the harmful effect of ROS (Marrs 1996; Kampranis et al. 2000). It is likely that ROS represents a secondary stress factor responsible for the induction of antioxidant enzymes. Indeed many types of biotic and abiotic stresses are known to cause oxidative stress (Gong et al. 2005), the promoter region of many plant *GST* genes contains elements responsive to ROS (Chen and Singh 1999; Garreton et al. 2002) and O₂^{•-} is produced in barley anthers during pretreatment. It should be noticed that *GST* gene expression is also stimulated under stress that do not lead to ME (Maraschin et al. 2006), meaning that its expression is stimulated upon stressing conditions whatever the fate of microspores. Second, it has been reported that *GST* gene expression is spatially and temporally regulated during plant development (Marrs 1996, Bailly et al. 2004), especially in barley during both *in vivo* microspore development and following *in vitro* stress pretreatment (Maraschin et al. 2006). Third, *GST* gene expression is associated with *in vitro* morphogenesis (Holmberg and Bülow 1998; Gong et al. 2005) although the mechanism whereby stress enhances morphogenesis is not clear. So far, the up-regulation of the *GST* gene in microspore derived embryos is considered as a precocious marker of microspore embryogenesis in barley (Vrinten et al. 1999; Maraschin et al. 2006).

The pretreatment stimulates defence and stress-related gene expression

The expression of the 3 genes encoding the first enzymes involved in JA biosynthesis is stimulated in the anther during stressing pretreatment. This is in accordance with the literature since JA is known to be involved in plant reaction to biotic or abiotic stresses (Czapski and Saniewski 1992; Ozturk et al. 2002; Afitlhire et al. 2005; Lorenzo and Solano 2005). The anther pretreatment inducing microspore reorientation is a typical abiotic stress caused by coldness and high osmotic pressure. The presence of copper sulphate in some experiments may also be considered as an abiotic additional chemical stress. In greater details, our data

show that the peak of *AOC* transcripts is over after 24 h in Igri and 36 h in Cork, while the levels of both *Lox* and *AOS* transcripts continued to increase. We thus suppose that (i) the stress of the pretreatment stimulates the expression of the 3 *Lox*, *AOS* and *AOC* genes within a few hours and leads to the synthesis of JA and (ii) after a few hours, a negative feedback leading to the reduction of *AOC* expression occurs, although both *Lox* and *AOS* expression remains stimulated.

Genes encoding PR proteins are known to be expressed during the end of both flower and pollen development (Lotan et al. 1989; Worrall et al. 1992; Van Loon et al. 2006), especially in barley anthers (Liljeroth et al. 2005). It is thus not surprising to measure their expression during *in vivo* pollen development, i.e. *PR1*, which expression at the young pollen grain stage is higher than in copper sulphate stressed anthers of Cork.

Beside their developmental regulation, genes encoding PR proteins have their expression stimulated by pathogens but also by abiotic stresses such as drought, salinity, wounding or elicitor treatments (Hanfrey et al. 1996; Thomma et al. 1998; Yeh et al. 2000). Our study confirms that abiotically stressed anthers of barley also react by inducing the expression of genes encoding PR proteins. *PR1*, *Gluc* and *PR10* gene expression is stimulated during the whole of pretreatment. These genes are known to respond to fungal infection in barley (Gjetting et al. 2004; Leah et al. 1991; Steiner-Lange et al. 2003) but no information is available about their involvement in response to abiotic stress. Similarly, *Barwin* encodes a protein similar to the antifungal chitin-binding protein hevein from rubber tree latex and its expression has been described as induced in response to ethylene stimulus or virus infection (Pritsch et al. 2000; Wu et al. 2004). It seems that all these genes may also be regulated in the anthers of barley undergoing the abiotic stress of pretreatment.

The expression profile of the *Chit2b* gene is of particular interest in the context of ME, and this for several reasons. First it is the most stimulated among the 11 tested genes, the induction factor reaching up to 5,300. Second chitinases are known to play a nursing role in carrot somatic embryogenesis by providing somatic embryogenesis-promoting factors (Van Hengel 1998) and are next required for the process of carrot embryogenesis itself (Kragh et al. 1996). Third, chitinases catalyse the hydrolysis of arabinogalactan proteins (Van HenGel et al. 2001), which are accurately regulated during the process of ME in maize and other species (Thompson and Knox 1998; Paire et al. 2003; Borderies et al. 2004). Fourth, in addition to its implication in plant reaction to pathogen attack (Kruger et al. 2003; Gjetting et al. 2004), *Chit2b* gene seems to be also involved in cold resistance (Yeh et al. 2000) which coincides with the anther pretreatment that is performed at 4°C. We can suppose that the induction of

Chit2b gene expression is correlated to both the anther reaction to pretreatment stress and the triggering of microspore reorientation through the regulation of AGPs.

Similarly to *PRI*, the expression of the *PAL* gene encoding the PAL first enzyme in the synthesis of phenylpropanoids (Kervinen et al. 1998; Wen et al. 2005) is slightly stimulated in the *in vivo* developed anthers. This is coherent with previous findings demonstrating the requirement of phenylpropanoids for normal pollen development (Van der Meer et al. 1992; Matsuda et al. 1996). However the pretreatment without copper results in a higher stimulation of *PAL* gene expression in barley anthers, which is in accordance with the literature indicating this gene as responsive to abiotic stresses (Peltonen and Karjalainen 1995; Kervinen et al. 1998).

Copper sulphate seems to limit induction of defence-related gene expression

The presence of copper in the pretreatment medium has not the same effects in the two tested cvs. The stimulation of gene expression is poorly modified in Igri whereas the one in Cork is much more limited, especially considering *PRI*, *Gluc* and *PR10* genes. However, the stimulation of *Chit2b* and *Barwin* gene expression is lower in the presence of copper for both cvs. In this respect copper sulphate at 10 µM acts as a "stress buffer" and limits defence gene expression in response to pretreatment stress, especially in the Cork cv. The reason of this differential reaction remains to be elucidated. However, a weaker reaction of the Cork anthers to the stress of pretreatment due to copper may be correlated to a better response of microspores to the ME process (Jacquard et al. 2008).

High copper concentrations are known to generate stress leading to the production of ROS in wheat (Navari-Izzo et al. 1998) or in *Arabidopsis thaliana* (Drazkiewicz et al. 2004). In the barley cv. Nure, copper alone stimulates the expression of more defence genes than the combination of cold and copper stress (Atienza et al. 2004). Our results are in agreement with these latter data. To date, our pretreatment additionally contains mannitol which represents a third source of osmotic stress that may interact with this reaction.

Whatever anther or isolated microspores culture is used for DH production, the stressing pretreatment that induces the arrest of microspore gametophytic programme and reorientes towards a zygote programme occurs in complete anthers, even though efficient protocol avoiding pretreatment was recently optimized (Sahariatpanahi et al. 2006b). Thus the understanding of the biological process that leads to this huge phenomenon must take the whole organ into account and the physiological processes that occur within the anther. The

mRNAs were extracted from the whole anthers including anther wall layers and the target microspores. The variation in gene expression may thus be related to this situation. Especially, it is difficult to estimate whether genes are expressed in the sporophytic or gametophytic tissues of the anther. This point should be further deepened in the future using either *in situ* hybridization or differential measurement of gene expression separating anther wall and microspores.

Acknowledgements

The authors would like to thanks Ms. Carine Hécart for assistance in the determination of pollen stage development.

References

- Afiflile M, Fukushige H, McCracken C, Hildebrand D (2005) Allene oxide synthase and hydroperoxide lyase product accumulation in *Artemisia* species. *Plant Sci* 169(1): 139-146
- Atienza S, Faccioli P, Perrotta G, Dalfino G, Zschiesche W, Humbek K, Stanca A, Cattivelli L (2004) Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions. *Plant Sci* 167: 1359-1365
- Bailly C, Leymarie J, Lehner A, Rousseau S, Côme D, Corbineau F (2004) Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. *J Exp Bot* 55: 475-483
- Barinova I, Clément C, Martiny L, Baillieul F, Soukupova H, Heberle-Bors E and Touraev A (2004) Regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snapdragon by medium pH. *Planta* 219(1): 141-146
- Baudino S, Hansen H, Brettschneider R, Hecht V, Dresselhaus T, Lörz H, Dumas C, Rogowsky P (2001) Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta* 213: 1-10
- Bézier A, Lambert B, Baillieul F (2002) Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol* 108(2): 111-120
- Bhattacharjee S (2005) Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Curr Sci* 89(7): 1113-1121
- Bolwell G, Bindschedler L, Blee K, Butt V, Davies D, Gardner S, Gerrish C, Minibayeva F (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot* 53: 1367-1376
- Borderies G, Le Béchec M, Rossignol M, Lafitte C, Le Deunff E, Beckert M, Dumas C, Matthys-Rochon E (2004) Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. *Eur J Cell Biol* 83(5): 205-212
- Boutilier K, Offringa R, Sharma V, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu C, Van Lammeren A, Miki B, Custers J, van Lookeren Campagne M (2002) Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* 14: 1737-1749
- Caredda S, Clément C (1999) Androgenesis and albinism in Poaceae: influence of genotype and carbohydrates. In: C. Clément, Pacini E. and Audran J.C. (éds). Anther and pollen: from biology to biotechnology. Berlin, Springer-Verlag: 211-228
- Caredda S, Doncoeur C, Devaux P, Sangwan RS, Clément C (2000) Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Sex Plant Reprod* 43: 1-10
- Chen W, Singh B (1999) The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the *Arabidopsis* GST6 promoter is mediated in part by an ocs element. *Plant J* 19(6): 667-677
- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot* 55(395): 225-236
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK (2006) Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiol Plantarum* 126(1): 52-61

- Cistué L, Valles MP, Echavarri B, Sanz JM, Castillo A (2003) Barley anther culture. In: M. Maluszynski, Kasha K.J., Forster B.P. and Szarejko I. (éds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers: 29-34
- Custers J, Cordewener J, Nollen Y, Dons H, Lookeren Campagne M (1994) Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. Plant Cell Rep 13(5): 267-271
- Czapski J, Saniewski M (1992) Stimulation of ethylene production and ethylene-forming enzyme in fruits of the non-ripening nor and rin tomato mutants by methyl jasmonate. J Plant Physiol 139: 265-268
- Davies P (2003) Barley isolated microspore culture (IMC) method. In: M. Maluszynski, Kasha K.J., Forster B.P. and Szarejko I. (éds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers: 43-47
- Devaux P, Pickering RA (2005) Haploids in the improvement of Poaceae. In: C. Palmer, Keller W. and Kasha K. (éds). Biotechnology in agriculture and forestry, vol 56. Haploids in crop improvement II. Berlin, Heidelberg, New York, Springer
- Devaux P, Zivy M, Kilian A, Kleinhofs A (1996) Doubled haploids in barley. In: A. Slinkard, Scoles G. and Rossnagel B. (éds). Proceedings of V International Oat Conference and VII International Barley Genetics Symposium. Saskatoon, University Extension Press, University of Saskatchewan. 1: 213-222
- Doke N (1983) Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. Physiol Plant Pathol 23: 345-357
- Dunwell JM (1998) Cupins: A new superfamily of functionally diverse proteins that include germins and plant storage proteins. Biotech Genet Eng Rev 15: 1-32
- Drazkiewicz M, Skorzynska-Polit E, Krupa Z (2004) Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. BioMetals 17: 379-387
- Forster BP, Heberle-Bors E, Kasha KJ, Touraev A. (2007) The resurgence of haploids in higher plants. Trends Plant Sci 12: 368-375
- Garretón V, Carpinelli J, Jordana X, Holguíne L (2002) The as-1 promoter element is an oxidative stress-responsive element and Salicylic Acid activates it via oxidative species. Plant Physiol 130: 1516-1526
- Gjetting T, Carver T, Skot L, Lyngkjaer M (2004) Differential gene expression in individual papilla-resistant and powdery mildew-infected barley epidermal cells. Mol Plant Microbe Int 17(7): 729-738
- Gong H, Jiao Y, Hu W, Pua EC (2005) Expression of glutathione-S-transferase and its role in plant growth and development in vivo and shoot morphogenesis *in vitro*. Plant Mol Biol 57(1): 53-66
- Gonzalez JM, Jouve N (2005) Microspore development during *in vitro* androgenesis in triticale. Biol Plantarum 49(1): 23-28
- Hanfrey C, Fife M, Buchanan-Wollaston V (1996) Leaf senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. Plant Mol Biol 30(3): 597-609
- Heberle-Bors E (1985) *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review. Theor Appl Genet 71(3): 361-374
- Hoekstra S, van Zijderveld M, Louwerse J, Heidekamp F, van der Mark F (1992) Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. Plant Sci 86(1): 89-96
- Holmberg N, Bülow L (1998) Improving stress tolerance in plants by gene transfer. Trends Plant Sci 3: 61-66
- Hurkman WJ, Lane BG, Tanaka CK (1994) Nucleotide sequence of a transcript encoding a Germin-like protein that is present in salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. Plant Physiol 104: 803-804
- Hurkman WJ, Tanaka CK (1996) Germin gene expression is induced in wheat leaves by powdery mildew infection. Plant Physiol 111(3): 735-739
- Jacquard C, Asakavičiute R, Hamalian A, Sangwan RS, Devaux P, Clément C (2006) Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis and albinism. Plant Cell Rep 25: 375-381
- Jacquard C, Nollin F, Hécart C, Zuka A, Gaudal D, Rashal I, Sangwan R, Devaux P, Mazeyrat-Gourbeyre F, Clément C (2008) Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. Plant Biotechnol J: submitted
- Jacquard C, Wojnarowicz G, Clément C (2003) Anther culture in barley. In: M. Maluszynski, Kasha K.J., Forster B.P. and Szarejko I. (éds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers: 21-27
- Joosen R, Cordewener J, Supena E, Vorst O, Lammers M, Maliepaard C, Zeilmaker T, Miki B, America T, Custers J, Boutilier K (2007) Combined transcriptome and proteome analysis identifies pathways and markers associated with the establishment of rapeseed microspore-derived embryo development. Plant Physiol 144: 155-172
- Kampranis SC, Damianova R, Atallah M, Toby G, Kondi G, Tsichlis PN, Makris AM (2000) A novel plant Glutathione S-Transferase/peroxidase suppresses bax lethality in yeast. J Biol Chem 275(38): 29207-29216

- Kasha K, Maluszynski M (2003) Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. In: M. Maluszynski, Kasha K.J., Forster B.P. and Szarejko I. (éds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers: 1-5
- Kervinen T, Peltonen S, Teeri T, Karjalainen R (1998) Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase genes in barley induced by fungal infection or elicitors. *New Phytol* 139(2): 293-300
- Kimber G, Riley G (1963) Haploid angiosperms. *Bot Rev* (29): 480-509
- Kiviharju E, Pehu E (1998) The effect of cold and heat pretreatments on anther culture response of *Avena sativa* and *A. sterilis*. *Plant Cell Tiss Org* 54(2): 97-104
- Knight H, Knight M (2001) Abiotic stress signalling pathway: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* 6: 262-267
- Kragh K, Hendriks T, De Jong A, Lo Schiavo F, Bucherna N, Hojrup P, Mikkelsen J, De Vries S (1996). Characterization of chitinases able to rescue somatic embryos of the temperature-sensitive carrot variant *ts11*. *Plant Mol Biol* 31: 631-645
- Kruger WM, Szabob LJ, Zeyen RJ (2003) Transcription of the defense response genes chitinase IIb, PAL and peroxidase is induced by the barley powdery mildew fungus and is only indirectly modulated by R genes. *Physiol Mol Plant P* 63: 167-178
- Labbani Z, Richard N, De Buyser J, Picard E (2005) Chlorophyllian durum wheat obtained by isolated microspores culture: importance of the pretreatments. *Comptes rendus Biologie* 328(8): 713-723
- Langridge P, Paltridge N, Fincher G (2006) Functionnal genomics of abiotic stress tolerance in cereals. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*. 4(4): 343-354
- Leah R, Tommerup H, Svendsen I, Mundy J (1991) Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *J Biol Chem* 266(3): 1564-1573
- Li H, Devaux P (2003) High frequency regeneration of barley doubled haploid plants from isolated microspore culture. *Plant Sci* 164(3): 379-386
- Liljeroth E, Marttila S, Bothmer R (2005) Immunolocalization of defense-related proteins in the floral organs of barley (*Hordeum vulgare L.*). *J Phytopathol* 153(11-12): 702-709
- Lorenzo O, Solano R (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opin Plant Biol* 8: 532-540
- Lotan T, Ori N, Fluhr R (1989) Pathogenesis-Related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. *Plant Cell* 1(9): 881-887
- Marrs KA (1996) The functions and regulation of Glutathione S-Transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 127-158
- Malik M, Wang F, Dirpaul J, Zhou N, Polowick P, Ferrie A, Krochko J (2007) Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiol* 144: 134-154
- Maraschin S, Caspers M, Potokina E, Wulfert F, Graner A, Spaink H, Wang M (2006) cDNA array analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis. *Physiol Plantarum* 127(4): 535-550
- Maraschin S, de Priester W, Spaink H, Wang M (2005) Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *J Exp Bot* 56(417): 1711-1726
- Matsuda N, Tsuchiya T, Kishitani S, Tanaka Y, Toriyama K (1996) Partial male sterility in transgenic tobacco carrying antisense and sense PAL cDNA under the control of a tapetum-specific promoter. *Plant Cell Physiol* 37: 215-222
- Munoz-Amatriain M, Svensson J, Castillo A, Cistué L, Close T, Valles M (2006) Transcriptome analysis of barley anthers: effect of mannitol treatment on microspore embryogenesis. *Physiol Plantarum* 127: 551-560
- Navari-Izzo F, Quartacci M, Pinzino C, Vecchia F, Sgherri C (1998) Thylakoid-bound and stromal antioxidative enzymes in wheat treated with excess copper. *Physiol Plantarum* 104: 630-638
- Netting A (2002) pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions. II. Modifications in modes of metabolism induced by variation in the tension on the water column and by stress. *J Expl Bot* 53(367): 151-173
- Ozturk N, Talame V, Deyholos M, Michalowski C, Galbraith D, Gozukirmizi N, Tuberrosa R, Bohnert H (2002) Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol Biol* 48: 551-573
- Paire A, Devaux P, Lafitte C, Dumas C, Matthys-Rochon E (2003) Proteins induced by barley microspores and their derived androgenic structures promote in vitro zygotic maize embryo formation. *Plant Cell Tiss Org* 73: 167-176
- Peltonen S, Karjalainen R (1995) Phenylalanine ammonia-lyase activity in barley after infection with Bipolaris sorokiniana or treatment with its purified xylanase. *J Phytopathol* 143(4): 239-245
- Pritsch C, Muehlbauer GJ, Bushnell WR, Somers DA, Vance CP (2000) Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Mol Plant Microbe Int* 13(2): 159-169

- Rentel M, Lecourieux D, Ouaked F, Usher S, Petersen L, Okamoto H, Knight H, Peck S, Grierson C, Hirt H, Knight M (2004) OXII kinase is necessary for oxidative burst-mediated signaling in *Arabidopsis*. *Nature* 427: 858-861
- Rimberia F, Sunagawa H, Urasaki N, Ishimine Y, Adaniya S (2005) Embryo induction via anther culture in papaya and sex analysis of the derived plantlets. *Sci Hortic* 103(2): 199-208
- Shariatpanahi M, Bal U, Heberle-Bors E, Touraev A (2006a) Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiol Plantarum* 127(4): 519-534
- Shariatpanahi M, Belogradova K, Hessamvaziri L, Heberle-Bors E, Touraev A (2006b) Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment. *Plant Cell Rep* 25: 1294-1299
- Steiner-Lange S, Fischer A, Boettcher A, Rouhara I, Liedgens H, Schmelzer E, Knogge W (2003) Differential defense reactions in leaf tissues of barley in response to infection by *rhynchosporium secalis* and to treatment with a fungal avirulence gene product. *Mol Plant Microbe Int* 16(10): 893-902
- Szarejko I (2003) Anther culture for doubled haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). In: M. Maluszynski, Kasha K.J., Forster B.P. and Szarejko I. (éds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers: 35-42
- Talame V, Ozturk N, Bohnert H, Tuberosa R (2007) Barley transcript profiles under dehydratation shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *J Exp Bot* 58(2): 229-240
- Thomma B, Eggmont K, Penninckx I, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue B, Broekaert W (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15107-15111
- Thompson HJM, Knox JP (1998) Stage-specific responses of embryogenic carrot cell suspension cultures to arabinogalactan protein-binding β-glucosyl Yariv reagent. *Planta* 205(1): 32-38
- Touraev A, Ilham A, Vicente O, Heberle-Bors E (1996a) Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco : an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Rep* 15: 561-565
- Touraev A, Indrianto A, Wratschko I, Vicente O, Heberle-Bors E (1996b) Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sex Plant Reprod* 9: 209-215
- Touraev A, Pfosser M, Heberle-Bors E (2001) The microspore: a haploid multipurpose. *Adv Bot Res* 35: 53-109
- Tsuwamoto R, Fukuoka H, Takahata Y (2007) Identification and characterization of genes expressed in early embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. *Planta* 225: 641-652
- Van der Meer I, Stam M, Van Tunen A, Mol J, Stuitje A (1992) Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *Plant Cell* 4: 253-262
- Van Hengel A, Guzzo F, Van Kammen A, De Vries S (1998) Expression pattern of the carrot EP3 endochitinase genes in suspension cultures and in developing seeds. *Plant Physiol* 117: 43-5
- Van Hengel A, Tadesse Z, Immerzeel P, Schols H, Van Kammen A, de Vries SC (2001) N-Acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol* 125: 1880-1890
- Van Loon L, Rep M, Pieterse C (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44: 135-162
- Varnier AL, Mazeyrat-Gourbeyre F, Sangwan RS, Clément C (2005) Programmed cell death progressively models the development of anther sporophytic tissues from the tapetum and is triggered in the pollen grain during maturation. *J Struct Biol* 152: 118-228
- Varnova E, Inze D, van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* 53: 1227-1236
- Verslues P, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu J (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J* 45: 523-539
- Vrinten L, Nakamura T, Kasha K (1999) Characterization of cDNAs expressed in the early stages of microspore embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol Biol* 41(4): 455-463
- Wen PF, Chen JY, Kong WF, Pan QH, Wan SB, Huang WD (2005) Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Sci* 169(5): 928-934
- Woo EJ, Dunwell JM, Goodenough PW, Pickersgill RW (1998) Oxalate oxidase is a hexameric protein related to seed storage proteins: evidence from X-ray crystallography. *FEBS Lett* 437: 87-90
- Wojnarowicz G, Careda S, Devaux P, Sangwan RS, 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* 6: 747-755
- Wojnarowicz G, Jacquard C, Devaux P, Sangwan RS, Clement C. (2002) Influence of copper sulfate on anther culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci* 162: 843-847
- Worrall D, Hird D, Hodge R, Paul W, Draper J, Scott R (1992) Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell* 4: 759-771

