

## Forme d'azote à la croissance, à l'embryogenèse et à la régénération des cals de blé (*Triticum aestivum* L.)

Ito ZAIR<sup>1</sup>✧, Hassan CHLYAH<sup>1</sup> & Bouchra CHLYAH<sup>1</sup>

(Reçu le 05/01/1996 ; Accepté le 12/03/1996)

### مفعول شكل الأزوت على نمو الجساة، تكوين الجنين الجسدي و التجديد عند القمح الطري

اهتم هذا البحث باختلاف شكل الأزوت في وسط الزرع على المقدورات الجنينية لكلمات القمح الطري. لذلك غيرنا الجزيئات الأزوتية المعتادة في وسط "مراشيكي و سيكوك" بكل من نترات البوتاسيوم و نترات الصديوم لنحصل على الأزوت النتراتي أو بكل من تيوسيلفات الصديوم و كلورور الأمينيوم لنحصل على أزوت أمونياكي أو الكلوتامين و السيرين و الكازين للحصول على الأزوت العضوي. تبين أن استعمال الأزوت الأمونياكي و حده، أو العضوي و حده أو مزجهما، لا يساعد لا على نمو النديبة و لا على تكوين الجنين الجسدي على عكس ذلك، فاستعمال الأزوت النتراتي، كمصدر وحيد للأزوت حفز على تكوين الجنين الجسدي أكثر من نمو الجساة. و قد لوحظ تكوين عادي للأجنة عند خلط كل من الأزوت العضوي بالنترات. كما لوحظ أيضا تأثير واضح لشكل الأزوت على نسبة هدوجين وسط الزرع (ن.هـ. PH) : و تم الحصول على أحسن تكوين للأجنة الجسدية بين ن. هـ. 4,2 و 5,5. كما أن تشريح الجنين قبل و ضعه في وسط الزرع يخزل بشكل دال إنبات الأجنة الزيكوتية.

الكلمات المفتاحية : جساة - تكوين الجنين الجسدي - شكل الأزوت في وسط الزرع.

### Forme d'azote favorable à la croissance, à l'embryogenèse et la régénération des cals de blé (*Triticum aestivum* L.)

L'effet de la forme d'azote dans le milieu de culture (ammoniacal, nitrique, organique ou différentes combinaisons) sur les capacités embryogènes des cals de blé a été étudié. Les molécules azotées habituelles du milieu Murashige & Skoog (1962) sont remplacées par un mélange de  $\text{KNO}_3$  (30 mM) et de  $\text{NaNO}_3$  (30 mM) dans le cas de l'azote nitrique, par du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mM) additionné de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (20 mM) quand l'azote est ammoniacal ou par la glutamine (800 mg/l), la sérine (100 mg/l) et l'hydrolysate de caséine (100 mg/l) lorsque l'azote est organique. Apporté sous forme ammoniacale seule, organique seule, ou sous forme combinée, l'azote n'a favorisé ni la croissance du cal ni l'embryogenèse somatique. Par contre, l'utilisation de l'azote nitrique comme seule source d'azote a stimulé beaucoup plus l'embryogenèse somatique que la croissance du cal. Une embryogenèse somatique normale a été observée lorsque l'azote nitrique a été combiné à l'azote organique. Une influence nette de la forme de l'azote sur le pH, la salinité et la conductivité électrique du milieu de culture a été observée. La fragmentation réduit significativement la germination des embryons zygotiques mis en culture mais a peu d'influence sur l'embryogenèse somatique.

Mots clés: *Triticum aestivum*- Cal - Blé- Embryogenèse - Forme d'azote dans le milieu

### Nitrogen composition and embryogenesis in wheat callus (*Triticum aestivum* L.)

The effect of different forms of nitrogen in the culture medium (ammonia, nitrate, organic compounds or their combinations) on the embryogenic capacity of wheat callus has been studied. The nitrogen molecules of the Murashige & Skoog (1962) medium were replaced by a combination of  $\text{KNO}_3$  (30 mM) and  $\text{NaNO}_3$  (30 mM) for nitrogen in nitrate form, by  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mM) and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (20 mM) for nitrogen in ammoniacal form, or by glutamine (800 mg/l), serine (100 mg/l) and casein hydrolysate (100 mg/l) in the case of organic nitrogen. The ammoniacal form alone, organic form alone or their combination promoted neither callus growth nor somatic embryogenesis. However, the use of nitrates as the unique nitrogen source enhanced embryogenesis more than callus growth. Normal embryogenesis has been observed when nitrates were combined with organic nitrogen. A clear influence of the nitrogen form on culture medium pH, salinity and electric conductivity and consequently on the embryogenic potential of the cultures, was shown. Fragmentation of the zygotic embryo (before culture) significantly reduced zygotic germination, but had only little effect on somatic embryogenesis.

Key words : *Triticum aestivum* - Wheat- Callus - Embryogenesis - Form of nitrogen in culture medium

<sup>1</sup> Université Mohammed V-Agdal, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Laboratoire de Physiologie Végétale, Avenue Ibn Battouta, B.P. 1014, Rabat, Maroc, Fax : (212 7) 77 54 61

✧ Auteur correspondant

## INTRODUCTION

L'embryogenèse somatique *in vitro* est un outil biotechnologique très utile en amélioration génétique. En effet, lorsque l'embryogenèse est précédée d'une multiplication cellulaire callose, au sein de laquelle se produisent de nombreux changements génétiques voire chromosomiques (Sagi *et al.*, 1990), les embryons somatiques obtenus peuvent exprimer des variations somaclonales. Les variations obtenues serviraient à une sélection en vue d'améliorer l'espèce vis-à-vis d'un caractère agronomique donné. Une condition préalable à l'application de cette technique à l'agriculture est l'obtention de cals hautement embryogènes et dont les embryons ont une structure normale (proche de celle des embryons zygotiques) permettant leur développement en plantes. Or, la réalisation de telles cultures reste, entre autres, tributaire de la composition minérale, organique et hormonale du milieu de croissance.

Différents travaux de recherche ont démontré que la nature des substances azotées du milieu de culture joue un rôle déterminant dans la prolifération cellulaire (Bayley *et al.*, 1972 ; Bonner *et al.*, 1992), la croissance du cal (Chlyah *et al.*, 1982 ; He *et al.*, 1989), l'induction de l'embryogenèse somatique et la qualité des embryons somatiques formés (Stuart & Strickland, 1984 ; Stuart *et al.*, 1985).

En effet, la forme d'azote du milieu de culture peut influencer l'embryogenèse somatique ainsi que la régénération de plantes chez différentes espèces végétales (Tazawa & Reinert, 1969; Brassart *et al.*, 1978; Gamborg & Shyluk, 1970; Wetherell & Dougall, 1976). En outre, l'emploi d'une combinaison d'ions ammonium et nitrate, notamment au niveau du milieu de Murashige & Skoog (1962) avec un doublement de la quantité des macro-éléments, a donné des résultats appréciables en embryogenèse somatique (Ozias-Akins & Vasil, 1983; Carman *et al.*, 1987a; He *et al.*, 1988).

L'utilisation de différentes formes d'azote entraîne des variations de pH du milieu, variations susceptibles d'influencer l'embryogenèse somatique. Aussi, divers auteurs dont Wetherell & Dougall (1976) et Cousson *et al.* (1989; 1992) ont étudié l'effet du pH du milieu de culture sur la croissance du cal, l'embryogenèse somatique et l'orientation de l'organogénèse.

Le but du présent travail est de déterminer la forme d'azote la plus favorable à la croissance du cal, à l'embryogenèse somatique et à la régénération chez *Triticum aestivum* (Var. Tegye 32). Parallèlement, l'effet de la fragmentation de l'embryon, reconnu auparavant comme stimulateur des capacités embryogènes (Chlyah *et al.*, 1990; Zair *et al.*, 1995), sera aussi étudié en fonction de la forme de l'azote dans le milieu de culture.

## MATÉRIEL & MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

Des graines de blé tendre (var. Tegye 32) ont été fournies par le Service de Contrôle de Semences et Plants (Rabat). Le prélèvement des épis a lieu lorsque les embryons atteignent une taille comprise entre 0,8 et 1,5 mm (stades II et III selon He *et al.*, 1986). Les graines sont stérilisées par passage dans un bain d'alcool 70° (30 secondes), suivi d'un bain d'hypochlorite de calcium (7%) pendant 10 à 15 mn. Elles sont ensuite rincées quatre fois dans de l'eau distillée stérile pendant cinq minutes.

### 2. Milieux de culture

Les divers milieux employés pour l'initiation et la croissance du cal figurent dans le tableau 1. Le milieu de base utilisé (MS) est celui de Murashige & Skoog (1962). Il se compose de sels minéraux et de vitamines, additionnés de 30 g/l de saccharose, de 2,5 mg/l de 2,4D (acide 2,4 dichlorophénoxyacétique) et de 0,5 mg/l de kinétine, et solidifié par 10 g/l de gélose.

Dans les milieux modifiés, les molécules azotées habituelles de la solution des macro-éléments du milieu MS sont remplacées par l'azote sous forme de nitrate ou d'ammoniac à raison de 0,840 g par litre de milieu (Tableau 1).

Pour cela, le milieu est additionné d'un mélange de  $\text{KNO}_3$  et  $\text{NaNO}_3$  à raison de 30 mM chacun dans le cas de l'azote nitrique et de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à 20 mM chacun dans le cas de l'azote ammoniacal. À ce dernier type de milieu, le potassium est fourni par 18,8 mM/l de KCl.

L'azote organique est fourni par 800 mg/l de glutamine et 100 mg/l de sérine (Eapen & Rao, 1985) et par 100 mg/l d'hydrolysate de caséine (Carman *et al.*, 1987b). Le pH est ajusté à 5,8 avant autoclavage.

La composition des milieux utilisés pour la régénération des plantes ne diffère de celle des milieux de croissance que par la suppression du 2,4D des milieux de régénération.