- Wu JL, Sinha PK, Variar M, Zheng1 KL, Leach JE, Courtois B, Leung H (2004) Association between molecular markers and blast resistance in an advanced backcross population of rice. *Theor Appl Genet* 108(6): 1024-1032
- Yeh S, Moffatt BA, Griffith M, Xiong F, Yang DSC, Wiseman SB, Sarhan F, Danyluk J, Xue YQ, Hew CL, Doherty-Kirby A, Lajoie G (2000) Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. *Plant Physiol* 124: 1251-1264
- Zhang Z, Collinge DB, Thordal-Christensen H (1995) Germin-like oxalate oxidase, a H_2O_2 -producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant J* 8(1): 139-145
- Zhou F, Zhang Z, Gregersen PL, Mikkelsen JD, de Neergaard E, Collinge DB, Thordal-Christensen H (1998) Molecular characterization of the Oxalate Oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus. *Plant Physiol* 117: 33-41
- Zonia L, Tupy J (1995) Lithium-sensitive calcium activity in the germination of apple (*Malus × domestica* Borkh.), tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), and potato (*Solanum tuberosum* L.) pollen. *J Exp Bot* 46(8): 973-979

3. Conclusions

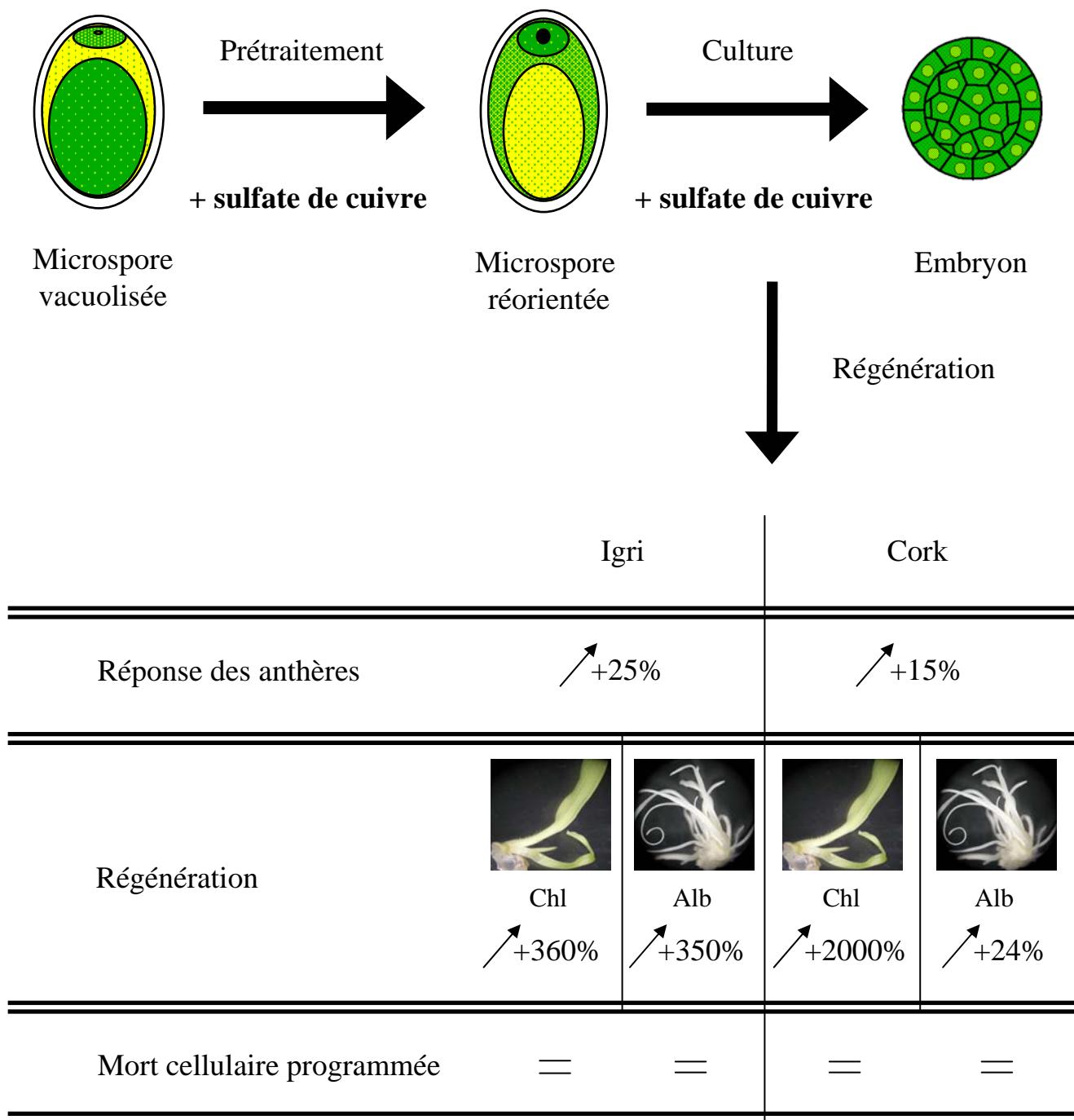


Figure 12 : Effets du sulfate de cuivre sur les paramètres de l'embryogenèse pollinique

\nearrow Amélioration du paramètre étudié — Pas de variation observée

Alb : plantules albinos - Chl : plantules chlorophylliennes

L'utilisation de l'embryogenèse pollinique chez les céréales, en particulier chez l'orge, est limitée par la régénération d'une proportion plus ou moins importante de plantules albinos selon les espèces et les cvs. Afin d'améliorer les rendements en plantules chlorophylliennes, nous avons abordé ce problème d'un point de vue fondamental et appliqué. Nous nous sommes fixés comme objectifs d'optimiser les rendements de la culture d'anthères et d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la réorientation de la microspore à l'intérieur de l'anthère.

3.1. Impact de différents paramètres sur la culture d'anthères

3.1.1. Effets du sulfate de cuivre

La phase de prétraitement permet la réorientation de la microspore grâce à l'application d'un stress, servant de facteur déclenchant (Touraev *et al.* 1996c ; Maraschin *et al.* 2005a ; Shariatpanahi *et al.* 2006a). Le prétraitement constitue donc l'étape clé de la technique. De précédents travaux au laboratoire ont montré qu'un stress osmotique couplé à un stress froid permet d'améliorer les rendements en plantules chlorophylliennes chez l'orge (Caredda *et al.* 1999).

Le cuivre est connu pour avoir un rôle important pendant le développement pollinique chez les céréales (Jewell *et al.* 1988 ; Azouaou et Souvré 1993). De plus il est impliqué dans la chaîne de synthèse de chlorophylle et dans la photosynthèse (Maksymiec 1997 ; Caspi *et al.* 1999). Plusieurs travaux suggérant un effet positif du sulfate de cuivre sur la culture *in vitro* de différents explants chez l'orge (Dahleen 1995 ; Cho *et al.* 1998 ; Nuutila *et al.* 2000b ; Wojnarowicz *et al.* 2002), nous nous sommes intéressés à l'effet du sulfate de cuivre dans les milieux utilisés en culture d'anthères chez l'orge (Figure 12).

L'utilisation du cv. d'hiver modèle Igri et de cinq cvs. de printemps régénérant majoritairement des plantules albinos nous a permis d'appréhender au mieux l'impact de l'addition de sulfate de cuivre dans les milieux. Le sulfate de cuivre permet d'améliorer la réponse des anthères, le nombre de plantules régénérées, ainsi que le pourcentage de plantules chlorophylliennes chez le cv. d'hiver Igri (Publication II). La concentration de 10 µM fournit les meilleurs résultats pour ce cv. Les essais menés sur les cvs. de printemps indiquent que la concentration optimale varie selon les cvs (Publication III). Une trop forte concentration de cuivre s'avère nocive puisque pour tous les cvs. étudiés, les concentrations supérieures ou

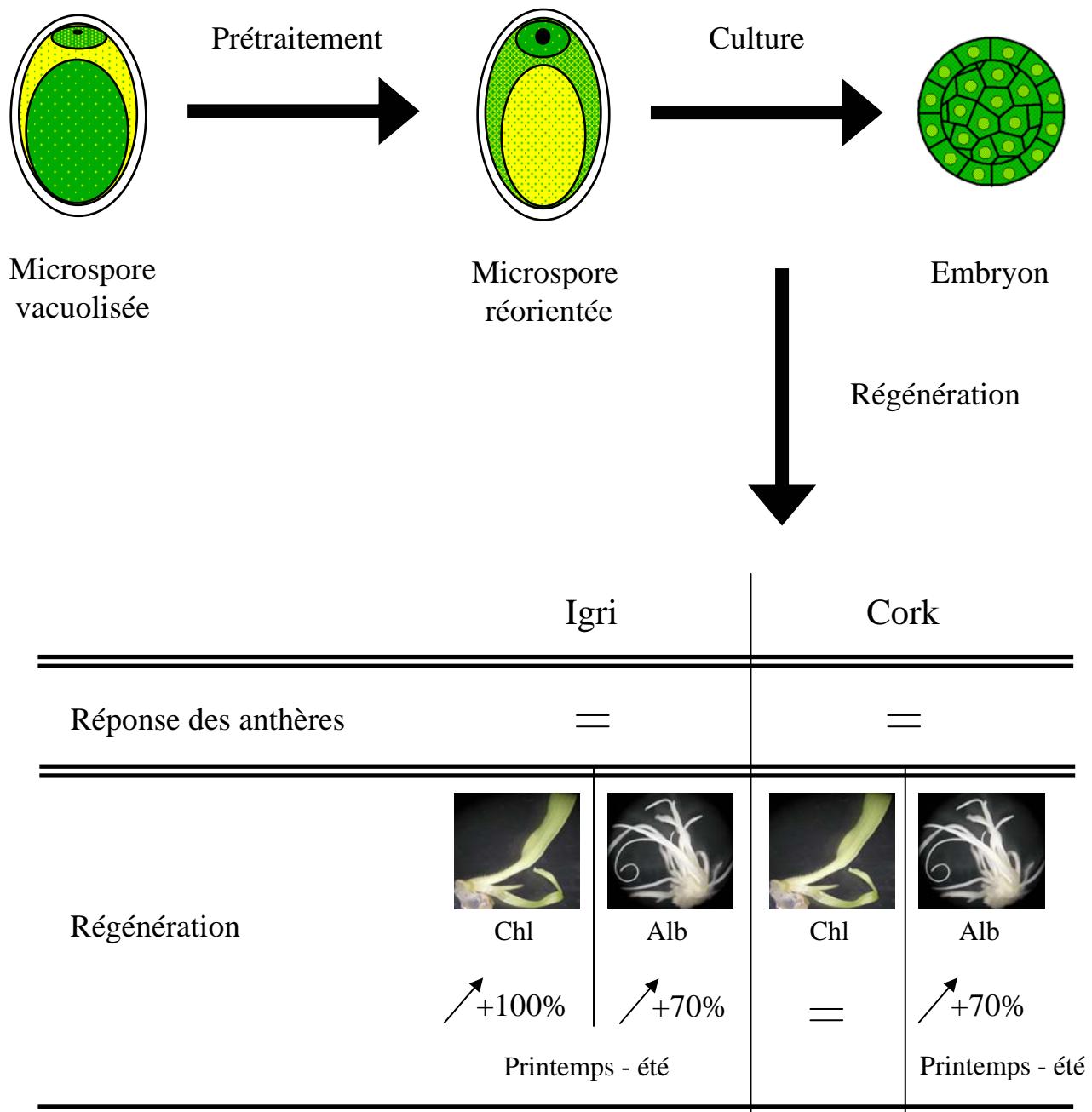


Figure 13 : Effets de la saison sur les paramètres de l'embryogenèse pollinique

\nearrow Amélioration du paramètre étudié

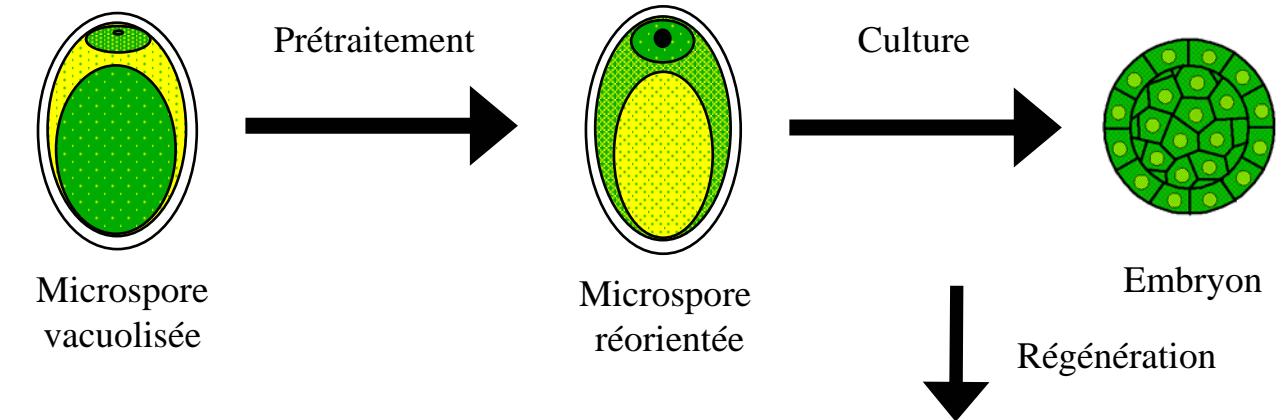
$=$ Pas de variation observée

Alb : plantules albinos - Chl : plantules chlorophylliennes

égales à 40 µM engendrent une très forte altération de tous les paramètres étudiés. Les concentrations de 10 µM et 20 µM ont donné les meilleurs résultats. L'ajout de sulfate de cuivre engendre une augmentation du nombre de plantules régénérées de près de 50% et surtout un pourcentage de plantules chlorophylliennes plus fort. Ce dernier paramètre peut être multiplié d'un facteur 20 selon les cvs. Les deux cvs. Douchka et Prisma produisent respectivement 4 et 12 % de plantules chlorophylliennes avec 20 µM de cuivre dans les milieux. De même les hybrides Primus/Anni et Dziugiai/Ansia, qui ne régénèrent que des plantules albinos avec un prétraitement mannitol, présentent un pourcentage respectif de plantules chlorophylliennes de 33 et 100% lorsque 10 µM de sulfate de cuivre sont ajoutés au milieu. Ces deux cvs. n'avaient pour le moment jamais régénéré de plantules chlorophylliennes. Le cuivre a donc permis de débloquer le système et de régénérer des plantules chlorophylliennes chez ces cvs. L'exploitation génétique de la biodiversité de ces cvs. devient possible pour les sélectionneurs.

De précédents travaux avaient montré une altération des chloroplastes lors du développement pollinique plus précoce chez le cv. Cork que chez le cv. Igri (Caredda *et al.* 2000). Les auteurs avaient émis l'hypothèse que cette dégradation pourrait être à l'origine de la régénération de plantules albinos. Afin de caractériser le processus impliqué dans cette dégradation chloroplastique, nous avons suivi la MCP lors du développement pollinique ainsi que suite au prétraitement. Le cv. Igri présente une MCP plus précoce que le cv. Cork. En effet, le cv. Igri présente une altération du tapis dès le stade jeune microspore alors que le cv. Cork ne présente ces symptômes qu'à partir du stade microspore vaccuolisée. Le processus responsable de la dégradation chloroplastique semble être indépendant du phénomène de MCP observé lors du développement pollinique dans les cellules staminale. Après le prétraitement, avec ou sans ajout de cuivre, nous pouvons détecter de la MCP dans les deux cvs. Le prétraitement ne stoppe donc pas la MCP et l'effet bénéfique du sulfate de cuivre ne semble pas lié à une action sur la MCP.

Nos expériences montrent donc que l'ajout de sulfate de cuivre dans les milieux de prétraitement et de culture améliorent de façon significative l'ensemble des paramètres étudiés en embryogenèse pollinique chez l'orge. L'albinisme est encore majoritaire chez certains cvs mais l'apport de cuivre permet la régénération de plantules chlorophylliennes même chez les cvs. récalcitrants.



	T1	T3	Brin maître	T2
Réponse des anthères	-10%	-45%	∅	-20%
Régénération	 Chl  Alb	 -20%  -40%		 -25% I gri  +1600% Cork
		-35%	∅	-65%

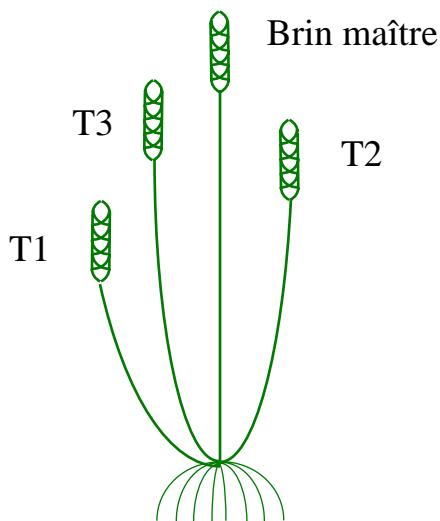


Figure 14 : Effets de la position de l'épi sur le plateau de tallage

↗ amélioration du paramètre étudié - ↘ diminution du paramètre étudié - ∅ valeur de référence
 == : pas de variation observée - T1 : première talle - T2 : deuxième talle - T3 : troisième talle

3.1.2. Effets de la saison

Jähne *et al.* (1991) et Ritala *et al.* (2001) avaient constaté que les conditions climatiques et environnementales peuvent influer sur la réussite de l'embryogenèse pollinique chez l'orge. La culture de nos plantes et des anthères *in vitro* sont réalisées en conditions (température, hygrométrie, photopériode) standardisées. Cependant nous avons voulu tester si la saison à laquelle les plantes étaient cultivées pouvait avoir un effet sur les paramètres de l'embryogenèse pollinique (Figure 13).

Le pourcentage de réponse des anthères ne varie pas de manière significative en fonction de la saison à laquelle la technique est appliquée (Publication IV). Ce paramètre est proche de 60% pour le cv. Igri et 55% pour le cv. Cork. Par contre la régénération semble être dépendante de la saison. En effet l'utilisation d'épis prélevés sur des plantes cultivées d'Avril à Août permet la régénération de deux fois plus de plantules que pendant les autres mois de l'année. Le pourcentage de plantules chlorophylliennes régénérées ne présente pas de variation significative en fonction de la saison chez le cv. Cork, mais le cv. d'hiver Igri présente une plus forte proportion de plantules chlorophylliennes de Mai à Septembre.

Nos résultats prouvent que, malgré l'attention portée aux différents paramètres de culture, la saison à laquelle les plantes mères sont élevées influe sur les résultats obtenus en embryogenèse pollinique. La saison à laquelle les plantes sont cultivées doit donc être prise en compte afin d'évaluer au mieux la réussite et le rendement de la technique.

3.1.3. Effets de la position de l'épi sur le plateau de tallage

Les céréales ont la caractéristique de présenter un plateau de tallage (Moule 1971). Ce plateau représente la zone, sous la surface du sol, de laquelle partent toutes les ramifications. Cette caractéristique des Poacées influençant les rendements agronomiques (Moule 1971), nous avons étudié les résultats obtenus en embryogenèse pollinique en fonction de la position de l'épi sur le plateau de tallage (Figure 14).

La réponse des anthères est affectée par la position de l'épi sur le plateau de tallage (Publication IV). En effet, la réponse la plus importante est obtenue avec les épis prélevés sur les brins maîtres avec près de 80% pour le cv. Igri et 60% pour Cork. Par ailleurs, plus les épis se trouvent sur une talle éloignée du brin maître et plus la réponse diminue. Avec les épis de la quatrième talle, à peine plus de 30% des anthères produisent des embryons.

La régénération des plantules est également dépendante de la position de l'épi sur le plateau de tallage. Les anthères issues des épis prélevés sur les brins maîtres forment un nombre maximal de plantules chez les deux cvs. Ce nombre de plantules décroît ensuite progressivement avec l'éloignement de la talle et se retrouve diminué de moitié lorsque les anthères sont issues des épis des quatrièmes talles.

Pour conclure cette étude, nous avons examiné l'impact du plateau de tallage sur le pourcentage de plantules chlorophylliennes régénérées. Les épis issus des brins maîtres ainsi que des premières, troisièmes et quatrièmes talles ne présentent pas de variation significative de ce paramètre. En effet, les anthères récoltées sur les épis provenant de ces talles régénèrent en moyenne 2% de plantules chlorophylliennes chez le cv. Cork et 80% chez le cv. Igri. Les épis prélevés sur la deuxième talle engendrent des pourcentages de plantules chlorophylliennes régénérées bien plus importants. Ainsi, les anthères issues de la deuxième talle permettent la régénération de 35% de plantules chlorophylliennes chez le cv. Cork et 90% chez le cv. Igri. Les hormones sont réparties selon un gradient de concentration dans le système racinaire (Casimiro *et al.* 2003). Nous pouvons donc supposer que la deuxième talle présente une balance hormonale optimale qui permet une régénération de plantules chlorophylliennes plus importantes. Le dosage des différentes hormones, par spectroscopie de masse par exemple (Edlund *et al.* 1995), au niveau de chaque talle permettrait peut-être de confirmer cette hypothèse.

La position de l'épi sur le plateau de tallage influence donc les résultats obtenus en embryogenèse pollinique. L'utilisation des épis issus du brin maître est préférable pour l'obtention d'un maximum de plantules. Mais pour obtenir un pourcentage optimal de plantules chlorophylliennes c'est la deuxième talle qui doit être privilégiée.

Nos travaux prouvent que les rendements en embryogenèse pollinique, notamment au niveau de la régénération de plantules chlorophylliennes, peuvent encore être améliorés. L'utilisation du sulfate de cuivre, une attention particulière portée à l'origine de l'épi, ainsi qu'une culture aux périodes propices sont autant de facteurs qui peuvent contribuer à l'optimisation de la technique.

3.2. Suivi de divers marqueurs de défense

Face aux divers stess auxquels la plante est confrontée, elle met en place des stratégies d'adaptation et de défense (Netting 2002). Comme nous l'avons déjà signalé précédemment, la

réussite de l'embryogenèse pollinique dépend de la qualité du stress appliqué. Pour la culture de microspores isolées (Li et Devaux 2003) comme pour la culture d'anthères (Jacquard *et al.* 2003), le prétraitement s'applique toujours aux anthères complètes. Nous avons donc voulu comprendre les mécanismes biologiques qui sous-tendent la réorientation de la microspore suite à un stress de l'anthère complète. Pour ce faire, nous avons vérifié si l'application du stress lors de la phase de prétraitement induisait une réponse au niveau de l'anthère.

3.2.1. Burst oxydatif

Nous avons suivi la production d' $O_2^{\bullet-}$ durant la phase de prétraitement (Publication V). Au moment du prélèvement de l'anthère, nous avons constaté une production accrue au niveau du filet et plus précisément à l'endroit de la blessure causée par le prélèvement. Cette production confirme qu'un stress tel que la blessure engendre une synthèse d' $O_2^{\bullet-}$ au niveau de l'anthère. Après 48 et 96 heures de prétraitement, nous avons constaté la présence d' $O_2^{\bullet-}$ dans les différents tissus de l'anthère. Le burst oxydatif nous permet donc de confirmer que les anthères perçoivent bien le prétraitement comme un stress et y répondent en mettant en place une synthèse d'EAO.