**Tableau 1. Nature azotée des différents milieux**

Milieux	Molécules azotées	Quantité (g/l)
M <sub>1</sub>	Glu	0,8
	Ser	0,1
M' <sub>1</sub>	Glu	0,8
	Ser	0,1
	HC	0,1
M <sub>2</sub>	KNO <sub>3</sub>	3,03
	NaNO <sub>3</sub>	2,55
M <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	1,05
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,64
M <sub>4</sub>	KNO <sub>3</sub>	3,03
	NaNO <sub>3</sub>	2,55
	Glu	0,8
	Ser	0,1
M <sub>5</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	1,05
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,64
	Glu	0,8
	Ser	0,1
M <sub>6</sub>	KNO <sub>3</sub>	1,9
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,65
	HC	0,1
MS	KNO <sub>3</sub>	1,9
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,65
MS2X	KNO <sub>3</sub>	3,8
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	3,3

MS: Murashige & Skoog (1962)

MS2X: MS avec une quantité double de macro-éléments

### 3. Conditions de culture et expression des résultats

Les embryons sont cultivés intacts (E), ou fragmentés longitudinalement (E/2) de façon à obtenir deux moitiés égales. Plus de 300 explants (E et E/2) sont ensemencés sur chaque type de milieu. Les cultures sont soumises à l'obscurité continue à une température de 25 ± 2°C (16h) et 18 ± 2°C (8h) (Ozias-Akins & Vasil, 1983). Les pourcentages d'induction du cal et de germination zygotique sont calculés après trois semaines de culture.

Des cultures de cals de blé ont montré les plus hautes capacités embryogènes après une période d'incubation de cinq semaines (Zair *et al.*, 1995). Ainsi, des observations de croissance et

d'embryogenèse sont effectuées avec des cultures de cinq semaines. Dix répétitions sont effectuées pour chaque milieu de culture et pour chaque type d'explant. Les pesées de matière sèche sont effectuées après incubation des cals à 60 °C pendant 24 h. Les capacités embryogènes sont exprimées par le pourcentage de cal embryogène (poids du cal embryogène rapporté au poids total du cal x 100) et par le nombre d'embryons somatiques formés par explant. La séparation des cals embryogènes des non embryogènes ainsi que le dénombrement des embryons sont réalisés sous une loupe binoculaire. Le rendement en embryons représente le nombre d'embryons somatiques formés par gramme de matière fraîche. L'azote total des cals est évalué par la méthode de Kjeldahl après cinq semaines de culture.

La différenciation des embryons somatiques et la régénération de plantules sont obtenues sous un éclairage quotidien de 16 h et après transfert des cultures sur l'un des milieux suivants:

- le milieu de croissance (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>...);
- le milieu MS;
- le milieu MS2X (MS à double concentration en macro-éléments).

Ces milieux de régénération sont ceux du tableau 1 mais dépourvus tous du 2,4D.

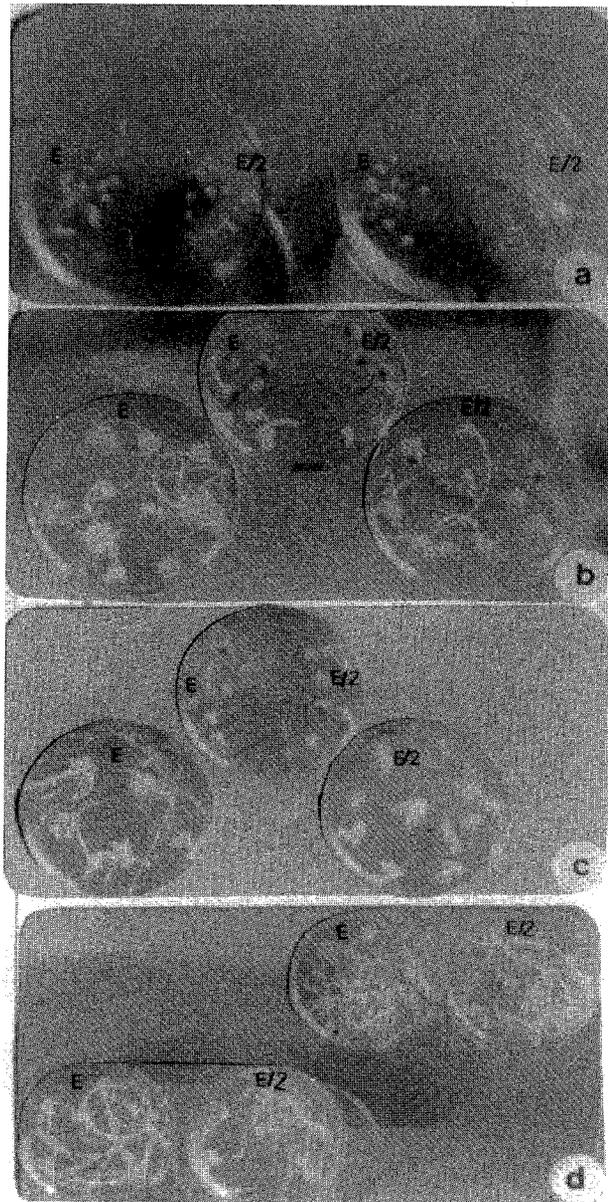
Le logiciel Statview (Brain Power Inc., 1996) a été utilisé pour le traitement statistique des données. L'analyse de la variance et les comparaisons de moyennes ont été effectuées selon les tests de Scheffe & Fisher (P ≤ 0,05).

## RÉSULTATS & DISCUSSION

### 1. Induction de la callogenèse et germination zygotique

Les embryons cultivés intacts ou fragmentés sur les milieux contenant l'ion ammonium seul (M<sub>3</sub>) (Tableau 1), ou combiné aux acides aminés (M<sub>5</sub>), n'ont montré ni germination ni callogenèse (Figure 1 a, Figure 2). Ils sont restés inertes tout au long de la période de culture. En revanche, la callogenèse est induite chez tous les explants des autres milieux, aussi bien les E que les E/2 (Figure 1 b et c) et (Figure 2A).