3.2.2. Gènes de réponse aux stress

Afin de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans la réorientation de la microspore, nous avons étudié l'expression de plusieurs gènes pendant la phase de prétraitement ainsi que durant le développement pollinique (Publication V). Les différents gènes codant des protéines PR présentent une induction de leur expression durant le prétraitement 10 à 5000 fois supérieure à celle observée *in vivo*. Les gènes codant des protéines de détoxification sont fortement induits (facteur 10 à 1000) pendant le prétraitement. A ce niveau nous n'avons pas constaté de différences significatives entre les deux cvs étudiés.

L'ajout de cuivre dans le milieu de prétraitement semble agir comme un "tampon" au niveau des anthères, notamment chez le cv. Cork. Ces dernières présentent en effet des inductions de gènes plus progressives et moins fortes d'un facteur 5 en moyenne que celles prétraitées sans cuivre. Carreda *et al.* (1999) ont montré qu'un choc osmotique affectait moins la structure plastidiale qu'un choc au froid. Le stress osmotique pourrait générer des mécanismes de défense différents de ceux induits par une exposition longue au froid. L'ajout de cuivre pourrait limiter l'effet du choc osmotique et mener à un effet moins brutal du

prétraitement au niveau des anthères. Le stress est donc nécessaire à la réorientation de la microspore, mais la réussite de la technique, chez l'orge, réside peut-être dans la capacité de l'anthere à limiter l'impact de ce stress au niveau de ses microspores.

Les travaux que nous avons menés ont permis de mettre en évidence l'activation de mécanismes de défense dans les anthères pendant la phase de prétraitement chez les deux cvs testés. Nous pouvons supposer que les différentes voies de réponse aux stress sont activées puisque nous avons suivi des gènes impliqués dans la synthèse de protéines PR, dans la voie des phenylpropanoïdes, ainsi que dans la voie de l'AJ et dans la réponse au burst oxydatif. Dans tous les cas, nous avons pu constater une induction de l'expression de ces gènes. Cependant nous ne savons pas si les gènes sont exprimés dans la microspore ou bien au niveau des tissus de l'anthere qui transmettent ensuite l'information à la microspore. Dans tous les cas, la perception du stress par les anthères engendre une cascade de mécanismes de défense qui pourraient être en partie responsables de la régénération de plantules albinos.

4. Perspectives

L'embryogenèse pollinique chez les cvs. de printemps d'orge est améliorée mais n'est pas encore totalement maîtrisée. L'utilisation de sulfate de cuivre ayant donné de très bons résultats sur les différents cvs récalcitrants testés, il semble judicieux d'étendre son utilisation aux autres cvs, voire aux autres céréales récalcitrantes.

Les résultats obtenus montrant un effet selon la saison, il semble intéressant d'utiliser l'embryogenèse pollinique durant les mois les plus favorables de l'année.

La position de l'épi sur le plateau de tallage influe sur les résultats obtenus. Si cet effet est confirmé chez les autres céréales, l'utilisation des épis provenant des talles les plus prolifiques permettrait l'optimisation des rendements en plantules chlorophylliennes et donc l'utilisation plus aisée de la technique pour les cvs. produisant exclusivement des plantules albinos.

La sélection de l'épi, le choix de la saison et l'apport de sulfate de cuivre permettent d'améliorer les rendements de l'embryogenèse pollinique chez l'orge. L'utilisation combinée de ces trois paramètres permettrait peut-être de cumuler leurs effets bénéfiques sur les rendements en plantules chlorophylliennes.

L'étude de l'expression de différents gènes de réponse aux stress nous a permis d'identifier des marqueurs de réponse au prétraitement chez l'orge. Les récentes études menées par d'autres équipes chez *Brassica napus* L. (Joosen *et al.* 2007 ; Malik *et al.* 2007 ; Tsuwamoto *et al.* 2007), l'orge (Maraschin *et al.* 2006 ; Muñoz-Amatriaín *et al.* 2006) et le tabac (Hosp *et al.* 2006 ; Hosp *et al.* 2007) ont montré l'activation de divers gènes marqueurs de l'embryogenèse pollinique. Ces études ne rapportent cependant aucun résultat sur les gènes codant les protéines PR et très peu sur les gènes de défense en général. La reprogrammation de la microspore ne pouvant s'effectuer que par l'application d'un stress, il est probable que les mécanismes de défense soient activés pendant la phase de prétraitement. La poursuite et l'approfondissement de notre étude sur l'expression des gènes de réponse aux stress semblent donc nécessaires pour une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la réorientation de la microspore, et donc pour comprendre le lien entre le stress appliqué et la réorientation de la microspore.

Nos résultats actuels portent sur l'anthère entière, nous ne savons donc pas si les gènes sont induits dans les tissus sporophytiques de l'anthère, dans les microspermes ou les deux. Des études d'hybridation *in situ* (Jones *et al.* 1990) nous permettraient de localiser les lieux de synthèse des ARNm et par conséquent de répondre à cette question. La culture de microspermes isolées permet la régénération d'un plus grand pourcentage de plantules chlorophylliennes que la culture d'anthères (Cistué *et al.* 1995 ; Luckett et Smithard 1995 ; Li et Devaux 2003). La

localisation *in situ* de l'expression des divers gènes permettrait peut-être d'élucider la cause de ces différences de régénération.

Le burst oxydatif étant un évènement précoce de la réponse aux stress il est nécessaire de le caractériser afin de mieux cibler les gènes à étudier par la suite. Des tests de suivi de synthèse d' H_2O_2 , d'oxyde nitrique ou encore de radicaux libres pourraient être envisagés afin de mieux caractériser le burst oxydatif.

Nos résultats ont montré l'activation des mécanismes de défense lors de la phase de prétraitement. Il serait intéressant d'utiliser des mutants des diverses voies de signalisation afin d'affiner ces résultats. Chez l'orge il n'y a pas encore de mutants identifiés pour toutes les voies métaboliques impliquées dans la signalisation et la réponse aux stress. Ces mutants sont identifiés chez *Arabidopsis*. Il semble donc nécessaire de développer un protocole de culture d'anthères chez cette espèce, afin de pouvoir étudier les mécanismes moléculaires impliqués lors de la phase de prétraitement et donc dans la réorientation de la microspore. L'utilisation des divers mutants permettra d'identifier les voies impliquées dans la réponse au stress et nécessaires à la réorientation de la microspore.

Nous avons démontré que le cuivre ajouté dans les milieux de prétraitement et de culture conduisait à l'amélioration du pourcentage de plantules chlorophylliennes régénérées. Le cuivre est impliqué dans la synthèse de chlorophylle et dans la photosynthèse (Maksymiec 1997 ; Caspi *et al.* 1999). L'étude des différents gènes codant les protéines impliquées dans la synthèse de chlorophylle nous permettrait peut-être d'observer des différences d'expression entre les échantillons cultivés sur les milieux enrichis ou non en cuivre. La régénération de plantules chlorophylliennes est peut-être dûe à une activation de certains de ces gènes par l'ajout de cuivre.

La chaîne de synthèse de chlorophylle est un processus comprenant de nombreuses étapes. La chlorophylle est synthétisée à partir de la forme activée du glutamate (GLU-tRNA^{GLU}). Ce substrat est réduit en acide 1-semialdéhyde-glutamique (GSA) puis en acide δ-aminolévulinique (ALA). Dix étapes supplémentaires sont ensuite nécessaires pour former de la chlorophylle a et onze pour former la chlorophylle b. Si une des enzymes impliquées dans ce long processus manque, la formation de chlorophylle est impossible. Des travaux préliminaires que nous avons menés montrent que l'incubation de plantules albinos dans de l'acide δ-aminolévulinique permet la formation de protochlorophyllide (Jacquard *et al.* non publiés). La protochlorophyllide est l'avant-dernier précurseur de la chlorophylle. Ces premiers résultats suggèrent donc l'existence d'au moins deux points de blocage dans la chaîne de synthèse de chlorophylle, responsables de la régénération de plantules albinos.

L'approfondissement de ces travaux est nécessaire pour identifier le nombre de points de blocage et leur raison. En effet, nous ne savons pas si le blocage est dû à l'absence des enzymes responsables de la formation des différents précurseurs, ou bien à l'absence de co-facteurs de ces enzymes. Des analyses HPLC permettraient d'identifier et de quantifier les différents pigments présents dans nos plantules albinos. Ces analyses permettraient peut-être aussi d'élucider l'effet du cuivre sur la régénération de plantules chlorophylliennes.

L'utilisation de puces à ADN Affymetrix® (Muñoz-Amatriaín *et al.* 2006) permettrait d'obtenir des informations sur l'expression des gènes dans les anthères ou les microspores isolées pendant le prétraitement avec et sans sulfate de cuivre. L'analyse de ces résultats permettrait peut-être d'identifier des différences d'expression de gènes à l'origine de la réorientation de la microspore d'une part, et responsables de la régénération de plantules albinos d'autre part. La comparaison entre les échantillons traités avec et sans cuivre permettrait de comprendre l'effet du cuivre et d'identifier les mécanismes moléculaires affectés par l'ajout de cuivre.

5. Bibliographie

- Abdullah AA., Pedersen S. et Andersen SB.** (1994) Triploid and hexaploid regenerants from hexaploid Timothy (*Phleum pratense* L.) via anther culture. *Plant Breeding* 112 : 342-345
- Abeledo LG., Calderini DF. et Slafer GA.** (2004) Leaf appearance, tillering and their coordination in old and modern barleys from Argentina. *Field Crops Research* 86 : 23-32
- Afifhile M., Fukushige H., McCracken C. et Hildebrand D.** (2005) Allene oxide synthase and hydroperoxide lyase product accumulation in *Artemisia* species. *Plant Science* 169(1) : 139-146
- Agrawal G., Rakwal R., Jwa N., Han K. et Agrawal V.** (2002) Molecular cloning and mRNA expression analysis of the first rice jasmonate biosynthetic pathway gene allene oxide synthase. *Plant Physiology and Biochemistry* 40(9) : 771-782
- Amssa M., De Buyser J. et Henry Y.** (1980) Origine des plantes diploïdes obtenues par culture in vitro d'anthers de blé tendre (*Triticum aestivum* L.). *Compte-Rendus de l'Académie des Sciences* 290 : 1095-1097
- Apel K. et Hirt H.** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55 : 373-399
- Araus J., Slafer G., Reynolds M. et Royo C.** (2002) Plant breeding and drought in C-3 cereals: what should we breed for ? *Annals of Botany* 89 : 925-940
- Asada K.** (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50 : 601-639
- Atienza S., Faccioli P., Perrotta G., Dalfino G., Zschiesche W., Humbek K., Stanca A.M. et Cattivelli L.** (2004) Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions. *Plant Science* 167 : 1359-1365
- Audran C., Borel C., Frey A., Sotta B., Meyer C., Simonneau T. et Marion-Poll A.** (1998) Expression studies of the zeaxanthin epoxidase gene in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiology* 118 : 1021-8
- Audran C., Liotenberg S., Gonneau M., North H., Frey A., Tap-Waksman K., Vartanian N. et Marion-Poll A.** (2001) Localisation and expression of zeaxanthin epoxidase mRNA in *Arabidopsis* in response to stress and during seed development. *Australian Journal of Plant Physiology* 28 : 1161-1173
- Azouaou Z. et Souvré A.** (1993) Effects of copper deficiency on pollen fertility and nucleic acids in the durum wheat anther. *Sexual Plant Reproduction* 6 : 199-204
- Baker N.** (1991) A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 81 : 563-570

- Bang-Olson K., Stilling B. et Munck L.** (1987) Breeding for yield in high-lysine barley. Barley Genetics V. In : KT. Yasuda S (éds). Proceedings of the Fifth International Barley Genetics Symposium. Okayama, Japan, Sanyo Press : 865–870
- Barinova I., Clément C., Martiny L., Baillieul F., Soukupova H., Heberle-Bors E. et Touraev A.** (2004) Regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snapdragon by medium pH. *Planta* 219(1) : 141-146
- Barnabas B.** (2003) Protocol for producing doubled haploid plants from anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). In : M. Maluszynski, KJ. Kasha, BP. Forster and I. Szarejko (éds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers : 65-70
- Baudino S., Hansen H., Brettschneider R., Hecht V., Dresselhaus T., Lötz H., Dumas C. et Rogowsky P.** (2001) Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta* 213 : 1-10
- Becart C., Herbin A., Lefevre M., Molard P., Przybylski L., Rigaudiere P., Sagot N. et Wavelet S.** (2000) La filière alimentation animale. Lille
- Bedinger P.** (1992) The Remarkable Biology of Pollen. *The Plant Cell* 4(8) : 879-887
- Binarova P., Hause G., Cenklova V., Cordewener J.H.G. et van Lookeren Campagne M.M.** (1997) A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus*. *Sexual Plant Reproduction* 10(4) : 200-208
- Bishnoi U., Jain R.K., Rohilla J.S., Chowdhury V.K., Gupta K.R. et Chowdhury J.B.** (2000) Anther culture of recalcitrant indica X Basmati rice hybrids. *Euphytica* 114 : 93-101
- Blakeslee A., Belling J., Farnham M. et D. B.** (1922) A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. *Science* 55 : 646-647
- Bleecker A. et Kende H.** (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16 : 1-18
- Bol J., Linthorst H. et Cornelissen B.** (1990) Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annual Review of Phytopathology* 28 : 113-138
- Bolwell G., Bindschedler L., Blee K., Butt V., Davies D., Gardner S., Gerrish C. et Minibayeva F.** (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany* 53 : 1367-1376
- Borderies G., Le Béchec M., Rossignol M., Lafitte C., Le Deunff E., Beckert M., Dumas C. et Matthys-Rochon E.** (2004) Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. *European Journal of Cell Biology* 83(5) : 205-212
- Botella J. et Artega R.** (1994) Differential expression of two calmodulin genes in response to physical and chemical stimuli. *Plant Molecular Biology* 24 : 757-766

- Boutilier K., Fiers M., Liu C. et Van der Geest A.** (2005) Biochemical and molecular aspects of haploid embryogenesis. In : C. Palmer, W. Keller and K. Kasha (éds). Haploids in crop improvement II. Berlin, Springer-Verlag : 73-95
- Boutilier K., Ginés M., DeMoor J., Huang B., Basczynski C., Iyer V. et Miki B.** (1994) Expression of the BnmNAP subfamily of napin genes coincides with the induction of Brassica microspore embryogenesis. *Plant Molecular Biology* 26(6) : 1711-1723
- Boutilier K., Offringa R., Sharma V., Kieft H., Ouellet T., Zhang L., Hattori J., Liu C., Van Lammeren A., Miki B., Custers J. et van Lookeren Campagne M.** (2002) Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell* 14 : 1737-1749
- Braam J. et Davies R.** (1990) Rain-, Wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell* 60 : 357-364
- Brar D. et Khush G.** (1994) Cell and tissue culture for plant improvement. In : AS. Basra (éds). Mechanisms of plant growth and improvement productivity. Modern Approaches. New York, Basel, Hong-Kong, M. Dekker Inc. : 229-278
- Bravo L., Gallardo J., Navarrete A., Olave N., Martinez J., Alberdi M., Close T. et Corcuera L.** (2003) Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. *Physiologia Plantarum* 118 : 262-269
- Bravo L., Zuniga G., Alberdi M. et Corcuera L.** (1998) The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimatation in barley. *Physiologia Plantarum* 103 : 17-23
- Brederode F., Linthorst H. et Bol J.** (1991) Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant Molecular Biology* 117 : 1117-1125
- Briggs** (1978) Barley. London, Chapman and Hall
- Brisson L., Tenhaken R. et Lamb C.** (1994) Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *The Plant Cell* 6 : 1703-1712
- Bryngelsson T., Sommer-Knudsen J., Gregersen P., Collinge D., Ek B. et Thordal-Christensen H.** (1994) Purification, characterization, and molecular cloning of basic PR-1-type pathogenesis-related proteins from barley. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7(2) : 267-275
- Bücking H., Forster H., Stenzel I., Miersch O. et Hause B.** (2004) Applied jasmonates accumulate extracellularly in tomato, but intracellularly in barley. *FEBS Letter* 562(1-3) : 45-50
- Büter B.** (1997) In vitro haploid production of higher plants in maize. In: S. Mohan Jain, S. Sopory and R. Veilleux (éds). *In vitro* haploid production in higher plants 4. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers : 37-71

- Cai Q., Szarejko I., Polok K. et Maluszynski M.** (1992) The effect of sugars and growth regulators on embryoid formation and plant regeneration from barley anther culture. *Plant Breeding* 109 : 218-226
- Caredda S. et Clément C.** (1999) Androgenesis and albinism in Poaceae: influence of genotype and carbohydrates. In : C. Clément, E. Pacini and JC. Audran (éds). *Anther and pollen: from biology to biotechnology*. Berlin, Springer-Verlag : 211-228
- Caredda S., Devaux P., Sangwan R.S. et Clément C.** (1999) Differential development of plastids during microspore embryogenesis in barley. *Protoplasma* 208 : 248-256
- Caredda S., Devaux P., Sangwan R., Proult I. et Clément C.** (2004) Plastid ultrastructure and DNA related to albinism in androgenetic embryos of various barley (*Hordeum vulgare*) cultivars. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 76: 35-43
- Caredda S., Doncoeur C., Devaux P., Sangwan R.S. et Clément C.** (2000) Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Sexual Plant Reproduction* 43 : 1-10
- Carlson A., Letarte J., Chen J. et Kasha K.** (2001) Visual screening of microspore-derived transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) with green-fluorescent protein. *Plant Cell Reports* 20(4) : 331-337
- Casimiro I., Beeckman T., Graham N., Bhalerao R., Zhang H., Casero P., Sandberg G. et Bennett MJ.** (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science* 8 : 165-171
- Caspi V., Droppa M., Horvath G., Malkin S., Marder J. et Raskin V.** (1999) The effect of copper on chlorophyll organisation during greening of barley leaves. *Photosynthesis Research* 62 : 165-174
- Castillo A. et Cistué L.** (1993) Production of gynogenic haploids of *Hordeum vulgare* L. *Plant Cell Reports* 12 : 139-143
- Castillo A., Valles M. et Cistué L.** (2000) Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effect of culture density and regeneration medium. *Euphytica* 113 : 1-8.
- Chase S.** (1963) Analytic breeding of *Solanum tuberosum* L. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 5 : 359-363
- Chen W., Provart N.J., Glazebrook J., Katagiri F., Chang H.-S., Eulgem T., Mauch F., Luan S., Zou G., Whitham S.A., Budworth P.R., Tao Y., Xie Z., Chen X., Lam S., Kreps J.A., Harper J.F., Si-Ammour A., Mauch-Mani B., Heinlein M., Kobayashi K., Hohn T., Dangl J.L., Wang X. et Zhu T.** (2002) Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *The Plant Cell* 14(3) : 559-574
- Chen Y. et Dribnenki P.** (2002) Effect of genotype and medium composition on flax *Linum usitatissimum* L. anther culture. *Plant Cell Reports* 21 : 204-207.

- Chen Y., Kenaschuk E. et Procnier J.** (1998) Plant regeneration from anther culture in Canadian cultivars of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Euphytica* 102(2) : 183-189
- Chen Z., Iyer S., Caplan A., Klessig D. et Fan B.** (1997) Differential accumulation of salicylic acid and salicylic acid-sensitive catalase in different rice tissues. *Plant Physiology* 114(1) : 193-201
- Cheng W., Endo A., Zhou L., Penney J. et Chen H.** (2002) A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *The Plant Cell* 14 : 2723-2743
- Cheong Y., Chang H.-S., Gupta R., Wang X., Zhu T. et Luan S.** (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129 : 661-677
- Chinnusamy V., Schumaker K. et Zhu J.-K.** (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* 55(395) : 225-236
- Chinnusamy V., Zhu J. et Zhu J.-K.** (2006) Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum* 126(1) : 52-61
- Cho M., Jiang W. et Lemaux P.** (1998) Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. *Plant Science* 138 : 229-244
- Cho M. et Zapata F.** (1988) Callus formation and plant regeneration in isolated pollen culture of rice (*Oryza sativa* L. Taipei 309). *Plant Science* 58 : 239-244
- Chu C., Hill R. et Brule-Babel A.** (1990) High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide containing media. *Plant Science* 66 : 255-262
- Cistué L., Ramos A. et Castillo A.** (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(3) : 159-166
- Cistué L., Ramos A., Castillo A.M. et Romagosa I.** (1994) Production of large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol. *Plant Cell Reports* 13(12) : 709-712
- Cistué L., Soriano M., Castillo A., Valles M., Sanz J. et Echavarri B.** (2006) Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports* 25 : 257-264.
- Cistué L., Ziauddin A., Simion E. et Kasha K.** (1995) Effects of culture conditions on isolated microspore response of barley cultivar Igri. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42(2) : 163-169

- Clapham D.** (1973) Haploid Hordeum plants from anthers in vitro. Zeitschrift Pflanzenzüchtg 69 : 142–155
- Clayton H., Knight M., Knight H., McAinsh M. et Hetherington A.** (1999) Dissection of the ozone-induced calcium signature. Plant Journal 17 : 575-579
- Close T.** (1997) Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydratation and low temperature. Physiologia Plantarum 100 : 291-296
- Conconi A., Miquel M., Browne JA. et Ryan C.** (1996) Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. Plant Physiology 111(3) : 797-803
- Conrath U., Silva H. et Klessig D.** (1997) Protein dephosphorylation mediates salicylic acid-induced expression of PR-1 genes in tobacco. Plant Journal 11 : 747-757
- Coquoz J., Buchala A., Meuwly P. et Métraux J.** (1995) Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. Phytopathology 85(10) : 1219-1224
- Cordewener J., Hause G., Görzen E., Busink R., Hause B., Dons H., Van Lammeren A., van Lookeren Campagne M. et Pechan P.** (1997) Changes in synthesis and localization of members of the 70-kDa class of heat-shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L. microspores. Planta 196 : 747-755
- Creelman R. et Mullet J.** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48 : 355-381
- Creelman R., Tierney M. et Mullet J.** (1992) Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 89 : 4938-4941
- Cushman J. et Bohnert H.** (2000) Genome approaches to plant stress tolerance. Current Opinion in Plant Biology 3 : 117-124
- Custers J., Cordewener J., Nollen Y., Dons H. et Lookeren Campagne M.** (1994) Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. Plant Cell Reports 13(5) : 267-271
- Dahleen L.** (1995) Improved plant regeneration from barley callus cultures by increased copper levels. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 43 : 267-269
- Dalton T., Shertzer H. et Puga A.** (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen. Annual Review of Pharmacology and toxicology 39 : 67-101
- Dangl J. et Jones J.** (2001) Plant pathogens and integrated defense responses to infection. Nature 411 : 826-833
- Daniel G.** (1993) Anther culture in rye: improved plant regeneration using modified MS-media. Plant Breeding 110 : 259-261

- Dat J., Vandenabeele S., Vranova E., Van Montague M., Inze D. et Van Breusegem F.** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57 : 779-795
- Davies P.** (2003) Barley isolated microspore culture (IMC) method. In: M. Maluszynski, Kasha K.J., Forster B.P. and Szarejko I. (éds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers : 43-47
- Davies P. et Morton S.** (1998) A comparison of barley isolated microspore and anther culture and the influence of cell culture density. *Plant Cell Reports* 17 : 206-210
- Deikman J.** (1997) Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiologia Plantarum* 100 : 561-566
- Dekov I., Tsonev T. et Yordanov I.** (2000) Effects of water stress and high-temperature stress on the structure and activity of photosynthetic apparatus of *Zea mays* and *Helianthus annuus*. *Photosynthetica* 38(3) : 361-366
- Dempsey D., Shah J. et Klessig D.** (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. Critical Review in Plant Science 18 : 547-575
- Derckel J., Audran J., Haye B., Lambert B. et Legendre L.** (1998) Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and β-1,3-glucanases of ripening grape berries. *Physiologia Plantarum* 104 : 56-64
- Desikan R., MacKerness S., Hancock J. et Neill S.** (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology* 127 : 159-172
- Devaux P.** (2003) The *Hordeum bulbosum* (L.) method. In: M. Maluszynski, Kasha K., Forster B. and Szarejko I. (éds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers : 15-20
- Devaux P., Hou L., Ullrich S., Huang Z. et Kleinhofs A.** (1993) Factors affecting anther culturability of recalcitrant barley genotypes. *Plant Cell Reports* 13(1) : 32-36
- Devaux P. et Pickering R.A.** (2005) Haploids in the improvement of Poaceae. In: C. Palmer, Keller W. and Kasha K. (éds). Biotechnology in agriculture and forestry, vol 56. Haploids in crop improvement II. Berlin, Heidelberg, New York, Springer
- Devaux P. et Zivy M.** (1994) Protein markers for anther culturability in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 88 (6-7) : 701-706
- Devaux P., Zivy M., Kilian A. et Kleinhofs A.** (1996) Doubled haploids in barley. In : A. Slinkard, G. Scoles and B. Rossnagel (éds). Proceedings of V International Oat Conference and VII International Barley Genetics Symposium. Saskatoon, University Extension Press, University of Saskatchewan, 1 : 213-222

- Dias J.** (2003) Protocol for broccoli microspore culture. In : M. Maluszynski, KJ. Kasha, BP. Forster and I. Szarejko (éds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers : 195-204
- Doares S., Narvaez-Vasquez J., Conconi A. et Ryan C.** (1995) Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiology* 108 : 1741-1746
- Doherty H., Selvendran R. et Bowles D.** (1988) The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxybenzoic acids. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 33 : 377-384
- Doke N., Miura Y., Sanchez L., Park H., Noritake T., Yoshioka H. et Kawakita K.** (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack : mechanism and role as an emergency signal for plant biodefense - a review. *Gene* 179 : 45-51
- Dong X.** (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1(4) : 316-323
- Durner J., Shah J. et Klessig D.** (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* 2(7) : 266-274
- Durrant W., Rowland O., Piedras P., Hammond-Kosack K. et Jones J.** (2000) cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *The Plant Cell* 12 : 963-977
- Ecker J.** (1995) The ethylene signal-transduction pathway in plants. *Science* 268 : 667-675
- Edlund A., Eklof S., Sundberg B., Moritz T., et Sandberg G.** 1995. A microscale technique for gas-chromatography mass-spectrometry measurements of picogram amounts of Indole-3-Acetic-Acid in plant tissues. *Plant Physiol.* 108: 1043–1047
- Eltsner E. et Osswald W.** (1994) Mechanisms of oxygen activation during plant stress. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh B* 102 : 131-154
- Enyedi A., Yalpani N., Silverman P. et I. R.** (1992) Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell* 70 : 879-886
- FAOSTAT** (2006). <http://faostat.fao.org>.
- Farmer E., Johnson R. et Ryan C.** (1992) Regulation and expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiology* 98 : 995-1002
- Farmer E. et Ryan C.** (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of woundinducible proteinase inhibitors. *The Plant Cell* 4 : 129-134
- Ferrie A.M.R., Palmer C.E. et Keller W.A.** (1995) Haploid embryogenesis. In : TA. Thorpe (éds). *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers : 309-344

- Finnie S., Powell W. et Dyer A.** (1989) The effect of carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Breeding 103 : 110-118
- Fischbeck G.** (2002) Contribution of barley to agriculture : a brief overview. In : G. Slafer, JL. Molina-Cano, R. Savin, JL. Araus and I. Romagosa (éds). Barley Science- Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality. New-York, London, Oxford, Food Product Press : 1-14
- Frey A., Godin B., Bonnet M., Sotta B. et Marion-Poll A.** (2004) Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*. Planta 218 : 958-964
- Friedrich L., Vernooij B., Gaffney T., Morse A. et Ryals J.** (1995) Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. Plant Molecular Biology 29 : 959-968
- Frova C.** (2003) The plant Gluthatione transferase gene family : genomic structure, functions, expression and evolution. Physiologia Plantarum 119 : 469-479
- Furuichi T., Cunningham K. et Muto S.** (2001) A putative two pore channel AtTPC1 mediates Ca²⁺ flux in *Arabidopsis* leaf cells. Plant Cell Physiology 42 : 900-905
- Garrido D., Vicente O., Heberle-Bors E. et Rodriguez-Garcia M.I.** (1995) Cellular changes during the acquisition of embryogenic potential in isolated pollen grains of *Nicotiana tabacum*. Protoplasma 186(3-4) : 220-230
- Germana A., Chiancone B., Levy Guarda N., Testillano P. et Risueno M.** (2006) Development of multicellular pollen of *Eriobotrya japonica* Lindl. through anther culture. Plant Science 171 : 718-725.
- Ghassemian M., Nambara E., Cutler S., Kawaide H., Kamiya Y. et McCourt P.** (2000) Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. The Plant Cell 12 : 1117-1126
- Gianinazzi S., Martin C. et Vallée J.** (1970) Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi-nc*. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. Compte-Rendus de l'Académie des Sciences D270 : 2383-2386
- Goicoechea N., Aguirreola J., Cenoz S. et Garcia-Mina J.** (2000) *Verticillium dahliae* modifies the concentrations of proline, soluble sugars, starch, soluble proteins and abscisic acid in pepper plants. European Journal of Plant Pathology 106 : 19-25
- Gonzalez J.M. et Jouve N.** (2005) Microspore development during *in vitro* androgenesis in triticale. Biologia Plantarum 49(1) : 23-28
- Grant J. et Loake G.** (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signalling in disease resistance. Plant Physiology 124 : 21-9

- Grossniklaus U., Nogler G. et Van Dijk P.** (2001) How to avoid sex : the genetic control of gametophytic apomixis. *The Plant Cell* 13 : 1491-1497
- Guha S. et Maheshwari S.** (1964) In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 212 : 97-98
- Gundlach H., Müller M., Kutcham M. et Zenk M.** (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitorinduced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89 : 2389-2393
- Guo Y., Halfter U., Ishitani M. et Zhu J.** (2001) Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *The Plant Cell* 13 : 1383-1400
- Guo Y. et Pulli S.** (2000a) Isolated microspore culture and plant regeneration in rye (*Secale cereale* L.). *Plant Cell Reports* 19 : 875-880
- Guo Y. et Pulli S.** (2000b) An efficient androgenic embryogenesis and plant regeneration method through isolated microspore culture in timothy (*Phleum pratense* L.). *Plant Cell Reports* 19 : 761-767
- Hammond-Kosack K. et Parker J.** (2003) Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* 14 : 177-193
- Hammond-Kosack K.E. et Jones J.** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8(10) : 1773-1791
- Hansen N. et Andersen S.** (1996) *In vitro* chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. *Euphytica* 88(2) : 159-164
- Harmon A., Gribskov M. et Harper J.** (2000) CDPKs-a kinase for every Ca^{2+} signal? *Trends in Plant Science* 6 : 395-397
- Hassawi DS. et Liang GH.** (1990) Effect of cultivar, incubation temperature, and stage of microspore development on anther culture in wheat and triticale. *Plant Breeding* 105(4) : 332-336
- Hassawi DS., QI J. et Liang GH.** (1990) Effects of growth regulator and genotype on production of wheat and triticale polyhaploids from anther culture. *Plant Breeding* 104(1) : 40-45
- Hazen S., Wu Y. et Kreps J.** (2003) Gene expression profiling of plant responses to abiotic stress. *Functional and Integrative Genomics* 3 : 105-111
- Heberle-Bors E.** (1983) Induction of embryogenic pollen grains *in situ* and subsequent *in vitro* pollens embryogenesis in *Nicotina tabacum* L. by treatments of the pollen donor plants with ferminizing agents. *Physiologia Plantarum* 59 : 67-72

Heberle-Bors E. (1985) *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review. *Theoretical and Applied Genetics* 71(3) : 361-374

Helleboid S., Bauw G., Belingheri L., Vasseur J. et Hilbert J. (1998) Extracellular β -1,3-glucanases are induced during early somatic embryogenesis in *Cichorium*. *Planta* 205(1) : 56-63

Helleboid S., Hendriks T., Bauw G., Inze D., Vasseur J. et Hilbert J. (2000) Three major somatic embryogenesis related proteins in *Cichorium* identified as PR proteins. *Journal of Experimental Botany* 51(348) : 1189-1200

Herrera J., Moreno L., Acuna J., De Pena M. et Osorio D. (2002) Colchicine-induced microspore embryogenesis in coffee. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71(1) : 89-92

Himmelbach A., Yang Y. et Grill E. (2003) Relay and control of abscisic acid signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 6 : 470-479

Hoekstra S., van Bergen S., van Brouwershaven I., Schilperoort R. et Wang M. (1997) Androgenesis in *Hordeum vulgare* L.: Effects of mannitol, calcium and abscisic acid on anther pretreatment. *Plant Science* 126(2) : 211-218

Hoekstra S., van Zijderveld M., Louwerse J., Heidekamp F. et van der Mark F. (1992) Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. *Plant Science* 86(1) : 89-96

Hoekstra S., Zijderveld M., Heidekamp F. et van der Mark F. (1993) Microspore culture of *Hordeum vulgare* L.: the influence of density and osmolality. *Plant Cell Reports* 12(12) : 661-665

Höfer M., Touraev A. et Heberle-Bors E. (1999) Induction of embryogenesis from isolated apple microspores. *Plant Cell Reports* 18(12) : 1012-1017

Hoffman T., Schmidt J., Zheng X. et Bent A. (1999) Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. *Plant Physiology* 119 : 935-949

Horlow C., Defrance M.C., Pollien J.M., Goujaud J., Delon R. et Pelletier G. (1992) Transfer of cytoplasmic male sterility by spontaneous androgenesis in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Euphytica* 66(1-2) : 45-53

Hosp J., de Faria Maraschin S., Touraev A. et Boutilier K. (2006) Functional genomics of microspore embryogenesis. *Euphytica* (sous presse)

Hosp J., Tashpulatov A., Roessner U., Barsova E., Katholnigg H., Steinborn R., Melikant B., Lukyanov S., Heberle-Bors E. et Touraev A. (2007) Transcriptional and metabolic profiles of stress-induced, embryogenic tobacco microspores. *Plant Molecular Biology* 63 : 137-149

Howe G. et Schilmiller A. (2002) Oxilipin metabolism in response to stress. Current Opinion in Plant Biology 5(3) : 230-236

Huang Q., Yang H. et Zhou C. (1982) Embryological observations on ovary culture of unpollinated young flowers in *Hordeum vulgare* L. Acta Botanica Sinica 24 : 295-300

Ichimura K., Mizoguchi T., Irie K., Morris P., Giraudat J., Matsumoto K. et Shinozaki K. (1998) Isolation of ATMEKK1 (a MAP Kinase Kinase Kinase)-intracting proteins and analysis of a MAP Kinase cascade in *Arabidopsis*. Biochemical and Biophysical Research Communications 253 : 532-543

Iiyama K., Lam T. et Stone B. (1994) Covalent cross-links in the cell wall. Plant Physiology 104 : 315-320

Immonen S. et Robinson J. (2000) Stress treatments and ficoll for improving green plant regeneration in triticale anther culture. Plant Science 150 : 77-84

Indrianto A., Barinova I., Touraev A. et Heberle-Bors E. (2001) Tracking individual wheat microspores *in vitro*: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. Planta 212(2) : 163-174

Ingram H., Power J., Lowe K. et Davey M. (2000) Microspore-derived embryo induction from cultured anthers of wheat. Plant Cell Tissue and Organ Culture 60 : 235-238

Inui H., Yamaguchi Y., Ishigami Y., Kawaguchi S., Yamada T., Ihara H. et Hirano S. (1996) Three extracellular chitinases in suspension-cultured rice cells elicited by N-acetylchitooligosaccharides. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 60(12) : 1956-1961

Iuchi S., Kobayashi M., Taji T., Naramoto M., Seki M., Kato T., Tabata S., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K. et Shinozaki K. (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. Plant Journal 27 : 325-33

Jacquard C., Asakaviciute R., Hamalian A., Sangwan R.S., Devaux P. et Clement C. (2006) Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis and albinism. Plant Cell Reports 25 : 375-381

Jacquard C., Wojnarowicz G. et Clément C. (2003) Anther culture in barley. In : M. Maluszynski, K.J. Kasha, BP. Forster and I. Szarejko (éds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers : 21-27

Jähne A., Lazzeri P., Jäger-Gussen M. et Lötz H. (1991) Plant regeneration from embryogenic cell suspensions derived from anther cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). Theoretical and Applied Genetics 82 : 74-80

Jähne A. et Lötz H. (1995) Cereal microspore culture. Plant Science 109(1) : 1-12

- Jakse M. et Bohanec B.** (2003) Haploid induction in onion via gynogenesis. In : M. Maluszynski, KJ. Kasha, BP. Forster and I. Szarejko (éds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers : 281-286
- Jamet E., Durr A., Parmentier Y. et Criqui M.** (1990) Is ubiquitin involved in the dedifferentiation of higher plant cells? Cell Differentiation and Development. 29 : 37-46
- Jestin** (1992) L'orge. In : A. Gallais and H. Bannerot (éds). Amélioration des espèces végétales cultivées. Paris, INRA : 55-70
- Jewell A., Murray B. et Alloway B.** (1988) Light and electron microscope studies on pollen development in barley (*Hordeum vulgare* L.) grow under copper-sufficient and deficient conditions. Plant, Cell and Environment 11 : 273-281
- Jones KG., Crossley SJ. et Dickinson HG.** (1990) Investigation of gene expression during plant gametogenesis by *in situ* hybridisation. In : N. Harris and DG. Wilkinson (éds). *In situ* hybridisation: application to developmental biology and medicine. Cambridge University Press : 189-204
- Joosen R., Cordewener J., Supena E., Vorst O., Lammers M., Maliepaard C., Zeilmaker T., Miki B., America T., Custers J. et Boutilier K.** (2007) Combined transcriptome and proteome analysis identifies pathways and markers associated with the establishment of rapeseed microspore-derived embryo development. Plant Physiology 144 : 155-172
- Kadota Y., Furuichi T., Ogasawara Y., Goh T., Higashi K., Muto S. et Kuchitsu K.** (2004) Identification of putative voltage-dependant Ca^{2+} -permeable channels involved in cryptogein-induced Ca^{2+} transients and defense responses in tobacco BY-2 cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 317 : 823-830
- Kahn A.** (1997) La place du génétique dans l'agriculture de demain. Agro Performances. Hors série : 4-5
- Kang T., Yang M. et Deckard EL.** (2003) The effect of osmotic potential on anther culture in spring wheat (*Triticum aestivum*). Plant Cell Tissue and Organ Culture 75 : 35-40
- Kao K., Saleem M., Abrams S., Pedras M., Horn D. et Mallard C.** (1991) Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods. Plant Cell Reports 9 : 595-601
- Kasha K. et Maluszynski M.** (2003) Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. In : M. Maluszynski, KJ. Kasha, BP. Forster and I. Szarejko (éds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers : 1-5
- Kasha K.J. et Kao K.N.** (1970) High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature 225 : 874-876

- Kasha K.J., Simion E., Oro R., Yao Q.A., Hu T.C. et Carlson A.R.** (2001) An improved *in vitro* technique for isolated microspore culture of barley. *Euphytica* 120 : 379-385
- Kasha K.J., Yao Q., Simion E., Hu T. et Oro R.** (1995) Production and applications of doubled haploids in crops. Proceedings of an International Symposium on the Use of Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement, Vienna, Austria, International Atomic Energy Agency (IAEA)
- Kawano T., Kadono T., Fumoto K., Lapeyrie F., Kuse M., Isobe M., Furuichi T. et Muto S.** (2004) Aluminum as a specific inhibitor of plant TPC1 Ca^{2+} channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324 : 40-45
- Kende H.** (1993) Ethylene biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44 : 283-307
- Kende H., van der Knaap E. et Cho H.** (1998) Deepwater rice: A model plant to study stem elongation. *Plant Physiology* 118 : 1105-1110
- Kernan Z. et Ferrie A.** (2006) Microspore embryogenesis and the development of a double haploidy protocol for cow cockle (*Saponaria vaccaria*). *Plant Cell Reports* 25 : 274-280
- Kicherer S., Backes G., Walther U. et Jahoor A.** (2000) Localising QTLs for leaf rust resistance and agronomic traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 100 : 881-888
- Kimber G. et Riley G.** (1963) Haploid angiosperms. *The Botanical Review*(29) : 480-509
- Kirby EJM., Appleyard M., Fellowes G.** (1985) Leaf emergence and tillering in barley and wheat. *Agronomie* 5 : 193-200
- Kitajima S. et Sato F.** (1999) Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. *Journal of Biochemistry* 125 : 1-8
- Kiviharju E., Moisander S. et Laurila J.** (2005) Improved green plant regeneration rates from oat anther culture and the agronomic performance of some DH lines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81 : 1-9
- Kiviharju E. et Pehu E.** (1998) The effect of cold and heat pretreatments on anther culture response of *Avena sativa* and *A. sterilis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54(2) : 97-104
- Kiviharju E., Puolimatka M., Saastamoinen M. et Pehu E.** (2000) Extension of anther culture to several genotypes of cultivated oats. *Plant Cell Reports* 19(7): 674-679
- Knight H.** (2000) Calcium signaling during abiotic stress in plants. *International Review of Cytology* 195 : 269-324
- Knight H. et Knight M.** (2001) Abiotic stress signalling pathway: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science* 6 : 262-267

- Knight H., Trewavas A. et Knight M.** (1996) Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *The Plant Cell* 8 : 489-503
- Knudsen S., Due I. et Andersen S.** (1989) Components of response in barley anther culture. *Plant Breeding* 103 : 241-246
- Koltunow A.** (1993) Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell* 5(10) : 1425-1437
- Koltunow A. et Grossniklaus U.** (2003) APOMIXIS: a developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology* 54(1) : 547-574
- Konzak CF. et Zhou H.** (1991) Anther culture methods for doubled haploid production in wheat. *Cereal research Communications* 19 : 147-164
- Kovtun Y., Chiu W.-L., Tena G. et Sheen J.** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97 : 2940-2945
- Kragh K., Jacobsen S., Mikkelsen J. et Nielsen K.** (1991) Purification and characterization of three chitinases and one β -1,3-glucanase accumulating in the medium of cell suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science* 76(1) : 65-77
- Kramell R., Miersch O., Atzorn R., Parthier B. et Wasternack C.** (2000) Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiology* 123 : 177-188
- Kreps J., Wu Y., Chang H.-S., Zhu T., Wang X. et Harper J.** (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic and cold stress. *Plant Physiology* 130 : 2129-2141
- Kruczkowska H., Pawlowska H. et Skucinska B.** (2002) Influence of anther pretreatment on the efficiency of androgenesis in barley. *Journal of Applied Genetic* 43(3) : 287-296
- Kudla J., Xu Q., Horter K., Gruisse W. et Luan S.** (1999) Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96 : 4718-4723
- Kushiro T., Okamoto M., Nabayashi K., Yamagishi K., Kitamura S., Asami T., Hirai N., Koshiba T., Kamiya Y. et Nambara E.** (2004) The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxilases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO journal* 23 : 1647-1656
- Kuwabara C., Arakawa K. et Yoshida S.** (1999) Abscisic acid-induced secretory proteins in suspension-cultured cells of winter wheat. *Plant Cell Physiology* 40 : 184-191

- Kyo M., Miyatake H., Mamezuka K. et Amagata K.** (2000) Specific phosphoproteins in the initial period of tobacco pollen embryogenesis. *Planta* 182 : 58-63
- Labbani Z., Richard N., De Buyser J. et Picard E.** (2005) Chlorophyllian durum wheat obtained by isolated microspores culture: importance of the pre-treatment. *Comptes rendus Biologie* 328(8) : 713-723
- Lamb C. et Dixon R.** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48 : 251-275
- Langridge P., Paltridge N. et Fincher G.** (2006) Functionnal genomics of abiotic stress tolerance in cereals. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*. 4(4) : 343-354
- Larsen E., Tuvesson I. et Andersen S.** (1991) Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Theoretical and Applied Genetics* 82 : 417-420
- Larson R.** (1995) Plant defences against oxydative stress. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 29 : 175-186
- Lawton K., Potter S., Uknes S. et Ryals J.** (1994) Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *The Plant Cell* 6 : 581-588
- Lawton K., Weymann K., Friedrich L., Vernooij B., Uknes S. et Ryals J.** (1995) Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8 : 863-870
- Lazaridou TB., Lithourgidis AS., Kotzamanidis ST. et Roupakias DG.** (2005) Anther culture response of barley genotypes to cold pretreatments and culture media. *Russian Journal of Plant Physiology* 52(5) : 696-699
- Lefebvre V.** (2005) Caractérisation des gènes AtNCED impliqués dans la biosynthèse de l'acide abscissique dans la graine d'*Arabidopsis thaliana*. Paris, Institut National Agronomique de Paris-Grignon
- Lentini Z., Reyes P., Martinez C. et Roca W.** (1995) Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. *Plant Science* 110: 127-138
- Leon J., Lawton M. et Raskin V.** (1995) Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthese in tobacco. *Plant Physiology* 108 : 1671-1678
- Leon J., Yalpani N., Raskin I. et Lawton M.** (1993) Induction of benzoic acid 2-hydroxylase in virus-inoculated tobacco. *Plant Physiology* 103 : 323-328
- Letarte J., Simion E., Miner M. et Kasha K.J.** (2006) Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture." *Plant Cell Reports* 24 : 691-698
- Leubner-Metzger G., Petruzzelli L., Waldvogel R., Vogeli-Lange R. et Meins F.** (1998) Ethylene-responsive element binding protein (EREBP) expression and the

transcriptional regulation of class I beta-1,3-glucanase during tobacco seed germination. Plant Molecular Biology 38 : 785-795

Leung J. et Giraudat J. (1998) Abscisic acid signal transduction. Annual Review of Plant Biology 49 : 199-222