La germination zygotique semble également être très influencée par la nature de l'azote du milieu. Dans le cas des embryons cultivés intacts (E), la germination est de 100 % sur les milieux M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub> ne contenant que de l'azote organique (Figure 1 d),



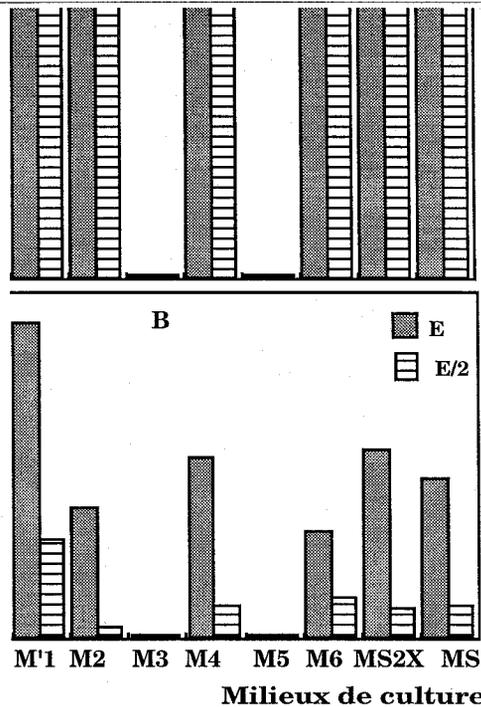
**Figure 1. Comportement des embryons intacts (E) et des moitiés d'embryons (E/2) sur milieux contenant différentes formes d'azote**

a: M5 (gauche) et M3 (droite); b: M2 (centre) et M4 (de part et d'autre); c: M6 (centre) et MS (de part et d'autre); d: M1 (haut) M'1 (bas).

Les cultures sont toutes au stade 5 semaines dans des boîtes de Pétri de 5 cm de diamètre

supérieure à 40 % sur les milieux M2, M4, MS2X et MS et de l'ordre de 30 % dans les cultures du milieu M6 (Figure 2B).

La fragmentation de l'embryon zygotique a significativement réduit la germination sur tous les milieux testés.



**Figure 2. Callogenèse (A) et germination zygotique (B) des explants E et E/2, initiés sur différentes formes d'azote**

### 2. Croissance du cal et expression de l'embryogenèse

Après 5 semaines de culture, la teneur en azote total des cals est mesurée, la croissance et l'embryogenèse sont évaluées pour chaque type de culture.

L'analyse de la variance à un facteur a montré que les différences entre traitements sont très hautement significatives pour la croissance de la matière fraîche et sèche et pour le nombre d'embryons par explant. Les milieux M4, MS2X et MS ont produit significativement plus de matières fraîches et sèches et ont formé significativement plus d'embryons et de plantules que les autres milieux.

L'azote organique (acides aminés), comme seule source azotée des milieux M1 et M'1, a permis la formation de petits cals dont le poids de matière fraîche dépasse rarement 50 mg (Figure 3); la germination zygotique aboutit à la formation de plantules dont le développement se fait au dépens des cals. Ces derniers sont en grande partie non embryogènes (Figure 4A) et les quelques embryons somatiques formés germent rapidement.

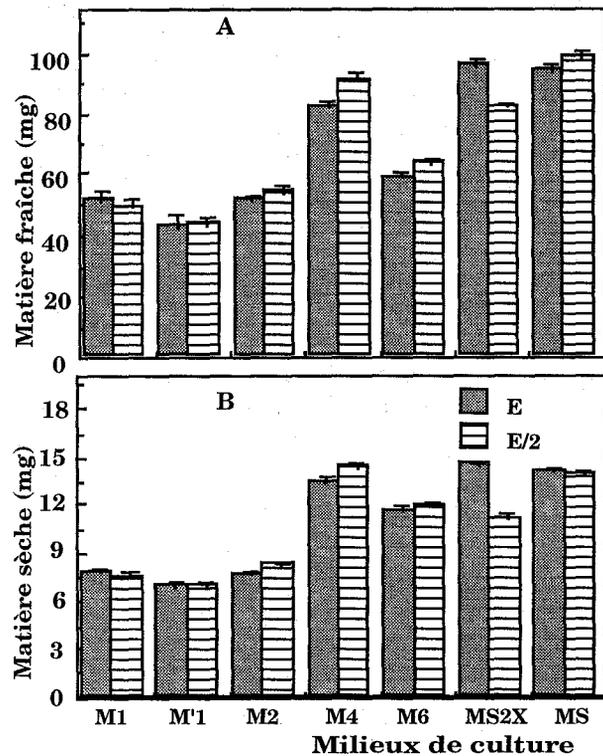


Figure 3. Croissance du cal en présence de différentes formes d'azote  
Moyenne de dix mesures ± ES