Li H. et Devaux P. (2003) High frequency regeneration of barley doubled haploid plants from isolated microspore culture. Plant Science 164(3) : 379-386

Li WZ., Jing JK., Yao GH. et Hu H. (1993) The effects of genotype and mannitol pretreatment on high frequency androgenesis in barley. Chinese Science Bulletin 38 : 151-155

Liang G., Gu H., Yue G., Shi Z. et Kofoid K. (1997) Haploidy in Sorghum. In : S. Mohan Jain, S. Sopory and R. Veilleux (éds). In vitro haploid production in higher plants 4. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers : 149-161

Liljeroth E., Marttila S. et Bothmer R. (2005) Immunolocalization of defense-related proteins in the floral organs of barley (*Hordeum vulgare* L.). Journal of Phytopathology 153(11-12) : 702-709

Linthorst H. (1991) Pathogenesis-related proteins of plants. Critical reviews in plant sciences 10(2): 123-150

Liotenberg S., North H. et Marion-Poll A. (1999) Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. Plant Physiology and Biochemistry 37 : 341-350

Liu J. et Zhu J. (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. Science 280 : 1943-1945

Liu W., Zheng M.Y. et Konzak CF. (2002) Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Reports 20 : 821-824

Lorenzo O. et Solano R. (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. Current Opinion in Plant Biology 8 : 532-540

Lotan T., Ori N. et Fluhr R. (1989) Pathogenesis-Related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. The Plant Cell 1(9) : 881-887

Low P. et Merida J. (1996) The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. Physiologia Plantarum 96 : 533-542

Luan S. (1998) Protein phosphatases and signaling cascades in higher plants. Trends in Plant Science 3 : 271-275

Luan S., Kudla J., Rodriguez-Concepcion M., Yalovsky S. et Gruisse S. (2002) CaMs and CBLs: Calcium sensors for specific signal-response coupling in plants. The Plant Cell 14 supplément : S389-S400

- Luckett D. et Smithard R.** (1992) Doubled haploid production by anther culture for Australian barley breeding. *Australian Journal of Agricultural Research* 43(1) : 67-78
- Luckett D. et Smithard R.** (1995) Barley anther culture using membrane rafts. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 42(3) : 287-290
- Lyne R.L., Bennett R.I. et Hunter C.P.** (1986) Embryoid and plant production from cultured barley anthers. In : LA. Withers and PG. Alderson (éds). *Plant tissue culture and its agricultural application*. London, Butterworths Scientific, Guildford : 405-411
- Mac Gregor A.** (1996) Biochemistry of malting-the way forward. In V and VII International barley genetic symposium proceedings, invited papers, University of Saskatchewan Press
- Maksymiec W.** (1997) Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* 34(3) : 321-342
- Malamy J., Carr J., Klessig D. et Raskin I.** (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of Tobacco to viral infection. *Science* 250(4983) : 1002-1004
- Malik M., Wang F., Dirpaul J., Zhou N., Polowick P., Ferrie A. et Krochko J.** (2007) Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiology* 144 : 134-154
- Maluszynski M., Szarejko I. et Sigurbjörnsson B.** (1996) Haploidy and mutation techniques. In : S. Mohan Jain, S. Sopory and R. Veilleux (éds). *In vitro haploid production in higher plants* 4. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 1 : 67-93
- Maraschin S., Caspers M., Potokina E., Wulfert F., Graner A., Spaink H. et Wang M.** (2006) cDNA array analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis. *Physiologia Plantarum* 127(4) : 535-550
- Maraschin S., de Priester W., Spaink H. et Wang M.** (2005a) Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany* 56(417) : 1711-1726
- Maraschin S.F., Vennik M., Lamers G., Spaink H.P. et Wang M.** (2005b) Time-lapse tracking of barley androgenesis reveals position-determined cell death within pro-embryos. *Planta* 220 : 531-540
- Marin E., Nussaume L., Quesada A., Gonneau M., Sotta B., Hugueney P., Frey A. et Marion-Poll A.** (1996) Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO journal* 15 : 2331-2342
- Marsolais A.A., Séguin-Swartz G. et Kasha K.J.** (1985) The influence of anther cold pretreatments and donor plant genotypes on in vitro androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 3-4(1) : 69-79

- Martinez C., Pons E., Prats G. et Leon J.** (2004) Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *The Plant Journal* 37 : 209-217
- Martinez L.** (2003) In vitro gynogenesis induction and doubled haploid production in onion (*Allium cepa* L.). In : M. Maluszynski, KJ. Kasha, BP. Forster and I. Szarejko (éds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers : 275-280
- Maruyama K., Sakuma Y., Kasuga M., Ito Y., Seki M., Goda H., Shimada Y., Yoshida S., Shinozaki K. et Yamaguchi-Shinozaki K.** (2004) Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant Journal* 38 : 982-993
- Maucher H., Stenzel I., Miersch O., Stein N., Prasad M., Zierold U., Schweizer P., Dorer C., Hause B. et Wasternack C.** (2004) The allene oxide cyclase of barley (*Hordeum vulgare* L.)-cloning and organ-specific expression. *Phytochemistry* 65(7) : 801-811
- McCormick S.** (1993) Male Gametophyte Development. *The Plant Cell* 5(10) : 1265-1275
- Métraux J., Signer H., Ryals J., Ward E., Wyss-Benz M., Gaudin J., Raschdorf K., Schmid E., Blum W. et Inverardi B.** (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250(4983) : 1004-1006
- Mitsushashi W., Yamashita T., Toyomasu T., Kashiwagi Y. et Konnai T.** (2004) Sequential development of cysteine proteinase activities and gene expression during somatic embryogenesis in carrot. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 68 : 705-713
- Mittler R.** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9) : 405-410
- Mizoguchi T., Ichimura K., Irie K., Morris P., Giraudat J., Matsumoto K. et Shinozaki K.** (1998) Identification of a possible MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana* based on pairwise yeast two-hybrid analysis and functional tests of yeast. *FEBS Letter* 437 : 56-60
- Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K. et Shinozaki K.** (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93 : 765-769
- Mlodzianowski F. et Idzikowska K.** (1978) The ultrastructure of anther wall and pollen of *hordeum vulgare* at the microspore stage. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 47 : 219-224
- Mlodzianowski F. et Idzikowska K.** (1981) Fine structure of plastids during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 49 : 205-210

Moule C. (1971) Céréales. Paris, La Maison Rustique

Mueller M. (1997) Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum* 100 : 653-663

Muñoz-Amatriaín M., Svensson J., Castillo A., Cistué L., Close T. et Valles M. (2006) Transcriptome analysis of barley anthers: effect of mannitol treatment on microspore embryogenesis. *Physiologia Plantarum* 127 : 551-560

Nambara E. et Marion-Poll A. (2005) Abscisic acid biosynthesis and metabolism. *Annual Review of Plant Biology* 56 : 165-185

Netting A. (2002) pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions. II. Modifications in modes of metabolism induced by variation in the tension on the water column and by stress. *Journal of Experimental Botany* 53(367) : 151-173

Nitsch C. et Norreel B. (1973) Effet d'un choc thermique sur le pouvoir embryogène du pollen de *Datura innoxia* cultivé dans l'anthère ou isolé de l'anthère. Paris, Compte rendu de l'Académie des sciences, 276 : 303-306

Nogués S., Cotxarrera L., Alegre L. et Trillas M. (2002) Limitations to photosynthesis in tomato leaves induced by *Fusarium wilt*. *New Phytologist* 154 : 461-470

Nojiri H., Sugimori M., Yamane H., Nishimura Y., Yamada A., Shibuya N., Kodama O., Murofushi N. et Omori T. (1996) Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspensioncultured rice cells. *Plant Physiology* 110 : 387-392

Nuutila A., Aikasalo R., Ritala A., Kauppinen V. et Tammisola J. (2000a) Risk assessment of transgenic barley. Innovation in the barley-malt-beer chain, Nancy (France), Institut national polytechnique de Lorraine

Nuutila A., Hamalainen J. et Mannonen L. (2000b) Optimization of media nitrogen and copper concentrations for regeneration of green plants from polyembryogenic cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science* 151 : 85-92

Obert B. et Barnabas B. (2004) Colchicine induced embryogenesis in maize. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77(3) : 283-285

Obert B., Dedicova B., Hricova A., Samaj J. et Pretrova A. (2004) Flax anther culture: effect of genotype, cold treatment and media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79(2) : 233-238

O'Donnell P., Calvert C., Atzorn R., Wasternack C., Leyser H. et Boweles D. (1996) Ethylene as a signal mediating the wound response in tomato plants. *Science* 274 : 1914-1917

- Ogawa D., Nakajima N., Seo S., Mitsuhashi I., Kamada H. et Ohashi Y.** (2006) The phenylalanine pathway is the main route of salicylic acid biosynthesis in Tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves. *Plant Biotechnology* 23 : 395-398
- Olsen F.L.** (1987) Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare*. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources. *Carlsberg Research Communications* 52 : 393-404
- Olsen F.L.** (1991) Isolated and cultivation of embryogenic microspores from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Hereditas* 115 : 255-266
- Orozco-Cardenas M., Narvaez-Vasquez J. et Ryan C.** (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell* 13 : 179-191
- Orozco-Cardenas M. et Ryan C.** (1999) Hydrogen peroxide is generated systematically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96 : 6553-6557
- Orshinsky BR., McGregor LJ., Johnson GIE., Hucl P. et Kartha KK.** (1990) Improved embryoid induction and green shoot regeneration from wheat anthers cultured in medium with maltose. *Plant Cell Reports* 9(7) : 365-369
- Ozturk N., Talame V., Deyholos M., Michalowski C., Galbraith D., Gozukirmizi N., Tuberosa R. et Bohnert H.** (2002) Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology* 48 : 551-573
- Paire A., Devaux P., Lafitte C., Dumas C. et Matthys-Rochon E.** (2003) Proteins induced by barley microspores and their derived androgenic structures promote *in vitro* zygotic maize embryo formation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73 : 167-176
- Pauk J., Poulimatka M., Toth K. et Monostori T.** (2000) *In vitro* androgenesis of triticale in isolated microspore culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61 : 221-229
- Pei Z., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G., Grill E. et Schroeder J.** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406 : 731-734
- Pellegrineschi A.** (2004) Des cultures résistantes à la sécheresse et de la reproduction transgéniques : serait-ce une vision utopienne ? B. IBP
- Peltonen S.** (1999) Induced defence responses of cereals to pathogen attack. *Journal of Agricultural & Food Science* 8 : 479-492
- Pena-Cortes H., Albrecht T., Prat S., Weiler E. et Willmitzer L.** (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* 191 : 123-128
- Penninckx I., Eggermont K., Terras F., Thomma B., De Samblanx G., Buchala A., Métraux J., Manners J. et Broekaert W.** (1996) Pathogen-induced systemic

activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *The Plant Cell* 8 : 2309-2323

Perry S., Lehti M. et Fernandez D. (1999) The MADS-domain protein AGAMOUS-like 15 accumulates in embryonic tissues with diverse origins. *Plant Physiology* 120 : 121-129

Piccirilli M. et Arcioni S. (1991) Haploid plants regenerated via anther culture in wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Kock). *Plant Cell Reports* 10 : 273-276

Pickering R.A. et Devaux P. (1992) Haploid production: Approaches and use in plant breeding. In: Shewry PR. (éds). *Barley: Genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology*. Oxford, CAB International : 519-547

Pieterse C., Van Wees S., Hoffland E., Van Pelt J. et Van Loon L. (1996) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesisrelated gene expression. *The Plant Cell* 8 : 1225-1237

Polle A. (2001) Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate peroxidase-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology* 126 : 445-462

Powell W. (1988) The influence of genotype and temperature pre-treatment on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 12(3) : 291-297

Powell W., Thomas W.T.B. et Thompson D.M. (1992) The agronomic performance of anther culture derived plants of barley produced via pollen embryogenesis. *Annals of Applied Biology* 120 : 137-150

Price A., Taylor A., Ripley S., Griffiths A., Trewavas A. et Knight M. (1994) Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *The Plant Cell* 6 : 1301-1310

Pulido A., Bakos F., Castillo A., Valles M.P., Barnabas B. et Olmedilla A. (2005) Cytological and ultrastructural changes induced in anther and isolated-microspore cultures in barley: Fe deposits in isolated-microspore cultures. *Journal of Structural Biology* 149(2) : 170-181

Raina A., Pande H. et Bhojwani S. (2003) Factors Affecting Androgenesis in Indica Rice, Universitat Giessen / FB 09 Agrarwissenschaften, A-kotrophologie und Umwelt management L2 - <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2003/1238>

Raina S.K. et Irfan S.T. (1998) High-frequency embryogenesis and plantlet regeneration from isolated microspores of indica rice. *Plant Cell Reports* 17(12) : 957-962

Rakoczy-Trojanowska M., Smiech M. et Malepsy S. (1997) The influence of genotype and medium on rye (*Secale cereale* L.) anther culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 48 : 15-21

- Reynolds T. et Crawford R.** (1996) Changes in abundance of an abscisic acid-responsive, early cysteine-labeled metallothionein transcript during pollen embryogenesis in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Molecular Biology* 32(5) : 823-829
- Rezzonico E., Flury N., Meins F. et Beffa R.** (1998) Transcriptional down-regulation by abscisic acid of pathogenesis-related beta-1,3-glucanase genes in tobacco cell cultures. *Plant Physiology* 117 : 585-592
- Riley R.** (1974) The status of haploid research. In : K. Kasha (éds). *Haploids in higher plants: Advances and potential*. Guelph, University of Guelph : 3-9
- Rimberia F., Sunagawa H., Urasaki N., Ishimine Y. et Adaniya S.** (2005) Embryo induction via anther culture in papaya and sex analysis of the derived plantlets. *Scientia Horticulturae* 103(2) : 199-208
- Rines HW., Riera-Lizarazu O., Nunez VM., Davis DW. et Phillips RL.** (1997) Oat haploids from anther culture and from wide hybridizations. In : SM. Jain, SK. Sopory and RE. Veilleux (éds). *In vitro haploid production in higher plants 4*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers : 205-221
- Ritala A., Mannonen L. et Oksman-Caldentey K.M.** (2001) Factors effecting the regeneration capacity of isolated barley microspores (*Hordeum vulgare L.*). *Plant Cell Reports* 20 : 403-407
- Roberts-Oehlschlager S. et Dunwell J.** (1990) Barley anther culture: Pretreatment on mannitol stimulates production of microspore-derived embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20(3) : 235-240
- Rodrigues LR., Oliveira JMS., Mariath JEA., Iranço LB. et Bodanese-Zanettini MH.** (2005) Anther culture and cold treatment of floral buds increased symmetrical and extra nuclei frequencies in soybean pollen grains. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 81 : 101-104
- Roeder V.** (2006) Recherche et étude de marqueurs moléculaires de la réponse au stress chez l'algue brune *Laminaria digitata*. Roscoff, Pierre et Marie Curie (Paris VI)
- Rojo E., Léon J. et Sánchez-Serrano J.** (1999) Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 20(2) : 135-142
- Ryals J., Neuenschwander U., Willits M., Molina A., Steiner H. et Hunt M.** (1996) Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8: 1809-1819
- Ryan C.** (1992) The search for proteinase inhibitor-inducing factor, PIIF. *Plant Molecular Biology* 19 : 123-133
- Safarova D., Kopecky D. et Vagera J.** (2005) The effect of a short heat treatment on the *in vitro* induced androgenesis in *Silene latifolia* ssp. *alba*. *Biologia Plantarum* 49(2) : 261-264

- Saijo Y., Hata S., Kyosuka J., Shimamoto K. et Izui K.** (2000) Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinases confers both cold and salt /drought tolerance on rice plant. *Plant Journal* 23(3) : 319-327
- Saito S., Hirai N., Matsumoto C., Ohigashi H., Ohta D., Sakata K. et Mizutami M.** (2004) Arabidopsis CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiology* 134 : 1439-1449
- Samac D., Hironaka C., Yallaly P. et Shah D.** (1990) Isolation and characterization of the genes encoding basic and acidic chitinase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 93 : 907-914
- Sanders D., Brownlee C. et Harper J.** (1999) Communicating with calcium. *The Plant Cell* 11 : 691-706
- Sanders D., Pelloux J., Brownlee C. et Harper J.** (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell Supplement* : S401-S417
- Sangwan R. et Sangwan B.** (1986) Effets des rayons gamma sur l'embryogenèse somatique et l'androgenèse chez divers tissus végétaux cultivés *in vitro*. In : IAE. Agency (éds). Nuclear techniques and *in vitro* culture for plant improvement. International symposium. Vienna : 181-185
- Sangwan V., Foulds I., Singh J. et Dhindsa R.** (2001) Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx. *The Plant Journal* 27 : 1-12
- Sano T., Higaki T., Handa K., Kadota Y., Kuchitsu K., Hasezawa A., Endter J., Zimmermann U., Hedrich R. et Roitsch T.** (2006) Calcium ions are involved in the delay of plant cell cycle progression by abiotic stresses. *FEBS Letter* 580 : 597-602
- Schaller F.** (2001) Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *Journal of Experimental Botany* 52(354) : 11-23
- Schenk P.M., Kazan K., Wilson L., Anderson J.P., Richmond T., Somerville S.C. et Manners J.M.** (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97(21) : 11655-11660
- Schöffl F., Prändl R. et Reindl A.** (1998) Regulation of heat shock response. *Plant Physiology* 117 : 1135-1141
- Schroeder J., Allen G., Hugourieux V., Kwak J. et Waner D.** (2001) Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52 : 627-658
- Schultheiss H., Dechert C., Kiraly L., Fodor J., Michel K., Kogel K. et Huckelhoven R.** (2003) Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. *Plant Science* 165(6) : 1275-1280

- Schutzendubel A. et Polle A.** (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 53(372) : 1351-1365
- Schwartz S., Qin X. et Zeevaart J.** (2003) Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes and enzymes. *Plant Physiology* 131: 1591-1601
- Schwartz S., Tan B., Gage D., Zeevaart J. et McCarty D.** (1997) Specific oxidative cleavage of carotenoid by VP14 of maize. *Science* 276 : 1872-1874
- Scott P. et Lyne R.** (1994) Initiation of embryogenesis from cultured barley microspores: a further investigation into the toxic effects of sucrose and glucose. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37 : 61-65
- Scott P., Lyne R. et Aprees T.** (1995) Metabolism of maltose and sucrose by microspores isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 197 : 435-441
- Seki M., Narusaka M., Abe H., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Hayashizaki Y. et Shinozaki K.** (2001) Monitoring the Expression Pattern of 1300 *Arabidopsis* Genes under Drought and Cold Stresses by Using a Full-Length cDNA Microarray. *The Plant Cell* 13(1) : 61-72
- Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y. et Shinozaki K.** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* 31 : 279-292
- Seo M., Peeters A., Koiwai I., Oritani T., Marion-Poll A., Zeevaart J., Koornneef M., Kamiya Y. et Koshiba T.** (2000) The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyses the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97 : 12908-12913
- Shariatpanahi M., Bal U., Heberle-Bors E. et Touraev A.** (2006a) Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiologia Plantarum* 127(4) : 519-534
- Shariatpanahi M., Belogradova K., Hessamvaziri L., Heberle-Bors E. et Touraev A.** (2006b) Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment. *Plant Cell Reports* 25 : 1294-1299
- Sheen J.** (1996) Ca²⁺-dependant protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* 274 : 1900-1902
- Shen B., Jensen R. et Bohnert H.** (1997) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiology* 113 : 1177-1183

- Shim Y.S. et Kasha K.J.** (2003) Barley microspore transformation protocol by biolistic gun. In : M. Maluszynski, KJ. Kasha, BP. Forster and I. Szarejko (éds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Cordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers : 363-366
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. et Seki M.** (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. Current Opinion in Plant Biology 6 : 410-417
- Shoji T., Nakajima K. et Hashimoto T.** (2000) Ethylene suppresses Jasmonate-induced genes expression in nicotine biosynthesis. Plant Cell Physiology 41(9) : 1072-1076
- Shtereva L., Zagorska N., Dimitrov B., Kruleva M. et Oanh H.** (1998) Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). II. Factors affecting induction of androgenesis. Plant Cell Reports 18(3-4) : 312-317
- Silverman P., Nuckles E., Ye Y., Kuc J. et I. R.** (1993) Salicylic acid, ethylene and pathogen resistance in tobacco. Molecular Plant-Microbe Interactions 6 : 775-781
- Silverman P., Seskar M., Kanter D., Schweizer P., Métraux J. et Raskin I.** (1995) Salicylic acid in rice (Biosynthesis, conjugation, and possible role). Plant Physiology 108(2) : 633-639
- Sindhu R., Griffin D. et Walton D.** (1990) Abscisic aldehyde is an intermediate in the enzymatic conversion of xanthoxin to abscisic acid in *Phaseolus vulgaris* leaves. Plant Physiology 93 : 689-694
- Stenzel I., Hause B., Miersch O., Kurz T., Maucher H., Weichert H., Ziegler J., Feussner I. et Wasternack C.** (2003) Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology 51 : 895-911
- Stintzi A., Heitz T., Prasad V., Wiedemann-Merdinoglu S., Kauffmann S., Geoffroy P., Legrand M. et Fritig B.** (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. Biochimie 75 : 687-706
- Subbaiah C., Bush D. et Sachs M.** (1998) Mitochondrial contribution to the anoxic Ca²⁺ signal in maize suspension-cultured cells. Plant Physiology 118 : 759-771
- Sunderland N. et Huang B.** (1985) Barley anther culture: the switch of programme and albinism. Hereditas Supplement 3 : 27-40
- Sunderland N. et Roberts M.** (1979) Cold-pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers. Annals of Botany 43 : 405-414
- Supena E., Suharsono S., Jacobsen E. et Custers J.** (2006) Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Reports 25(1) : 1-10
- Szarejko I.** (2003) Anther culture for doubled haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). In : M. Maluszynski, KJ. Kasha, BP. Forster and I. Szarejko (éds). Doubled

haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers : 35-42

Takahashi K., Isobe M., Knight M., Trewavas A. et Muto S. (1997) Hypoosmotic shock induces increases in cytosolic Ca^{2+} in tobacco suspension-cultured cells. *Plant Physiology* 113 : 587-594

Talame V., Ozturk N., Bohnert H. et Tuberosa R. (2007) Barley transcript profiles under dehydratation shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *Journal of Experimental Botany* 58(2) : 229-240

Tenhola-Roininen T., Tanhauanpää P. et Immonen S. (2005) The effect of cold and heat treatments on the anther culture response of diverse rye genotypes. *Euphytica* 145(1) : 1-9

Theologis A. (1992) One rotten apple spoils the whole bushel: The role of ethylene in fruit ripening. *Cell* 70 : 181-184

Thibaud-Nissen F., Shealy R., Khanna A. et Vodkin L. (2003) Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. *Plant Physiology* 132 : 118-136

Thomas H.M. et Pickering R.A. (1988) The cytogenetics of a triploid *Hordeum bulbosum* and of some of its hybrid and trisomic derivatives. *Theoretical and Applied Genetics* 76(1) : 93-96