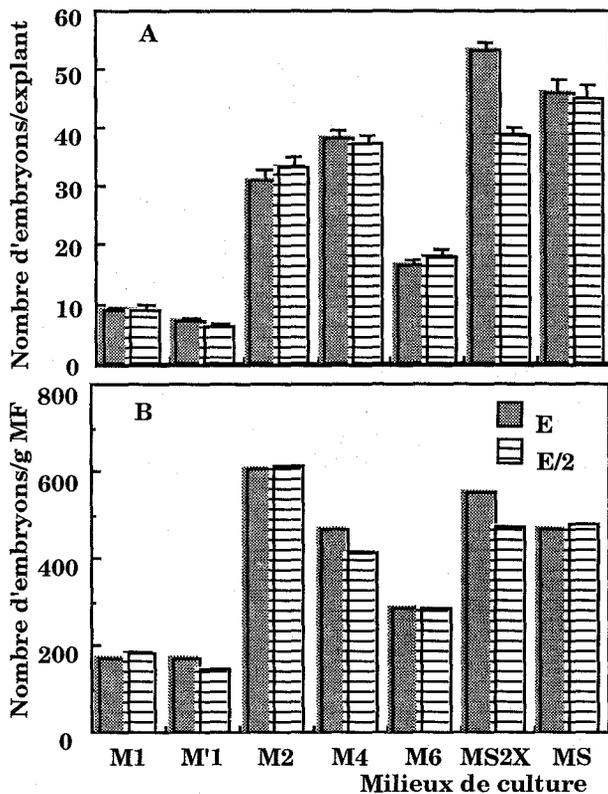


Figure 4. Capacités embryogènes des explants E et E/2, en présence des formes d'azote.  
Moyenne de dix mesures ± ES

Certaines combinaisons de glutamine, d'acide glutamique, d'alanine et d'hydrolysate de caséine ont, par contre, servi comme seule source d'azote pour donner une bonne croissance et un haut rendement en embryons somatiques chez la carotte (Wetherell & Dougall, 1976). Dans le cas d'une suspension cellulaire de *Nicotiana glauca*, la glutamine est le seul acide aminé qui a montré un effet stimulateur de la croissance. Plusieurs autres acides aminés utilisés séparément ont provoqué un effet inhibiteur général de la croissance (Bonner *et al.*, 1992).

Les cultures à azote ammoniacal seul (M<sub>3</sub>) ou combiné à l'azote organique (M<sub>5</sub>) n'ont pas formé d'embryons somatiques. Ce résultat pourrait être expliqué par une intoxication des tissus due à l'absorption de fortes doses d'azote sous forme NH<sub>3</sub> (Tableau 2).

Tableau 2. Teneur en azote en mg/g de matière sèche des cals de cinq semaines initiés sur des milieux ayant différentes sources d'azote (moyenne de trois répétitions)

Milieu de culture	M <sub>1</sub>	M'1	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>	MS2X	MS
N <sub>2</sub> (mg/g MS)	27	26,7	22,4	60,7	30,4	64,6	18,5	40,5	35,5

Il faut indiquer que la température d'incubation, choisie uniquement dans le but d'un bon déroulement de l'embryogenèse somatique, n'est probablement pas la température convenable à une nutrition à l'azote ammoniacal comme seule source d'azote.

Sachant que dans une telle solution les proportions relatives d'ammoniac NH<sub>3</sub> et d'ammonium NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dépendent de la température, du pH et de la salinité du milieu, les conditions de cultures choisies pourraient favoriser la formation d'une quantité relativement élevée de NH<sub>3</sub>, forme toxique pour les cellules végétales. Bailey *et al.* (1972) ont déjà montré que les ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup> avaient un effet négatif sur la croissance d'une suspension cellulaire de blé.

Chez d'autres espèces par contre, l'ion NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a favorisé l'embryogenèse somatique. C'est le cas de la carotte où il a pu représenter la seule source d'azote (Halperin & Wetherell, 1965; Wetherell & Dougall, 1976) et la luzerne où il a même été exigé comme seule source d'azote et à faible dose (10 à 20 mM) pour achever une embryogenèse optimale (Walker & Sato, 1981). Cependant, chez ces mêmes

espèces et chez le céleri, il a été montré que l'ammonium agit en synergie avec certains acides aminés (alanine, glutamine, arginine) pour stimuler la formation d'embryons somatiques et que la qualité de ces derniers ainsi que leur développement en plantules sont significativement améliorés par les acides aminés (Stuart & Strickland, 1984; Stuart *et al.*, 1985). Dans le même sens, Kamada & Harada (1984) ont constaté que les acides aminés pouvaient stimuler l'embryogenèse à la place de l'ammonium ou en combinaison avec celui-ci.

En revanche, les nitrates semblent être nécessaires pour la croissance et l'embryogenèse. Les cals initiés sur des milieux contenant des nitrates seuls ou combinés à une forme d'azote réduite (acides aminés ou  $\text{NH}_4$ ) sont bien développés. En outre, les cals des milieux  $\text{M}_2$  et  $\text{M}_4$  montrent tous des secteurs embryogènes et un nombre d'embryons somatiques relativement élevé (Figure 4). La croissance des matières fraîche et sèche des cultures du milieu  $\text{M}_2$  n'a pas été intense (Figure 3), mais les cals sont entièrement nodulaires et présentent un rendement en embryons somatiques qui dépasse celui des cals initiés sur MS (Figure 4B). Cependant, la maturation des embryons s'arrête souvent au stade globulaire. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Tazawa & Reinert (1969) qui ont montré que, chez la carotte, l'embryogenèse *in vitro* pouvait se faire avec les nitrates comme seule source azotée du milieu. Récemment, He *et al.* (1989) ont montré que l'azote nitrique a hautement stimulé l'induction du cal embryogène à partir de cultures d'embryons immature de blé.

En combinant les nitrates et les acides aminés ( $\text{M}_4$ ), la croissance et l'embryogenèse sont significativement augmentées par rapport au milieu  $\text{M}_2$ . Les cals sont plus embryogènes et les embryons somatiques sont plus grands et ressemblent plus aux embryons zygotiques, bien qu'ils ne soient pas plus nombreux que ceux du milieu MS. Ce mélange d'azote nitrique et d'azote organique du milieu  $\text{M}_4$  a permis une amélioration de la qualité des embryons beaucoup plus visible qu'avec le mélange nitrate-ammonium des milieux  $\text{M}_6$  et MS2X.

L'hydrolysate de caséine ( $\text{M}_6$  et  $\text{M}'_1$ ) à la concentration employée n'a pas eu d'effet stimulateur ni sur la croissance du cal, ni sur l'embryogenèse somatique (Figure 4). Le doublement des macro-éléments de MS2X a été

légèrement bénéfique aussi bien pour la croissance du cal que pour l'embryogenèse somatique des explants cultivés intacts (E). Carman *et al.* (1987a) ont déjà indiqué un effet similaire chez le blé. Concernant les explants E/2, on constate que la fragmentation de l'embryon a légèrement réduit, dans certains cas, la quantité du cal embryogène ainsi que le nombre d'embryons formés par explant. Cependant, cette différence disparaît avec une durée de culture plus longue (résultats non publiés).

L'étude de la variation du pH, de la salinité et de la conductivité électrique du milieu, observée juste après autoclavage, pourrait aider à comprendre le comportement des cultures en présence des différentes formes d'azote. Effectivement, le pH du milieu de croissance (après autoclavage et au bout de trois et cinq semaines de culture) est fonction de la nature azotée de celui-ci; il est de 6,0 à 7,2 en présence de sels d'ammonium, et varie entre 4,2 et 5,7 pour les autres formes d'azote (Tableau 3).

Le pH est étroitement lié à l'induction et la croissance du cal: à des pH supérieurs à 6, la callogenèse n'a pas eu lieu. Toutefois, le comportement embryogène des cultures ne semble pas s'expliquer par les seules variations de pH puisqu'aux mêmes valeurs de celui-ci, on obtient des tissus embryogènes sur certains milieux ( $\text{M}_2$  et  $\text{M}_4$ ) et des tissus non embryogènes sur d'autres ( $\text{M}_1$ ,  $\text{M}'_1$ ). En cultivant différents tissus de la carotte, Wetherell & Dougall (1976) ont montré que la croissance et l'embryogenèse sont fortement affectées par le pH de la culture et que l'embryogenèse présente un optimum étroit à pH 5,4. Pour Cousson & Tran Thanh Van (1981) et Cousson *et al.* (1989), le pH du milieu de culture peut modifier la perméabilité membranaire ainsi que l'équilibre ionique du milieu de culture et orienter, par conséquent, l'expression de la morphogenèse. Néanmoins, l'interprétation des effets du pH externe sur la morphogenèse reste difficile à cause de la variation de manière non contrôlée de ce paramètre durant la période de culture (Cousson *et al.*, 1992).

En outre, les composés azotés sont pris de façon à apporter la même quantité d'azote dans les milieux de cultures et constituent, certes, une source de salinité du milieu. Ces additifs ne provoquent guère une salinisation du milieu supérieure à 1 % (Tableau 3). Signalons que les cellules de cals initiés à partir de l'embryon immature de blé sont capables de proliférer à une salinité de 2% (résultats non publiés).

**Tableau 3. pH, salinité et conductivité électrique des milieux contenant différentes formes d'azote**  
 Tous les milieux sont ajustés à pH 5,8 avant l'autoclavage  
 Moyennes de six répétitions  $\pm$  l'erreur standard

Milieux de culture	pH des milieux de culture				Salinité des milieux (%) avant mise en culture*	Conductivité à 20°C ( $\mu$ S/cm) avant mise en culture*
	avant mise en culture*	1 semaine de culture	3 semaines de culture	5 semaines en culture*		
M <sub>1</sub>	4,80 $\pm$ 0,20	4,40 $\pm$ 0,16	4,48 $\pm$ 0,11	4,40 $\pm$ 0,14	0,10	403,10 $\pm$ 20,3
M' <sub>1</sub>	5,15 $\pm$ 0,23	5,88 $\pm$ 0,23	4,60 $\pm$ 0,22	4,75 $\pm$ 0,22	0,11	431,10 $\pm$ 9,80
M <sub>2</sub>	5,20 $\pm$ 0,15	5,38 $\pm$ 0,11	5,68 $\pm$ 0,19	5,70 $\pm$ 0,14	0,60	1706,2 $\pm$ 54,8
M <sub>3</sub>	6,20 $\pm$ 0,23	6,46 $\pm$ 0,20	6,16 $\pm$ 0,26	6,48 $\pm$ 0,22	0,48	1460,5 $\pm$ 66,7
M <sub>4</sub>	5,17 $\pm$ 0,18	5,13 $\pm$ 0,16	5,38 $\pm$ 0,15	5,60 $\pm$ 0,14	0,63	1872,8 $\pm$ 66,5
M <sub>5</sub>	5,92 $\pm$ 0,22	6,50 $\pm$ 0,17	6,56 $\pm$ 0,13	7,20 $\pm$ 0,20	0,50	1599,3 $\pm$ 25,3
M <sub>6</sub>	5,21 $\pm$ 0,19	4,90 $\pm$ 0,17	4,76 $\pm$ 0,08	4,70 $\pm$ 0,07	0,52	1967,3 $\pm$ 50
MS	4,94 $\pm$ 0,24	4,46 $\pm$ 0,15	4,10 $\pm$ 0,14	4,85 $\pm$ 0,12	0,54	2073,3 $\pm$ 52,5
MS2X	5,13 $\pm$ 0,18	4,80 $\pm$ 0,16	5,18 $\pm$ 0,21	5,39 $\pm$ 0,15	0,82	2804,0 $\pm$ 50,8