Thomas W., Forster B. et Gertsson B. (2003) Doubled haploid in breeding. In : M. Maluszynski, KJ. Kasha, BP. Forster and I. Szarejko (éds). Doubled haploid production in crop plants, a manual. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers : 337-349

Thomashow M. (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50 : 571-599

Thomma B., Eggermont K., Penninckx I., Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B. et Broekaert W. (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA* 95 : 15107-15111

Tiwari S. et Rahimbaev I. (1992) Comparison of glucose, sucrose and maltose for *Hordeum vulgare* L. isolated microspore culture using different methods. *Indian Journal of Experimental Biology* 30 : 624-627

Toonen M., Verhees J., Schmidt E., Van Kammen A. et De Vries S. (1997) AtLTP1 luciferase expression during carrot somatic embryogenesis. *The Plant Journal* 12 : 1213-1221

- Touraev A., Ilham A., Vicente O. et Heberle-Bors E.** (1996a) Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Reports* 15 : 561-565
- Touraev A., Indrianto A., Wratschko I., Vicente O. et Heberle-Bors E.** (1996b) Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sexual Plant Reproduction* 9 : 209-215
- Touraev A., Pfosser M. et Heberle-Bors E.** (2001) The microspore: a haploid multipurpose. *Advances in Botanical Research* 35 : 53-109
- Touraev A., Pfosser M., Vicente O. et Heberle-Bors E.** (1996c) Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta* 200(1) : 144-152
- Touraev A., Vicente O. et Heberle-Bors E.** (1997) Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Science* 2(8) : 297-302
- Trejo-Tapia G., Amaya U.M., Morales G.S., Sanchez A.D., Bonfil B.M., Rodriguez-Monroy M. et Jimenez-Aparicio A.** (2002) The effects of cold-pretreatment, auxins and carbon source on anther culture of rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71 : 41-46
- Tsay H., Yeh C. et Hsu J.** (1990) Embryogenesis and plant regeneration from anther culture of bamboo (*Sinocalamus latiflora* (Munro) McClure). *Plant Cell Reports* 9 : 349-351
- Tsuwamoto R., Fukuoka H. et Takahata Y.** (2007) Identification and characterization of genes expressed in early embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. *Planta* 225 : 641-652
- Tuvesson S., Liungberg A., Johansson N., Karlsson K., Suijs L. et Josset J.** (2000) Large scale production of wheat and triticale doubled haploids through the use of a single-anther culture method. *Plant Breeding* 119 : 455-459
- Uknes S., Winter A., Delaney T., Vernooij B., Morse A., Friedrich L., Nye G., Potter S., Ward E. et Ryals J.** (1993) Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6(6) : 692-698
- Uzunova A. et Popova L.** (2000) Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants. *Photosynthetica* 38(2) : 243-250
- Valletian-Bindchedler L., Métraux J. et Schweizer P.** (1998) Salicylic acid accumulation in barley is pathogen specific but not required for defense-gene activation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11(7) : 702-705
- Van Bergen S., Kottenhagen M., Van der Meulen R. et Wang M.** (1999) Effects of ABA during the pretreatment of barley anthers on androgenesis of *Hordeum vulgare* L. cultivars Igri and Digger. In : C. Clément, E. Pacini and JC. Audran (éds). *Anther and pollen: from biology to biotechnology*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer : 191-199

- Van Hengel A., Guzzo F., Van Kammen A. et De Vries S.** (1998) Expression pattern of the carrot EP3 endochitinase genes in suspension cultures and in developing seeds. *Plant Physiology* 117 : 43-53
- Van Loon L.** (1999) Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In : S. Datta and S. Muthukrishnan (éds). *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Boca Raton, CRC Press LLC : 1-19
- Van Loon L., Pierpoint W., Boller T. et Conejero V.** (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* 12 : 245-264
- Van Loon L., Rep M. et Pieterse C.** (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44 : 135-162
- Van Loon L. et Van Kammen A.** (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN'. *Virology* 40 : 199-211
- Van Wees S., De Swart E., Van Pelt J., Van Loon L. et Pieterse C.** (2000) Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97 : 8711-8716
- Vanacker H., Carver T. et Foyer C.** (2000) Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiology* 123 : 1289-1300
- Vanlerberghe G., Vanlerberghe A. et McIntosh L.** (1997) Molecular genetic evidence of the ability of alternative oxidase to support respiratory carbon metabolism. *Plant Physiology* 113 : 657-661
- Verslues P., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J. et Zhu J.** (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal* 45 : 523-539
- Vidal S., De Leon I., Denecke J. et Palva E.** (1997) Salicylic acid and the plant pathogen *Erwinia carotovora* induce defense genes via antagonistic pathways. *The Plant Journal* 11 : 115-123
- Von Bothmer R. et Jacobsen N.** (1985) Origin, taxonomy and related species. In : D. Rasmussen (éds). *Barley, Agronomy Monograph*. 26 : 19-26
- Von Bothmer R., Jacobsen N., Baden C., Jorgensen R.B. et Linde-Laursen I.** (1995) An ecogeographical study of the genus *Hordeum*. Systematic and ecogeographic studies on crop gene pools 7. Rome, IBPGR
- Vrinten L., Nakamura T. et Kasha K.** (1999) Characterization of cDNAs expressed in the early stages of microspore embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Molecular Biology* 41(4) : 455-463

Wang J., Hu D., Wang H. et Tang Y. (1981) Studies on increasing the induction frequency of pollen callus in wheat. *Hereditas* (Beijing) 3 : 28-29

Wang M., Hoekstra S., Van Bergen S., Lamers G., Oppedijk B., Van der Heijden M., De Priester W. et Schilperoort R. (1999) Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant Molecular Biology* 39(3) : 489-501

Wang M., Van Bergen S. et Van Duijn B. (2000) Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiology* 124 : 523-530

Wang W., Vinocur B. et Altman A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218 : 1-14

Wang W., Vinocur B., Shoseyov O. et Altman A. (2001) Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Horticulturae* 560 : 285-292

Wasternack C., Miersch O., Kramell R., Hause B., Ward J., Beale M., Boland W., Parthier B. et Feussner I. (1998) Jasmonic acid: biosynthesis, signal transduction, gene expression. *Lipid - Fett* 100(4-5) : 139-146

Wasternack C. et Parthier B. (1997) Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in Plant Science* 2(8) : 302-307

Wei Y., Zhang Z., Andersen C., Schmelzer E., Gregeren P., Collinge D., Smedegaard-Petersen V. et Thordal-Christensen H. (1998) An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew. *Plant Molecular Biology* 36(1) : 101-112

Wenzel G., Hoffmann F. et Thomas E. (1977) Increased induction and chromosome doubling of androgenetic haploid rye. *Theoretical and Applied Genetics* 51(2) : 81-86

White A., Dunn M., Brown K. et Hughes M. (1994) Comparative analysis of genomic sequence and expression of a lipid transfer protein gene family in winter barley. *Journal of Experimental Botany* 45 : 1885-1892

White P. et Broadley M. (2003) Calcium in plants. *Annals of Botany* 92 : 1-25

Wohlgemuth H., Mittelstrass K., Kschieschan S., Bender J. et Weigel H.-J. (2002) Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant Cell Environment* 25 : 717-726

Wojnarowicz G., Careda S., Devaux P., Sangwan R.S. et Clément C. (2004) Barley anther culture: assessment of carbohydrate effects on embryo yield, green plant production and differential plastid development in relation with albinism. *Journal of Plant Physiology* 6 : 747-755

- Wojnarowicz G., Jacquard C., Devaux P., Sangwan R.S. et Clement C.** (2002) Influence of copper sulfate on anther culture in barley (*Hordeum vulgare L.*). Plant Science 162 : 843-847
- Wood N., Allan A., Haley A., Viry-Moussaid M. et Trewavas A.** (2000) The characterization of differential calcium signalling in tobacco guard cells. The Plant Journal 24 : 335-344
- Wremerth Weich E. et Levall M.** (2003) Doubled haploid production of sugar beet (*Beta vulgaris L.*). In : M. Maluszynski, KJ. Kasha, BP. Forster and I. Szarejko (éds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers : 255-263
- Wu Y., Kuzma J., Marechal E., Graeff R., Lee H., Foster R. et Chua N.** (1997) Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. Science 278 : 2126-2130
- Xiang L. et Zhu J.** (2002) Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. Plant, Cell and Environment 25 : 131-139
- Xie J., Gao M., Cai Q., Cheng X., Shen Y. et Liang Z.** (1995) Improved isolated microspore culture efficiency in medium with maltose and optimized growth regulator combination in japonica rice (*Oryza sativa*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42 : 245-250
- Xiong L., Ishitani M., Lee H. et Zhu J.** (2001) The Arabidopsis *LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. The Plant Cell 13 : 2063-2083
- Xiong L., Lee H., Ishitani M., Tanaka Y., Stevenson B., Koiwa H., Bressan R., Hasegawa P. et Zhu J.** (2002b) Repression of stress-responsive genes by FIERY2, a novel transcriptional regulator in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 99 : 10899-10904
- Xiong L., Lee I., Ishitani M. et Zhu J.** (2002c) Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the *LOS6/ABA1* locus in *Arabidopsis*. Journal of Biological Chemistry 277 : 8588-8596
- Xiong L., Schumaker K. et Zhu J.** (2002a) Cell signaling during cold, drought and salt stresses. The Plant Cell 14 : S165-S183
- Xiong L. et Zhu J.** (2003) Regulation of Abscisic acid biosynthesis. Plant Physiology 133 : 29-36
- Xu Y., Chang Pi-Fang L., Liu D., Narasimhan M., Raghothama K., Hasegawa P. et Bressan R.** (1994) Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. The Plant Cell 6 : 1077-1085
- Xu Z., Nakajima M., Suzuki Y. et Yamaguchi I.** (2002) Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings. Plant Physiology 129 : 1285-1295

- Yalpani N., Enyedi A., Leon J. et Raskin I.** (1994) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* 193 : 372-376
- Yamaguchi-Shinozaki K. et Shinozaki K.** (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* 57 : 781-803
- Yao Q., Simion E., William M., Krochko J. et Kasha K.** (1997) Biolistic transformation of haploid isolated microspores of barley (*Hordeum vulgare L.*). *Genome* 40 : 570–581
- Yu D., Liu W., Fan B., Klessig D. et Chen Z.** (1997) Is the high basal level of salicylic acid important for disease resistance in potato ? *Plant Physiology* 115 : 343-349
- Yu L., Djebrouni M., Chamberland H., Lafontaine J. et Tabaeizadeh Z.** (1998) Chitinase: differential induction of gene expression and enzyme activity by drought stress in the wild (*Lycopersicon chilense* Dun.) and cultivated (*L. esculentum* Mill.) tomatoes. *Journal of Plant Physiology* 153 : 745-753
- Yu L. et Setter T.** (2003) Comparative transcriptional profiling of placenta and endosperm in developing maize kernels in response to water deficit. *Plant Physiology* 131 : 568-582
- Yu X.-M. et Griffiths M.** (2001) Winter rye antifreeze activity increases in response to cold and drought, but not abscisic acid. *Physiologia Plantarum* 112 : 78-86
- Zapata-Arias F.** (2003) Laboratory protocol for anther culture technique in rice. In : M. Maluszynski, K.J. Kasha, BP. Forster and I. Szarejko (éds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers : 109-116
- Zhang G., Zhang D., Tang G., He Y. et Zhou W.J.** (2006) Plant development from microspore-derived embryos in oilseed rape as affected by chilling, desiccation and cotyledon excision. *Biologia Plantarum* 50(2) : 180-186
- Zhang L., Anceau C., Lepoivre P., Seilleur P. et Semal J.** (1987) An efficient method for the regeneration of wheat (*Triticum aestivum L.*) from anther cultures. *Bull Rech Agron Gembloux* 22 : 301-314
- Zhang S. et Klessig D.** (1997) Salicylic acid activates a 48-kD MAP Kinase in tobacco. *The Plant Cell* 9(5): 809-824
- Zhang X., Zhang L., Dong F., Gao J., Galbraith D. et Song C.** (2001) Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiology* 126 : 1438–1448
- Zhao J., Newcomb W. et Simmonds D.** (2003) Heat-shock proteins 70 kDa and 19kDa are not required for induction of embryogenesis of *Brassica napus L.* cv. Topas. *Plant and Cell Physiology* 44 : 1417-1421

- Zhao J., Simmonds D. et Newcomb W.** (1996) Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. Topas. *Planta* 198(3) : 433-439
- Zhou H., Zheng Y. et Konzak C.** (1991) Osmotic potential of media affecting green plant percentage in wheat anther culture. *Plant Cell Reports* 10 : 63-66
- Zhou W., Hagberg P. et Tang G.** (2002) Increasing embryogenesis and doubling efficiency by immediate colchicine treatment of isolated microspores in spring *Brassica napus*. *Euphytica* 128(1) : 27-34
- Zhu J.** (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6 : 66-71
- Zhu J., Gong Z., Zhang C., Song C., Damsz B., Inan G., Koiwa H., Zhu J., Hasegawa P. et Bressan R.** (2002) OSM1/SYP61: a syntaxin protein in *Arabidopsis* control abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress. *The Plant Cell* 14 : 3009-3028
- Ziauddin A., Marsolais A., Simion E. et Kasha K.** (1992) Improved plant regeneration from wheat anther and barley microspore culture using phenylacetic acid (PAA). *Plant Cell Reports* 11(10) : 489-498
- Zivy M., Devaux P., Blaisonneau J., Jean R. et Thiellement H.** (1992) Segregation distortion and linkage studies in microspore-derived double haploid lines of *Hordeum vulgare* L. *Theoretical and Applied Genetics* 83 (6-7) : 919-924
- Zonia L. et Tupy J.** (1995) Lithium-sensitive calcium activity in the germination of apple (*Malus × domestica* Borkh.), tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), and potato (*Solanum tuberosum* L.) pollen. *Journal of Experimental Botany* 46(8) : 973-979

6. Annexes

6.1. Curriculum vitae

Cédric JACQUARD
10 rue Maurice RENARD
51100 REIMS
06.21.01.12.77
Email : jacquardc@hotmail.com
30 ans, marié

Docteur en Biotechnologies végétales

FORMATION

2007	Nouveau Chapitre de Thèse Université de Reims Champagne Ardenne (51) - Association Bernard Gregory (75)
2003 - 2007	Doctorat Sciences et Techniques « Biotechnologies végétales » - Mention très honorable avec les félicitations écrites du jury Université de Reims Champagne-Ardenne (51)
2004 / 2006	Diplôme Universitaire d'Ouverture Professionnelle aux Bio-industries - Mention BIEN IPROB et Université Claude Bernard Lyon I (69)
2001 / 2002	DEA "Stratégies d'Exploitation des Fonctions Biologiques" - option « Biotechnologies Végétales » Mention BIEN Université de Technologie de Compiègne (60)
2000 / 2001	Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie - option « Biologie Moléculaire et Biotechnologies » UFR Sciences - Université de Reims Champagne-Ardenne (51)
1999 / 2000	Licence de Biologie Cellulaire et Physiologie - option « Microbiologie Générale » UFR Sciences - Université de Reims Champagne-Ardenne (51)
1997 / 1999	DEUG Sciences de la Vie et de la Terre - option « Biologie - Biochimie » UFR Sciences - Université de Reims Champagne-Ardenne (51)

EXPERIENCES SCIENTIFIQUES

2008	Stage post-doctoral - « Analyse génomique comparative du développement de l'embryon pollinique, avec ou sans suspenseur, issu de culture de microspores chez <i>Brassica napus</i> L. » Laboratory of Plant Cell Biology - Université de Wageningen (Pays-Bas)
2003 / 2007	Sujet de doctorat - « Stress et reproduction chez les plantes cultivées : Embryogenèse pollinique chez la vigne (<i>Vitis vinifera</i> L.) et l'orge (<i>Hordeum vulgare</i> L.). Directeur de recherche : Professeur C. Clément Collaborations académiques et industrielles, nationales et internationales : Universités d'Amiens, de Bourgogne, de Grenade et de Liège; Etablissements Florimond Desprez, Institut d'agriculture de Lituanie Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes - U.R.C.A. (51)
2001 / 2002	Stage dans le cadre du DEA : « Androgenèse et albinisme chez l'orge ». Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales - U.R.C.A. (51)

Publications scientifiques :

Jacquard C, Asakavičiūtė R, Hamalian AM, Sangwan RS, Devaux P, Clément C (2006). Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis and albinism. *Plant Cell Reports* 25 : 375-381.

Wojnarowicz G, **Jacquard C**, Devaux P, Sangwan RS, Clément C (2002). Influence of copper sulfate on anther culture in barley (*Hordeum vulgare L.*). Plant Science 162 : 843-847.

Publications scientifiques en préparation :

Jacquard C, Nollin F, Hécart C, Zuka A, Graudal D, Rashal I, Sangwan RS, Devaux P, Mazeyrat-Gourbeyre F and Clément C. Influence of copper and programmed cell death on microspore embryogenesis and albinism in recalcitrant spring cvs. of barley (*Hordeum vulgare L.*). soumise à Plant Biotechnology Journal

Jacquard C, Mazeyrat-Gourbeyre F, Devaux P, Baillieul F, Clément C. Microspore embryogenesis in barley: anther pretreatment stimulates plant defence gene expression.

Article dans un ouvrage collectif :

Jacquard C, Wojnarowicz G, Clément C (2003). Anther culture in barley. In : M. Maluszynski, KJ. Kasha, BP. Forster and I. Szarejko (éds). Doubled haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers : 21-27

Varnier AL, **Jacquard C**, Clément C (2007). Programmed cell death and microspore embryogenesis. In : A. Touraev, BP. Forster and S. Mohan Jain. (éds). Advances in haploid production in higher plants. Kluwer Academic Publishers. (Sous presse)

Communications orales et posters :

Jacquard C, Asakavičiute R, Sangwan RS, Devaux P, Clément C (2006). Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis. Haploid in higher plants III, Vienne (Autriche). Poster.

Jacquard C, Mazeyrat-Gourbeyre F, Devaux P, Baillieul F, Clément C. Plant defence mechanisms are triggered in the anther during the pre-treatment process. Haploid in higher plants III, Vienne (Autriche). Communication.

Jacquard C, Sangwan RS, Devaux P, Clément C (2005). Microspore embryogenesis and albinism in barley. Meeting COST 851, Stara Lesna (Slovaquie). Communication.

Jacquard C, Schoefs B, Clément C (2004). Variations around a theme (proto)chlorophyll(ide) fluorescence. Symposium on chlorophyll fluorescence, Ceske Budejovice (République Tchèque). Communication.

Jacquard C, Schoefs B, Clément C (2003). Putative origin of albinism in androgenetic plantlets in barley (*Hordeum vulgare L.*). Congress of the European Society for Photobiology, Vienne (Autriche). Communication.

Jacquard C, Wojnarowicz G, Devaux P, Sangwan RS, Clément C (2002). The effect of copper on anther culture in various cultivars of barley (*Hordeum vulgare L.*). Meeting COST 851, Budapest (Hongrie). Communication.

Wojnarowicz G, **Jacquard C**, Devaux P, Sangwan RS, Ait Barka E et Clément C (2002). Beneficial effect of copper on anther culture in barley (*Hordeum vulgare L.*). VIII^{èmes} Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies, Amélioration des Plantes et Sécurité Alimentaire "Biotechnologies Végétales : valorisations pour une agriculture durable". Marrakech (Maroc). Poster.

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

- 2006 / 2008 Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche
- Travaux de recherche en continuité de mon sujet de doctorat
- Enseignement de travaux dirigés et pratiques en Licence et Master
Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes - U.R.C.A. (51)

- Jan / Juin 2003 Vacataire de recherche
- Réalisation de travaux de recherche
- Encadrement de travaux pratiques en DEUG

Laboratoire BPV - U.R.C.A. (51)

2002 à 2004	Enseignant à domicile - Mise à niveau et soutien scolaire en mathématiques et biologie jusqu'en terminale.	COMPLETUDE - Reims (51)
2002 à 2005	Responsable de laboratoire d'analyses vendanges - Analyse d'échantillons et suivi de maturation - Travail en collaboration avec l'œnologue et le chef de caves - Encadrement de stagiaires de Diplôme National d'Oenologie	Champagne Perrier-Jouet - Epernay (51)
2001 / 2002	Tutorat Sciences de la Vie et de la Terre - Mise à niveau pour les étudiants de DEUG	UFR Sciences - U.R.C.A. (51)
1997 / 1998	Responsable d'une équipe de prospecteurs publicitaires	FLUO - Vanves (92)
1994 à 2000	Travaux estivaux et extrascolaires	

COMPETENCES

- Cultures *in vitro* et cultures en serre
- Boutures fructifères et *in vitro* de vigne
- Cytologie et Microscopie optique (Hoechst, TUNEL)
- Biologie moléculaire (RT-PCR quantitative temps réel, Northern Blot, Southern Blot, transformation bactérienne)
- Encadrement de travaux pratiques et dirigés (Licence et Master)
- Encadrement de 14 stagiaires de BTS, licence, licence professionnelle et master recherche
- Veilles bibliographique et stratégique

REFERENCES

Pr. C. CLEMENT, URCA, Laboratoire de Stress Défenses et Reproduction des Plantes, 51687 Reims Cedex 2, France. Tel: +33 (0)3 26 91 33 39. E-mail: christophe.clement@univ-reims.fr

Dr. P. DEVAUX, Florimond Desprez, Laboratoire Biotechnologies, BP 41, 59242 Cappelle en Pévèle, France
Tel: +33 (0)3 20 84 94 90. E-mail: pierre.devaux@florimond-desprez.fr

Dr. M. ROSA-CALATRAVA, CNRS FRE 3011, faculté de médecine RTH Laennec, 11 rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon Cedex 08 - France. Tel: +33 (0)4 78 77 87 11. E-mail: manuel.rosa-calatrava@laennec.univ-lyon1.fr

DIVERS

2004 / 2006	Membre du conseil scientifique de l'UFR Sciences Exactes et Naturelles à l'Université de Reims Champagne-Ardenne
2003 / 2005	Responsable des relations étudiants - entreprises au sein de l'Association des Doctorants de Champagne -Ardenne (ADOCa)
1998 / 2001	Président d'une association étudiante (GABA) Vice-président de la Fédération Rémoise des Etudiants en Sciences (FRES)
1995 / 2002	Entraîneur d'une équipe de jeunes nageurs de niveau régional au sein du Reims Champagne Natation
1995 / 2002	Nageur de niveau Nationale 2 au sein du Reims Champagne Natation

1994

Brevet National de Premiers Secours

Permis A et B

Maîtrise des logiciels Word, Powerpoint et Endnote, bonne connaissance du logiciel Excel

Anglais opérationnel

Allemand niveau scolaire

6.2. Nouveau Chapitre de Thèse

Valorisation des compétences *« un nouveau chapitre de la thèse® »*

Présenté par Cédric JACQUARD

« Stress et reproduction chez les plantes cultivées :
Embryogenèse pollinique chez l'orge »

Directeur de thèse : Pr C. Clément

Ecole doctorale : Sciences Technologies Santé

Mentor ABG : Jean-Marie Fétrot

Date de soutenance probable : Juillet 2007



SOMMAIRE

1. Résumé	2
2. Les enjeux	2
3. Le contexte	2
4. Les moyens	3
4.1. Ressources humaines	3
4.2. Moyens techniques	3
4.3. Réseau	4
5. Préparation et cadrage du projet	4
5.1. Préparation	4
5.2. Avantages et contraintes	4
5.3. Restitution des résultats	5
6. Gestion du projet	5
7. Coût consolidé du projet	5
8. Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles	7
8.1. Domaines scientifiques et techniques	7
8.2. Compétences	7
8.3. Savoir-faire	8
9. Impacts des résultats	8
10. Incidences en termes d'acquisition de compétences	9
11. Projets professionnels	10
11.1. La recherche	10
11.2. L'expertise	10
11.3. L'académique	11

Embryogenèse pollinique et albinisme chez l'orge

1. Résumé

L'embryogenèse pollinique est une technique d'amélioration des espèces qui permet de former de nouvelles plantes en utilisant les grains de pollen. Cette technique intéressante, car elle permet de diminuer le temps et le coût de la sélection classique, voit son utilisation réduite chez les céréales à cause de la régénération de plantes albinos. Ces plantes sont blanches car elles sont dépourvues de chlorophylles et sont donc incapables de réaliser la photosynthèse. Elles sont par conséquent inexploitables pour les sélectionneurs car n'étant pas autonomes elles ne peuvent pas se développer. Leur culture est donc impossible.