\*après autoclavage

De même, les milieux de culture utilisés présentent différentes conductivités électriques à 20 °C. Les milieux M<sub>1</sub> et M'<sub>1</sub>, ne contenant aucune forme d'azote minéral, ont montré des conductivités assez faibles, de l'ordre de 400 mS/cm (Tableau 3). Les conductivités des milieux M<sub>3</sub> et M<sub>5</sub> variant entre 1400 et 1600 mS/cm sont significativement plus faibles que celle du milieu M<sub>2</sub> (1700 mS/cm) sur lequel une croissance des cals et une embryogenèse ont été obtenues. On constate cependant que, dans les milieux M<sub>4</sub>, M<sub>6</sub>, MS et MS2X ayant permis de bonnes croissances et embryogenèses, les conductivités enregistrées sont supérieures à 1800 mS/cm. Ainsi, la conductivité électrique des milieux pourrait influencer le devenir embryogène des cultures mais ne serait certainement pas à l'origine du comportement inerte montré par les explants des milieux M<sub>3</sub> et M<sub>5</sub>.

### 3. Différenciation des embryons et régénération de plantules

Les cultures initiées sur l'azote organique seul (M<sub>1</sub> et M'<sub>1</sub>) forment des embryons somatiques qui, très souvent, germent précocément sans atteindre le stade plantule. Avec les nitrates comme seule source d'azote (M<sub>2</sub>), la formation de plantules n'a été observée que sur les milieux de régénération MS et MS2X et n'excède pas 20% (Tableau 4). Les cultures initiées sur M<sub>6</sub> ont régénéré des plantules mais à un pourcentage relativement faible. Celles du milieu MS2X ont également formé de nombreuses plantules sur les deux milieux de régénération utilisés.

Le milieu M<sub>4</sub> contenant des nitrates additionnés d'acides organiques a amélioré la qualité des embryons somatiques et a permis, par conséquent, d'élever le taux de régénération.

Sur tous les milieux testés, le doublement des macro-éléments du milieu de régénération a permis d'obtenir le plus grand nombre de régénérants. Les plantules formées sur le milieu MS2X sont vigoureuses et mieux enracinées que celles développées sur le milieu MS. Un résultat similaire a été auparavant signalé chez des cultures de cals de blé initiées en présence d'extraits biologiques (Zair *et al.*, 1995). Aussi, faut-il noter qu'il n'y a pas de différence nette de pourcentage de régénération entre les cultures issues d'embryons intacts et celles issues d'embryons fragmentés.

### CONCLUSION

L'azote ammoniacal comme unique source azotée du milieu, ou combiné avec les acides aminés, n'a permis ni callogenèse ni embryogenèse somatique. Les acides aminés, seuls ou remplacés par l'HC ont permis une croissance du cal et une embryogenèse assez faibles ; ils ont fortement stimulé la germination zygotique, ce qui s'est répercuté négativement sur la qualité du cal dont les embryons ont, eux aussi, germé précocément.

L'utilisation de l'ion nitrate comme seule source d'azote du milieu de culture a permis l'induction de la callogenèse chez la totalité des explants.

**Tableau 4. Évaluation de la régénération en présence de différentes formes d'azote**

Milieu de croissance	Type d'explant	Milieu de régénération	Nombre d'explants	Régénération en (%)	
M <sub>1</sub>	E	M <sub>1</sub>	90	0	
		MS	95	0	
		MS2X	100	0	
	E/2	M <sub>1</sub>	120	5	
		MS	100	1	
		MS2X	105	0	
M' <sub>1</sub>	E	M' <sub>1</sub>	105	0	
		MS	80	0	
		MS2X	80	0	
	E/2	M' <sub>1</sub>	80	0	
		MS	80	0	
		MS2X	95	1,1	
M <sub>2</sub>	E	M <sub>2</sub>	90	-	
		MS	85	8,2	
		MS2X	88	17	
	E/2	M <sub>2</sub>	90	-	
		MS	86	4,7	
		MS2X	85	15,1	
M <sub>4</sub>	E	M <sub>4</sub>	90	30	
		MS	90	40	
		MS2X	90	53,3	
	E/2	M <sub>4</sub>	85	37,8	
		MS	90	41,1	
		MS2X	90	58,9	
M <sub>6</sub>	E	M <sub>6</sub>	102	4,9	
		MS	98	26,5	
		MS2X	85	37,6	
	E/2	M <sub>6</sub>	95	7,4	
		MS	90	31,1	
		MS2X	100	42	
MS2X	E	MS	140	21,4	
		MS2X	143	51,7	
	E/2	MS	120	18,3	
		MS2X	135	33,3	
	MS	E	MS	120	60
			MS2X	120	68,3
E/2		MS	130	54,6	
		MS2X	115	74,8	

La croissance des cultures n'a pas été intensément stimulée par l'azote nitrique, mais le cal formé est nodulaire et très embryogène. Néanmoins, les

embryons formés étaient petits et mal formés. La combinaison nitrate-acides aminés a permis l'amélioration de la qualité des embryons.