Ma thèse a pour but d'étudier et de comprendre les mécanismes impliqués dans la régénération des plantes albinos afin de faire disparaître ce frein à la sélection.

2. Les enjeux

L'objectif de mon travail était de comprendre les mécanismes impliqués dans la régénération de plantes albinos afin d'y remédier chez l'orge et plus généralement chez les céréales. Le but ultime était d'obtenir 100% de plantes vertes

Si cela fonctionne le laboratoire, et plus généralement la région, deviendrait leader dans la production variétale et notamment dans la création de lignées résistantes naturellement (agriculture durable).

3. Le contexte

J'ai réalisé ma thèse au laboratoire de Stress Défenses et Reproduction des Plantes appartenant à l'Unité de Recherche Vigne et Vins de Champagne. Mon projet était plutôt en marge du projet du laboratoire qui est plus tourné sur la vigne et notamment la lutte biologique ainsi que les mécanismes de défense de cette espèce.

Très peu de laboratoires sont en concurrence sur mon sujet aussi bien au niveau national qu'international. Je me suis de plus intéressé à une partie non explorée jusqu'ici, ce qui m'a permis de me retrouver "pionnier" dans le domaine. Un laboratoire letton, un autre lithuanien et enfin des espagnols ont demandé à collaborer avec nous afin de bénéficier de nos avancées.

4. Les moyens

4.1. Ressources humaines

Du point de vue de l'encadrement, mon comité de pilotage était composé de deux professeurs d'université, d'un directeur de recherche CNRS et du directeur de recherche des établissements Florimond Desprez (également Correspondant à l'Académie d'Agriculture de France).

Mon directeur de thèse, mais également plusieurs collègues professeurs ou maîtres de conférences m'ont beaucoup apporté sur la réflexion et l'interprétation de mes résultats.

Le sujet de ce projet étant ambitieux, les établissements Florimond Desprez se sont chargés de me fournir une grande quantité de matériel. Le suivi des cultures était assuré par un agent technique.

Le sujet de ma thèse étant ambitieux, il a servi de support à plusieurs stages de L2, L3, et M1 que j'ai encadrés. Les stagiaires m'ont ainsi apporté une aide manuelle non négligeable et m'ont permis de développer des aptitudes d'encadrement et de gestion de personnel.

4.2. Moyens techniques

Le premier outil mis à disposition fut la base de données Internet de l'URCA qui m'a permis de réaliser ma bibliographie et de suivre l'évolution des recherches des autres équipes tout au long de ma thèse.

Sur le plan purement technique, j'ai pu disposer de l'ensemble des équipements du laboratoire et des collaborations m'ont permis de disposer de moyens inexistant au labo.

J'ai ainsi pu bénéficier pour la partie physiologie d'une serre, d'une chambre de culture, d'une hotte à flux laminaire, d'un Imaging PAM et d'un LICOR. Pour la partie cytologie tout l'appareillage nécessaire était à ma disposition, de l'inclusion à la réalisation des coupes et leur observation. Pour la partie biologie moléculaire j'ai utilisé l'ensemble de l'appareillage permettant de réaliser des extractions d'ADN ou d'ARN, la RT-PCR quantitative temps réel ainsi que des transformations et des clonages bactériens.

Les collaborations m'ont permis d'obtenir une plus grande quantité de matériel végétal grâce aux serres de Florimond Desprez et de réaliser des HPLC et des spectres de fluorescence de pigments grâce à la collaboration avec les Universités de Dijon et de Liège. Une collaboration avec l'Université d'Amiens devait me permettre de réaliser la technique d'Hybridation *In Situ* mais le manque de temps ne me l'a pas permis, donc les échantillons sont prêts et j'espère pouvoir conclure ce travail après ma soutenance.

4.3. Réseau

Le laboratoire noue de nombreuses collaborations avec des laboratoires de l'URCA (laboratoires d'oenologie, de biochimie, de biologie cellulaire) mais également d'autres Universités nationales (Amiens, Bordeaux, Lille, Tours, Dijon, Strasbourg). Sur le plan international, le laboratoire travaille avec l'Académie des Sciences de Sofia (Bulgarie), l'Institut de Génétique et Microbiologie de Vienne (Autriche), le laboratoire de Génétique et Physiologie de l'Institut Lithuanien d'Agriculture, Le Nova Scotia Agricultural College (Canada) et les Universités de Caroline du Nord (U.S.A.), Chiayi (Taiwan), Leiden (Hollande), Liège (Belgique), Sienne (Italie) et Würzburg (Allemagne). Il existe également des liens avec des entreprises : B2B, Florimond Desprez, Goëmar, Moet et Chandon ainsi qu'avec des instituts régionaux (CIVC) ou nationaux (INRA / CNRS / INA-PG).

Le laboratoire est également impliqué dans plusieurs réseaux : le Réseau Inter-régional Alsace-Bourgogne-Champagne "Vignes et Vins Septentrionaux" (Dijon), le Réseau "Biotechnologie" (Picardie), le Réseau coulure et calamités agricoles (Ministère de l'Agriculture) et le Réseau Européen sur le chêne (Allemagne, Angleterre, Autriche, France).

Tous ces liens m'ont permis d'être impliqué dans des collaborations et d'avoir des contacts avec les établissements Florimond Desprez de Cappelle en Pévèle et des laboratoires des Universités françaises de Dijon et Amiens ainsi que des Universités étrangères de Vilnius (Lituanie), Vienne (Autriche), Riga (Lettonie), Liège (Belgique) et Grenade (Espagne).

5. Préparation et cadrage du projet

5.1. Préparation

Mon directeur a établi le projet global de ma thèse qu'il m'a présenté puis que l'on a discuté avant qu'il ne soit présenté à la région Champagne-Ardenne afin d'obtenir un financement. J'ai tout de suite accepté ce projet qui était la suite de mon travail de DEA qui m'avait passionné.

5.2. Avantages et contraintes

L'avantage de poursuivre mes travaux de DEA était que je connaissais le sujet et les directions à prendre. La technique en elle-même n'est pas nouvelle et est utilisée largement chez les céréales, il me suffisait donc de partir de ce qui existait et de l'améliorer pour que cela fonctionne sur mes plantes.

En travaillant sur le végétal, il y a toujours les contraintes liées aux cultures avec les maladies ou les insectes qui peuvent ravager très rapidement les plantes. De plus le végétal est un matériel vivant qui peut également répondre de façon aléatoire si des paramètres extérieurs, tel que la saison ou l'apport d'eau, changent. Pour diminuer ces risques, j'ai mené une veille approfondie, et cultivé mes plantes en serre et en chambre de culture où les conditions étaient fixées. Le suivi quotidien des cultures m'a permis de repérer toutes attaques carences ou anomalies et d'y remédier au plus vite.

5.3. Restitution des résultats

Les résultats obtenus ont été restitués sous forme de rapports annuels à la région et à l'université et sous forme de publications ou articles scientifiques quand cela fut possible. J'ai également présenté six communications orales et un poster lors de congrès internationaux.

6. Gestion du projet

J'ai eu des réunions tous les 5 à 6 mois avec mon directeur de thèse et j'ai eu deux réunions avec l'ensemble de mon comité de pilotage. J'ai pu m'entretenir avec les différents membres de mon comité de pilotage à divers moments selon les disponibilités de chacun.

Les décisions quant à mes manips ont été prises en concertation avec mon directeur de thèse. Je n'ai pas eu besoin de réorienter mon projet que j'ai simplement optimisé en adoptant les voies favorables en fonction des résultats que j'obtenais.

J'ai entretenu de très bonnes relations avec mon directeur ainsi qu'avec les diverses personnes (collègues ou collaborateurs) que j'ai eu la chance de côtoyer tout au long de ma thèse. Je n'ai rencontré aucun souci relationnel durant ces trois ans.

7. Coût consolidé du projet

J'ai tenté de réaliser une estimation la plus juste possible du coût total de mon projet. Pour cela je me suis rapproché des services centraux de l'Université et plus particulièrement de Madame Céline Collet qui m'a très gentiment aidé en me fournissant les informations nécessaires et en calculant les coûts d'amortissement des différents appareils utilisés.

Le coût estimé de mon doctorat suite à la prise en compte de ces données s'élève à environ 235000 €(tableau 1). Il apparaît que ce sont les ressources humaines qui représentent la majorité des dépenses avec un coût total de 141609 euros. Le fonctionnement représente

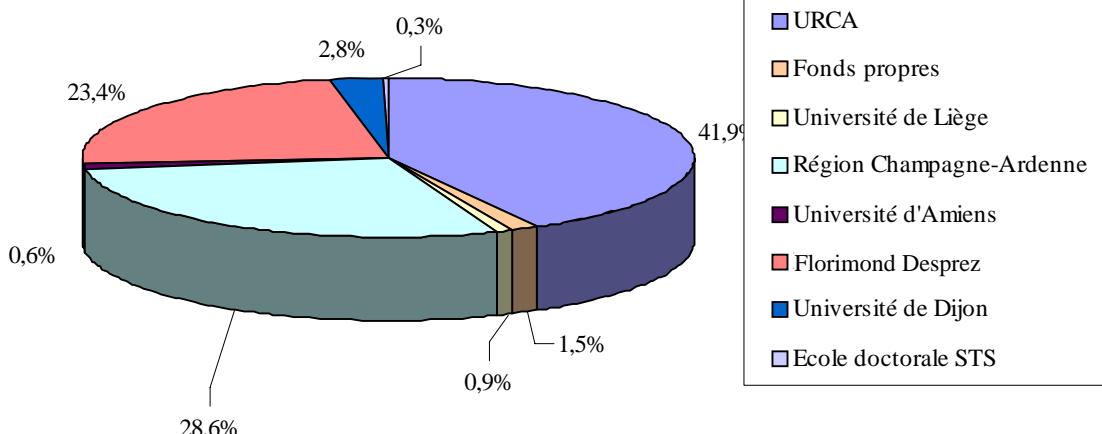
près de 89000 euros et le reste des coûts est dû à l'achat d'un ordinateur portable et aux différentes formations que j'ai suivies (et financées pour la majeure partie) durant ma thèse.

Tableau 1 : Coût total du projet - *Les coûts sont exprimés en euros.*

Ressources humaines		
Salaire du doctorant	67194	
Frais de déplacement	3931	
Encadrement	45937	
Aide d'un ingénieur d'étude	24547	141609
Infrastructure et fonctionnement		
PCR quantitative temps réel	8308	
Hottes flux laminaire	1721	
Consommables	29377	
Autoclave	431	
Chambre de culture	21822	
Serre	26437	
Bureau	173	
Manipulations Liège	625	88893
Formation		
DUOP	1384	
Achat livres	170	
Inscription université	888	
PC Portable	1000	
NCT	600	4042
TOTAL	234544	

Pour ce projet j'ai bénéficié d'une allocation régionale versée par la région Champagne-Ardenne. L'URCA et les établissements Florimond Desprez sont les 2 autres principales sources de financement. La figure 1 détaille la répartition de la charge financière.

Figure 1 : Sources de financement



8. Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles

8.1. Domaines scientifiques et techniques

Mon travail étant pluridisciplinaire, il m'a permis d'acquérir de nombreuses connaissances et techniques différentes. De formation initiale de biologie cellulaire et physiologie animales, j'ai dû m'initier et m'adapter au domaine végétal. Mon sujet m'a permis de devenir un spécialiste de l'embryogenèse pollinique. Les diverses manipulations que j'ai effectuées m'ont conduit à réaliser une synthèse bibliographique sur la chaîne de synthèse de la chlorophylle, ainsi que sur les défenses des plantes suite à un stress abiotique, me permettant ainsi d'acquérir une certaine expertise dans ces domaines.

Le fait de travailler sur la physiologie et la biologie moléculaire, m'a permis d'acquérir et de maîtriser diverses techniques tel que la culture *In Vitro*, la culture en serre, la RT-PCR, la PCR quantitative temps réel, le Northern Blot et la microscopie.

La thèse m'a appris à restituer des données sous forme de rapports, posters, exposés oraux ou encore publications scientifiques. Toutes ces formes de restitution sont finalement autant de formes de communication différentes. Il est important de savoir synthétiser et présenter ses résultats différemment selon la forme demandée et surtout de savoir répondre aux observations ou interrogations des personnes à qui nous les présentons.

Les vacations ainsi que mon poste d'ATER m'ont fait découvrir l'enseignement. Je sais à présent préparer et dispenser un cours, un TD ou un TP. Enfin, les différents stagiaires que j'ai côtoyés m'ont permis d'appréhender l'encadrement et le management de personnel.

8.2. Compétences

Le suivi de la bibliographie m'a permis de maîtriser la veille et d'établir une étude de faisabilité. J'ai également appris à gérer le temps et à tenir un planning.

Le fait de ne pas avoir de financement pour le fonctionnement de ma thèse, et donc de dépendre du financement global du laboratoire, m'a obligé à toujours évaluer les coûts des éventuelles manipulations et à être le plus économique possible.

L'élaboration de mes enseignements m'a permis d'apprendre à vulgariser mes résultats afin de les rendre plus accessibles à des non-spécialistes.

Le fait de dépendre de l'université m'a initié à la rédaction de courriers administratifs et à appréhender au mieux l'organisation pyramidale de l'administration.

Le travail en équipe m'a beaucoup appris sur la gestion et l'organisation des tâches. Il faut en effet gérer l'espace qui nous est attribué, respecter celui des autres et ne pas être égoïste. Le fait de travailler avec des stocks communs impose une certaine discipline car si un

maillon ne respecte pas les règles de travail, c'est toute l'équipe qui en pâti. Par exemple si un membre de l'équipe termine un stock ou finit un produit chimique mais ne re-commande pas pour le remplacer, on se retrouve au chômage technique. Il faut donc anticiper et prévoir ses propres manips mais également anticiper celles des autres.

La thèse est donc un projet qui nécessite une planification et une prévision rigoureuses.

8.3. Savoir-faire

J'ai appris à élaborer un plan de travail et notamment à établir et respecter un planning.

De gros soucis administratifs avec un retard de salaire de 5 mois au début de mon poste d'ATER, ainsi que la complexité du système administratif, m'ont permis d'exceller dans la rédaction de courriers et mails de réclamation. La multiplication des coups de téléphone allant presque jusqu'au "harcèlement" dans le but d'obtenir l'information recherchée est également devenue une de mes spécialités.

La langue scientifique étant l'Anglais, j'ai dû me perfectionner à ce niveau afin de pouvoir lire, comprendre mais également me faire comprendre pendant un échange avec d'autres scientifiques ou la rédaction de publications. La restitution des résultats sous ses différentes formes m'a permis d'approfondir mes connaissances des logiciels Word, Excel et Powerpoint.

J'ai également appris à réaliser une veille stratégique. En effet, dans le cadre de ma formation avec l'IPROB, j'ai réalisé une veille stratégique sur la technologie clé 111 : les outils d'aide à la créativité. Afin de mener au mieux ce travail je me suis rapproché de la Chambre de Commerce et d'Industrie de Reims et d'Epernay et plus particulièrement de Messieurs Vincent Terny et Michel Clary qui m'ont guidé et aidé dans cette tache. Suite à ce travail j'ai eu l'honneur d'avoir en charge d'organiser une conférence sur ce thème et de présenter ce projet dans le cadre du salon Innovact 2005.

9. Impacts des résultats

Suite à mon travail, le laboratoire reste à la pointe de la technique en France et augmente son expertise grâce aux publications obtenues. Il conserve également des liens privilégiés avec les différents organismes avec qui j'ai travaillé.

Les publications permettent à la région Champagne-Ardenne de justifier son implication dans le financement de la recherche. Les établissements Florimond Desprez ont

pu utiliser mes résultats avant qu'ils ne soient publiés et les partenaires académiques bénéficient des publications qui prouvent leur implication dans le travail.

Comme tout sujet de thèse, mes résultats obtenus ont fait avancer le sujet et par la même ont contribué aux avancées de la recherche.

Mes résultats n'ont pas d'impact économique pour le moment. La poursuite du sujet pourrait cependant permettre la création de nouvelles variétés cultivées et avoir un impact économique pour le monde agricole.

10. Incidences en termes d'acquisition de compétences

J'ai réalisé mon projet au sein d'un laboratoire et j'ai eu l'opportunité de travailler avec plusieurs équipes par l'intermédiaire de plusieurs collaborations. Cette expérience m'a donc permis d'appréhender le travail en équipe et de m'adapter aux infrastructures et moyens disponibles.

Mon doctorat m'a permis de gérer des stagiaires français et étrangers, de différents niveaux (BAC+3 à BAC+5), j'ai donc une première expérience d'encadrement et de management de personnel.

La thèse est un projet qu'il faut prévoir, gérer et planifier. Je pense donc avoir une certaine expertise en gestion de projet.

Les contraintes et les obligations du doctorat nous conduisent à toujours réfléchir et nous interroger sur les choix à prendre. La remise en question régulière en fonction de l'avancée des travaux m'a permis d'exploiter au mieux mes résultats.

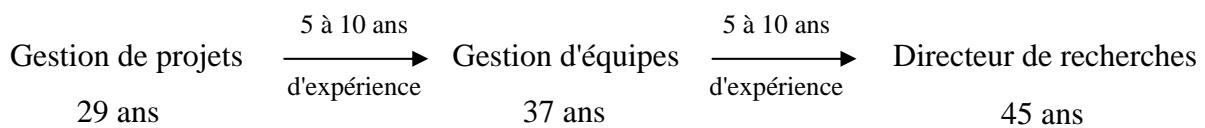
Mes capacités d'adaptation, de persévérance et de curiosité n'étaient pas toujours suffisantes pour progresser, j'ai donc acquis le goût pour le changement et la nouveauté. En effet il faut savoir tourner la page et continuer à avancer quand une partie est terminée ou ne mène à rien.

Enfin l'enseignement et les divers séminaires auxquels j'ai participé m'ont permis de mieux appréhender la prise de parole en public et de vulgariser mes expériences et résultats pour les rendre accessibles à un public non spécialiste.

11. Projets professionnels

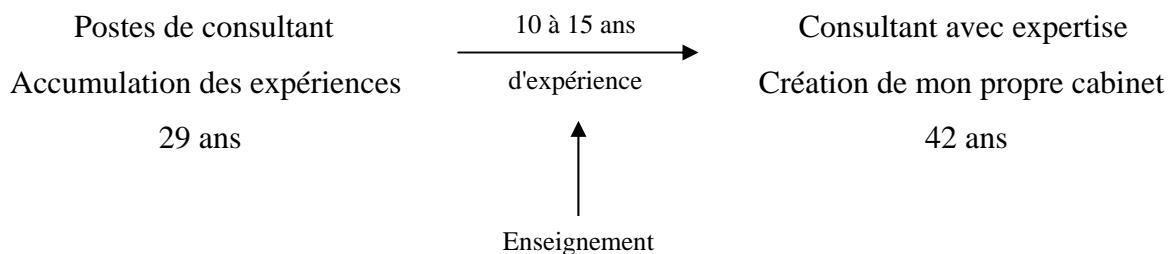
11.1. La recherche

La recherche continue de me passionner et je souhaite pouvoir continuer à l'avenir que ce soit dans le privé ou dans le public. Avec l'accumulation de l'expérience et la gestion de plusieurs projets, je pourrai manager une équipe et pourquoi pas prétendre à un poste de directeur de recherches.



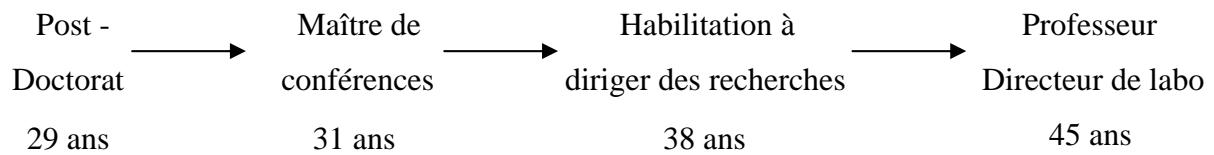
11.2. L'expertise

La thèse apporte une expertise certaine et permet de révéler nos aptitudes d'analyse et de réflexion. Je pense que mon expérience doctorale, mon aptitude à la veille et mon goût pour le changement me permettraient d'intégrer un cabinet de consultants si jamais il ne m'était pas possible de continuer la recherche. Après quelques années et plusieurs missions menées à bien, je pourrai élargir mon domaine d'expertise et peut-être même créer mon propre cabinet. Ayant une première expérience d'enseignement et qui plus aimant cela, il me serait possible d'assouvir cette passion en intervenant dans le cadre de modules professionnalisants à l'université.



11.3. L'académique

Le doctorat permet évidemment d'accéder aux postes académiques, ce qui constitue pour moi une autre possibilité. Un passage par un post-doctorat d'un ou deux ans pourrait faciliter mon recrutement à un poste de maître de conférence. L'expérience et la gestion de plusieurs projets me permettraient de soutenir mon habilitation à diriger les recherches et de conclure ma carrière par un poste de Professeur. La carrière universitaire me permettrait de m'épanouir pleinement en exerçant à la fois la recherche et l'enseignement.



En résumé, ma thèse m'a passionné et s'est déroulée dans de très bonnes conditions matérielles et relationnelles. J'espère que ce projet, que j'ai su mener à bien avec la publication de plusieurs articles internationaux, me permettra de m'épanouir pleinement par la suite et qu'il me permettra de prouver mes qualités professionnelles et humaines aux futurs recruteurs.

6.3. Publication VI

Programmed cell death and microspore embryogenesis.

Varnier AL, **Jacquard C**, Clément C (2007). In : A. Touraev, BP. Forster and S. Mohan Jain. (éds).Advances in haploid production in higher plants. Kluwer Academic Publishers. (Sous presse)

CHAPTER

PROGRAMMED CELL DEATH AND MICROSPORE EMBRYOGENESIS

A key point in the achievement of the process

A.L. VARNIER, C. JACQUARD & C. CLÉMENT

Plant Stress Defense and Reproduction, University of Reims, France

1. INTRODUCTION

Programmed cell death (PCD) is the genetically controlled cell death that consists in cell suicide. PCD was first reported in animal cells and next progressively described in plant cells during the last decade. In plants PCD is triggered under two main circumstances: (i) in response to environmental variations resulting in biotic or abiotic stresses or (ii) during developmental processes when removing useless cells is required.

Following stress such as climatic change (Chen, Yan, Jiang, & Dai, 1999), toxic compounds (Yao et al., 2001), oxidative stress (Pennel & Lamb, 1997) or pathogen attack (Hoeberichts, Ten Have, & Woltering, 2003), the plant kills a number of cells around the wounding place or pathogen penetration site, thus making a protection zone for inner tissues. During development PCD has been observed in several processes, including leaf shape modelling, disappearance of aleurone cells, removing of root cap cells or differentiation of specialized cell types such as tracheary elements (Pennel & Lamb, 1997; Jones, 2001; Kuriyama & Fukuda, 2002; Gunawardena, Greenwood, & Dengler, 2004).

Additionally, PCD is essential to ensure the achievement of sexual reproduction in angiosperms (Pennell & Lamb, 1997; Wu & Cheung, 2000). For example the process of self incompatibility is mediated through the triggering of PCD in the pollen tube by the female tissues (Jordan, Franklin, & Franklin-Tong, 2000; Rudd & Franklin-Tong, 2003). In flowers PCD mainly consists in the deletion of cells or tissues with temporary functions, including both sterile and fertile organs (Buckner, Janick-Buckner, Gray, & Johal, 1998; Xu & Hanson, 2000). In female organs, PCD occurs in restricted cells at accurate stages of development. Apart from the 3

megaspores disappearing soon after meiosis (Buckner, Janick-Buckner, Gray, & Johal, 1998), PCD was mainly identified after fertilization in respect to embryo development, i.e. the disappearance of suspensor (Pennel & Lamb, 1997), endosperm (Young & Gallie, 2000) or nucellus (Xu & Chye, 1999; Dominguez, Moreno, & Cejudo, 2001).

The situation is different in the male organs since most of the anther tissues are affected by PCD, which interacts with the process of microspore embryogenesis.

2. PCD IN THE ANTER DURING POLLEN DEVELOPMENT

2.1. In the sporophytic tissues

All the anther diploid tissues are affected by a wave of PCD. The first hallmarks are detected in the tapetum when the sporogenous cells are at the premeiosis stage (Varnier, Mazeyrat-Gourbeyre, Sangwan, & Clément, 2005). The occurrence of PCD is characterized by both the typical DNA degradation in 180 kbp fragments (or multiple) and by changes in the cytological traits of organelles, such as the invagination and the appearance of apoptotic like body from the nucleus or the alteration of mitochondria (Wang et al., 1999a; Balk & Leaver, 2001; Varnier, Mazeyrat-Gourbeyre, Sangwan, & Clément, 2005). Serine protease is a putative marker of PCD. It has been shown that its activity increased in the tapetum at precocious stages of pollen development with a maximum at the tetrad stage. Afterwards, a progressive degeneration of the tapetum takes place (Clément, Laporte, & Audran, 1998) until the final disappearance of the tapetal cell layer, more or less early during pollen development depending on the species.

The middle layers are next affected by a degeneration process that corresponds to PCD. Progressively, the nucleus gets invaginated and internal unusual vacuoles develop into mitochondria. Soon after tapetum degradation, their cytoplasm disappears and middle layers only persist by their cell wall (Varnier, Mazeyrat-Gourbeyre, Sangwan, & Clément, 2005).

The endothecium has a special function in the anther. From meiosis up to the first pollen mitosis, the endothecium is mostly devoted to reserve accumulation and mobilization. At the late vacuolated microspore stage, the metabolism of the endothecium turns to the development of cell wall thickenings that will represent the mechanical layer around the anther locule. During this latter process, all the cytological features of PCD can be detected in the cytoplasm, though the endothecium cells remain alive until the anther opening (Varnier, Mazeyrat-Gourbeyre, Sangwan, & Clément, 2005). The PCD related *ZmMADS2* transcription factor whose expression is known to be related to PCD, is strongly expressed in the endothecium at that time (Schreiber, Bantin, & Dresselhaus, 2004).

Apart from the synthesis of cell wall thickenings, the behaviour of the epidermis is the same than the endothecium regarding the timing of PCD development (Varnier, Mazeyrat-Gourbeyre, Sangwan, & Clément, 2005).

Anther dehiscence is also a consequence of PCD. The process has been extensively studied in tobacco (Sanders et al., 2005). The first signs of cell

hydrolysis in the dehiscence zone appear during late microspore vacuolation, in concomitance with PCD in the middle layers (Varnier, Mazeyrat-Gourbeyre, Sangwan, & Clément, 2005). Again, all the cytological features coincide with the PCD process. The disappearance of the affected cells creates a frailty zone between adjacent anther locules that opens under the tension provided by the mechanical layer in the endothecium. It is of interest to note that male sterile mutants and those defective in anther dehiscence have defects in the PCD process (Yang et al., 2003; Sanders, Bui, Le, & Goldberg, 2005), indicating that PCD is required for normal pollen development, anther dehiscence and release of pollen grains at flower opening (Sanders et al., 2000; Wu & Cheung, 2000).

The radial extension of PCD in the anther cell layers from the tapetum to the peripheral layers including the dehiscence zone suggests that a PCD hormonal signal is conveyed from the internal towards the peripheral cell layers (Kuriyama & Fukuda, 2002). Both jasmonic acid and ethylene may be good candidates for the spread of PCD in the anther. Using mutants of *Arabidopsis thaliana* mutants a role for jasmonic acid signaling in controlling the time of anther dehiscence was revealed (Sanders et al., 2000; Ishiguro, Kawai-Oda, Ueda, Nishida, & Okada, 2001). *Arabidopsis* mutants that are defective in either jasmonic acid biosynthesis (e.g., dde1, dde2, da1) or perception (e.g., coi1) are male sterile and have anthers that dehisce too late for successful pollination to occur (Ishiguro, Kawai-Oda, Ueda, Nishida, & Okada, 2001; Sanders, Bui, Le, & Goldberg, 2005). Other phytohormones, such as ethylene have also been shown to play a role in anther dehiscence. In *Nicotiana tabaccum* ethylene is involved in the final process of anther dehiscence and could act in synergy or in concurrence with jasmonic acid (Rieu, Wolters-Arts, Derkx, Mariani, & Weterings, 2003).

When the pollen is released, all the remaining anther sporophytic tissues disappear rapidly. It means that during the whole of its development microspore and next pollen is surrounded by cells that undergo PCD.

2.2. Gametophytic tissues

There is only poor evidence that microspore or pollen grain is affected by PCD during development. In the pollen grain *in fine*, only the sperm cells have a long term fate through fertilization and zygotic embryogenesis. In the opposite, the vegetative cell, which function is to build the pollen tube, dies soon at fertilization.

Microspores are temporarily affected by a wave of PCD-like traits during the early steps of vacuolation after meiosis. In barley microspores exhibit a positive reaction to the tunnel staining (Wang et al., 1999a). At the same moment both endonuclease gene expression and activity are stimulated (Marchetti, Zaina, Chiaba, Pappalardo, & Pitotti, 2001; Zaina, Morassutti, De Amicis, Fogher, & Marchetti, 2003), indicating that the genome undergoes some rearrangements. Most likely these features do not reflect PCD but rather chromatin remodeling, following the transition from the diploid to the haploid state. This point is a key step for the reprogramming of transcription associated with development and cell differentiation

(Farrona, Hurtado, Bowman, & Reyes, 2004). This is of importance for microspore embryogenesis because the microspore corresponds to the stage of sampling.

In the pollen grains after mitosis, the vegetative cell exhibits clear signs of PCD. During pollen maturation its nucleus progressively invaginates, leading to the appearance of some nuclear bodies that separates from the nucleus (Varnier, Mazeyrat-Gourbeyre, Sangwan, & Clément, 2005). Also, mitochondria are progressively hydrolysed as revealed by the loss of their DNA (Sato, Saito, & Handa, 2004) and the appearance of internal vacuoles (Varnier, Mazeyrat-Gourbeyre, Sangwan, & Clément, 2005). In the meantime, the presence of DNA laddering in pollen fraction is an additional argument to conclude that PCD affects the vegetative cell during pollen maturation (Varnier, Mazeyrat-Gourbeyre, Sangwan, & Clément, 2005). In the end, sperms are the sole cells in the pollen grains and in the whole anther that are not affected by PCD.

Later on, during pollen tube elongation, the expression of the *MADS box* gene indicates that PCD is still active in the pollen tube (Heuer, Lörz, & Dresselhaus, 2000), which is consistent with the fate of pollen tube elements.

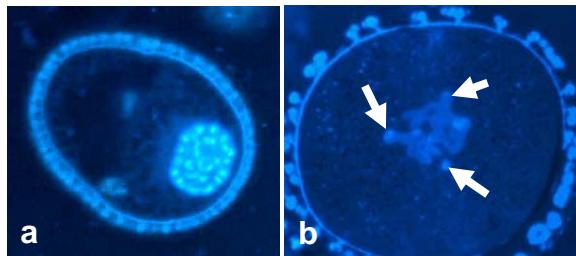


Figure 1. Nucleus feature in a young microspore (a) and in the vegetative cell (b) of a pollen grain in *Lilium*. Note the invaginations of the nucleus in the vegetative cell and the formations of apoptotic-like bodies (arrows). Hoechst 33342 staining for DNA.

3. INTERFERENCE OF PCD WITH MICROSPORE EMBRYOGENESIS

3.1. At the time of sampling

In crops, the most suitable stage of sampling for microspore embryogenesis is the uninucleate microspore. As explained just before, at that time the microspore remodels its chromatin which may be wrongly understood as PCD. After pollen mitosis, the vegetative cell of the pollen grain undergoes PCD, which may explain why it is quite impossible to get microspore embryogenesis from pollen after mitosis.

However, one should keep in mind that the microspores are surrounded by the tapetum which is fully affected by PCD at the same moment. As a consequence, some information could transit from the tapetum through the locular fluid that may influence the microspore towards a PCD process. For example, plastids begin to

degrade in the young microspores in some barley cultivars (Carreda, Doncoeur, Devaux, Sangwan, & Clément, 2000), showing that organelle degeneration is initiated as early as the young microspore stage. It means that the collected microspores for doubled haploid production are already affected by the PCD process at the time of sampling. The remaining question is then whether PCD can be reversed or not, which is indispensable for the microspore to behave like a zygote.

3.2. PCD and the reorientation of the microspore following the pre-treatment

In the last few years, the transcriptome of microspore during anther pre-treatment (Muñoz-Amatriain et al., 2006) and the first steps of embryogenesis (Maraschin et al., 2006) was analysed in details. These studies are the source of considerable information about the changes of microspore physiology related to the triggering of microspore embryogenesis.

The pre-treatment is a key step in the process of microspore embryogenesis. It consists in stressing the microspores in order to arrest their gametophytic development programme (Maraschin et al., 2006) and thus to reorient them towards a sporophytic embryo programme (Touraev et al., 1997). In barley anthers, up to 4,300 genes have their expression modified following the mannitol pre-treatment (Muñoz-Amatriain et al., 2006). The stress pre-treatment accelerates the course of PCD process in the sporophytic tissues of the anther but not in the microspores (Wang et al., 1999a; Wang, van Bergen, Lamers, Oppedijk, & Schilperoort, 1999b).

3.3. In the reoriented microspore and microspore derived multicellular structure

The competent reoriented microspores may develop into haploid embryos (Wang et al., 1999a). Within these microspores, the induction of embryogenesis by stress is marked by the upregulation of transcripts involved in several metabolic pathways including the inhibition of PCD, especially the bax inhibitor *Bi1* gene (Maraschin et al., 2006). Such a regulation is specific of embryogenic microspores and does not occur in naturally developing pollen grains. This confirms that PCD is induced in developing pollen grains and indicates that the arrest of the PCD process is necessary to the embryogenic development of the microspore.

After pre-treatment, the reoriented microspores spend a few days before entering the first symmetric division whatever they are isolated or cultivated in the anther. In rapeseed, both the transcriptome and proteome were recently analysed in details and no sign of gene expression nor proteins related to PCD were identified in the embryogenic microspores and derived structures (Joosen et al., 2007, Malik et al., 2007). It may indicate that the PCD programme that is initiated in the microspore/pollen during development under natural conditions is definitely arrested in the reoriented microspores that are willing to develop into an embryo.

Nevertheless, obtaining an embryo from a microspore derived multicellular structure further requires cell death. In barley, by combining viability studies with cell tracking, it was shown that release of embryo-like structures is preceded by a decrease in viability and next death of the cells positioned at the site of exine wall

rupture. These results indicate that a position-determined cell death process marks the transition from a multicellular structure into an embryo-like structure (Maraschin, Vennik, Lamers, Spaink, & Wang, 2005). However, it is not yet determined whether this type of cell death is programmed or not.

3.4. PCD and albinism in cereals

One specific trait of microspore embryogenesis in cereals is the appearance of albino haploid plants that cannot be used for further selection. In albino plants plastids are devoid of internal membrane and chlorophyll (Carreda, Doncoeur, Devaux, Sangwan, & Clément, 2000). This phenomenon may be linked to the precocious occurrence of PCD in the microspores. Indeed, plastids undergo degeneration during the whole of pollen development (Mogensen, 1996). In cultivars producing exclusively albino plants, plastids in the microspore lack internal membranes and are poor in DNA when compared to plastids in microspores of cultivars producing green plants (Carreda, Doncoeur, Devaux, Sangwan, & Clément, 2000). It was then suggested that the triggering of PCD in microspores occurs more or less early depending on the cultivars and affect plastids as first targets. It further means that the pre-treatment contributes to arrest PCD traits that are governed by the nucleus but not those affecting plastids.

4. CONCLUSIONS

PCD interferes with microspore embryogenesis because (i) it naturally occurs in all the tissues of the organ surrounding the microspores and (ii), microspores/pollen grains are also the site of PCD more or less early during development. PCD must then be overcome to allow the microspore to develop into an embryo. PCD may be an obstacle to microspore embryogenesis when the pre-treatment does not arrest this programme in the microspore. PCD related genes specifically expressed in embryogenic microspores such as bax inhibitor *Bi1* thus represent reliable ‘biomarkers’ (Maraschin et al. 2006) of the microspore competency to embryogenesis.

5. REFERENCES

- Balk, J., & Leaver, C. J. (2001). The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome *c* release. *The Plant Cell*, 13, 1803-1818.
- Buckner, B., Janick-Buckner, D., Gray, J., & Johal, G. S. (1998). Cell-death mechanisms in maize. *Trends in Plant Science*, 3, 218-223.
- Carreda, S., Doncoeur, C., Devaux, P., Sangwan, R. S., & Clément, C. (2000). Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Sexual Plant Reproduction*, 13, 95-104.
- Chen, H., Yan, C., Jiang, X., & Dai, Y.R. (1999). Hyperthermia-induced apoptosis and the inhibition of DNA laddering by zinc supplementation and withdrawal of calcium and magnesium in suspension culture of tobacco cells. *Cell Molecular Life Science* 55, 303-309.
- Clément, C., Laporte, P., & Audran, J. C. (1998). The loculus content and tapetum during pollen development in *Lilium*. *Sexual Plant Reproduction*, 11, 94-106.
- Dominguez, F., Moreno, J., & Cejudo, F. J. (2001). The nucellus degenerates by a process of programmed cell death during the early stages of wheat grain development. *Planta*, 213, 352-360.

PROGRAMMED CELL DEATH AND MICROSPORE EMBRYOGENESIS

7

- Farrona, S., Hurtado, L., Bowman, J. L., & Reyes, J. C. (2004). The *Arabidopsis thaliana* SNF2 homolog AtBRM controls shoot development and flowering. *Development*, 131, 4965-4975.
- Gunawardena, A. H. L. A. N., Greenwood, J. S., & Dengler, N. G. (2004). Programmed cell death remodels lace plant leaf shape during development. *The Plant Cell*, 16, 60-73.
- Heuer, S., Lörz, H., & Dresselhaus, T. (2000). The MADS box gene ZmMADS2 is specifically expressed in maize pollen and during maize pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction*, 13, 21-27.
- Hoeberichts, F. A., Ten Have, A., & Woltering, E. J. (2003). A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. *Planta*, 217, 517-522.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., & Okada, K. (2001). The *DEFECTIVE IN ANOTHER DEHISCENCE1* gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 13, 2191-2209.
- Jones, A. (2000). Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends in Plant Science*, 5, 225-230.
- Joosen, R., Cordewener, E., Supena, E. D. J., Vorst, O., Lamers, M., Maliepaard, C., Zeilmaker, T., Miki, B., America, T., Custers, J., & Boutilier, K. (2007) Combined transcriptome and proteome analysis identifies pathways and markers associated with the establishment of rapeseed microspore-derived embryo development. *Plant Physiology*, 144, 155-172.
- Jordan, N. D., Franklin, C. F. H., & Franklin-Tong, V. E. (2000). Evidence for DNA fragmentation triggered in the self-incompatibility response in pollen of *Papaver rhoeas*. *The Plant Journal* 23, 471-479.
- Heuer, S., Lörz, H., & Dresselhaus, T. (2000). The MADS box gene ZmMADS2 is specifically expressed in maize pollen and during maize pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction*, 13, 21-27.
- Kuriyama, H., & Fukuda, H. (2002). Developmental programmed cell death in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 568-573.
- Malik, M. R., Wang, F., Dirpaul, J. M., Zhou, N., Polowick, P. L., Ferrie, A. M. R., & Krochko, J. E. (2007). Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 144, 134-154.
- Maraschin, S. F., Vennik, M., Lamers, G. E. M., Herman, P., Spaink, A. H. P., & Wang, M. (2005). Time-lapse tracking of barley androgenesis reveals position-determined cell death within pro-embryos. *Planta*, 220, 531-540.
- Maraschin, S.F., Caspers, M., Potokina, E., Wülfert, F., Graner A., Spaink, H.P., & Wang, M. (2006). cDNA array analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis. *Physiologia Plantarum*, 127, 535-550.
- Marchetti, S., Zaina, G., Chiaba, C., Pappalardo, C., & Pitotti, A. (2001). Isolation and characterization of an endonuclease synthesized by barley (*Hordeum vulgare* L.) uninucleate microspores. *Planta*, 213, 199-206.
- Mogensen, H. L. (1996). The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *American Journal of Botany*, 83, 383-404.
- Muñoz-Amatriaín, M. I., Svensson J.T.2, Castillo AM1, Cistué, L., 1, Close T.J., & Valles M.P. (2006). Transcriptome analysis of barley anthers: effect of mannitol treatment on microspore embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127, 551-560.
- Pennell, R., & Lamb, C. (1997). Programmed cell death in plants. *The Plant Cell*, 9, 1157-1168.
- Rieu, I., Wolters-Arts, M., Derksen, J., Mariani, C., & Weterings, K. (2003). Ethylene regulates the timing of anther dehiscence in tobacco. *Planta*, 217, 131-137.
- Rudd, J. J., & Franklin-Tong, V. E. (2003). Signals and targets of the self-incompatibility response in pollen of *Papaver rhoeas*. *Journal of Experimental Botany*, 54, 141-148.
- Sanders, P. M., Lee, P. Y., Bieggen, C., Boone, J. D., Beals, T.P., Weiler, E.W., & Goldberg, R. B. (2000). The *Arabidopsis DELAYED DEHISCENCE1* gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *The Plant Cell*, 12, 1041-1062.
- Sanders, P. M., Bui, A. Q., Le, B. H., & Goldberg, R. B. (2005). Differentiation and degeneration of cells that play a major role in tobacco anther dehiscence. *Sexual Plant Reproduction*, 17, 219-241.
- Sato, H., Saito, C., & Handa, H. (2004). Mitochondrial DNA decreases during pollen development in rapeseed (*Brassica napus* L.), but mitochondrial linear plasmid encoded RNA polymerase persists in mature pollen. *Protoplasma*, 224, 179-185.

- Schreiber, D. N., Bantin, J., & Dresselhaus, T. (2004). The MADS box transcription factor ZmMADS2 is required for anther and pollen maturation in maize and accumulates in apoptotic bodies during anther dehiscence. *Plant Physiology*, 134, 1069-1079.
- Touraev, A., Vicente, O., & Heberle-Bors, E. (1997). Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Science*, 2, 297-302.
- Varnier, A. L., Mazeyrat-Gourbeyre, F., Sangwan, R. S., & Clément, C. (2005). Programmed cell death progressively models the development of anther sporophytic tissues from the tapetum and is triggered in the pollen grain during maturation. *Journal of Structural Biology*, 152, 118-228.
- Wang, M., Hoekstra, S., van Bergen, S., Lamers, G. E. M., Oppedijk, B. J., van der Heijden, M. W., de Priester, W., & Schilperoort, R. A. (1999a). Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant Molecular Biology*, 39, 489-501.
- Wang, M., van Bergen, S., Lamers, G. E. M., Oppedijk, B. J., & Schilperoort, R.A. (1999b). Programmed cell death during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. In C. Clément, E. Pacini & J. C. Audran (Eds.), *Anther and pollen: from biology to biotechnology* (pp 201-209). Springer Berlin, Heidelberg, Tokyo.
- Wu, H. M., & Cheung, A. Y. (2000). Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Molecular Biology*, 44, 267-281.
- Xu, F. X., & Chye, M. L. (1999). Expression of cysteine proteinase during developmental events associated with programmed cell death in brinjal. *The Plant Journal*, 17, 321-327.
- Xu, Y., & Hanson, M. R. (2000). Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in *Petunia*. *Plant Physiology*, 122, 1323-1333.
- Yao, N., Tada, Y., Park, P., Nakayashiki, H., Tosa, Y., & Mayama, S. (2001). Novel evidence for apoptotic cell response and differential signals in chromatin condensation and DNA cleavage in victorin-treated oats. *The Plant Journal*, 28, 13-26.
- Yang, S. L., Xie, L.F., Mao, H. Z., Puah, C. S., Yang, W. C., Jiang, L., Sundaresan, V., & Ye, D. (2003). *TAPETUM DETERMINANT1* is required for cell specialization in the *Arabidopsis* anther. *The Plant Cell*, 13, 2792-2804.
- Young, T. E., & Gallie, D. R. (2000). Regulation of programmed cell death in maize endosperm by abscisic acid. *Plant Molecular Biology*, 42, 397-414.
- Zaina, G., Morassutti, C., De Amicis, F., Fogher, C., & Marchetti, S. (2003). Endonuclease genes up-regulated in tissues undergoing programmed cell death are expressed during male gametogenesis in barley. *Gene*, 315, 43-50.