Le doublement des macro-éléments du milieu de croissance a légèrement stimulé la croissance et l'embryogenèse des cultures issues d'embryons intacts (E). Au niveau de la régénération des plantules, ce même milieu, sans 2,4D, a été le plus efficace en favorisant l'obtention de pourcentages de régénération élevés pour tous les milieux initiaux testés.

Il faut également signaler que la meilleure embryogenèse a été obtenue sur des milieux à pH variant entre 4.8 et 5.5, une salinité de 0,5 à 1 ‰ et une conductivité électrique de 1800 à 2800 mS/cm correspondant à des milieux contenant à la fois des nitrates et une forme d'azote réduite (acides aminés ou  $\text{NH}_4^+$ ).

## RÉFÉRENCES CITÉES

- Bayley J.M., King J. & Gamborg O.L. (1972) The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures. *Planta* 105: 15-24
- Bonner C.A., Rodrigues, A.M., Miller J.A. & Jensen R.A. (1992) Amino acids are general growth inhibitors of *Nicotiana glauca*. *Physiologia plant.* 84: 319-328
- Brassart C., Dubois J. & Bouriquet R. (1978) Nutrition azotée d'une suspension cellulaire de silène (*Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause). *C. R. Acad. Sci.* (série D) Paris, 278: 1373-1376
- Carman J.G., Jefferson N.E. & William F. (1987a) Induction of an embryogenic *Triticum aestivum* callus. I- Quantification of genotype and culture medium effects. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 10: 101-113
- Carman J.G., Jefferson N.E. & William F. (1987b) Induction of embryogenic *Triticum aestivum* callus. II-Quantification of organic addenda and other culture variable effects. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 10: 115-128
- Chlyah H., Zair I. & Chlyah B. (1982) *In vitro* induction of cell division in the epidermis of stem segments of *Torenia fournieri* Lind. *Planta* 155: 516-520
- Chlyah H., Karim R., Hsaïne M. & Chlyah A. (1990) Improvement of somatic embryogenesis in wheat by segmentation of cultured embryos. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* Vol. 13 Wheat (ed by Y.P.S. Bajaj) Springer-Verlag, Heidelberg, p. 88-97
- Cousson A. & Tran Thanh K. (1981) *In vitro* control of de novo flower differentiation from tobacco thin cell layers cultured on a liquid medium. *Physiol. Plant.* 51: 77-84
- Cousson A., Toubart P. & Tran Thanh K. (1989) Control of morphogenesis pathways in thin cell layers of tobacco by pH. *Can. J. Bot.* 67: 650-654
- Cousson A., Tran K.T.V. & Trinh T.H. (1992) Changes with time in the  $\text{H}^+$  concentration of the culture medium influences morphogenesis in tobacco thin cell layers. *Physiologia Plant.* 85: 102-110
- Eapen S. & Rao P. S. (1985) Factors controlling callus initiation, growth and plant regeneration in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Proc. Indian Acad. Sci. Plant Sci.* 94 : 33-40
- Gamborg O. L. & Shyluk J.P. (1970) The culture of plant cell with ammonium salts as the sole nitrogen source. *Plant physiol.* 45: 598-600
- Halperin W. & D. F.Wetherell (1965) Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*. *Nature* 205: 519-520
- He D.G., Tanner G. & Scott K.J. (1986) Somatic embryogenesis and morphogenesis in callus derived from the epiblast of immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci.* 45: 119-124
- He D.G., Yang Y.M. & Scott K.J. (1988) A comparison of epiblast callus and scutellum callus induction in wheat: the effect of embryo age, genotype and medium. *Plant Sci.* (Limerick, Ire), 57: 225-233
- He D.G., Yang Y.M. & Scott K.J. (1989) The effect of macroelements in the induction of the embryogenic callus from immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Plant Science* 44: 251-258
- Kamada H. & Harada H. (1984) Studies on nitrogen metabolism during somatic embryogenesis in carrot. I. utilisation of -Alanine as a nitrogen source. *Plant Sci. Lett.* 33: 7-13
- Murashige T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-487
- Ozias-Akins P. & Vasil I.K. (1983) Improved efficiency and normalization of somatic embryogenesis in *Triticum aestivum* L. *Protoplasma.* 117: 40-44

Sagi F., Beke B. & Sagi L. (1990) Somaclonal variation in Durum wheat (*Triticum durum* Desf.). Dans: *Plant Biotechnology in Agriculture and Forestry* Vol 13, 'Wheat' (edited by Y.P.S. Bajaj). Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 594-510

Stuart D.A. & Stickland S.G. (1984) Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L II. The interaction of amino acids with ammonium. *Plant Sci. Lett.* 34 :175

Stuart D.A., Nelson J., Stickland S.G. & Walker K. A. (1985) Physiology of the development of somatic embryos in cell cultures of alfalfa and celery. *Biotechnology in Plant Science* 35-47

Tazawa M. & Reinert J. (1969) Extracellular and intracellular chemical environments in relation to embryogenesis *in vitro*. *Protoplasma* 68: 157-173

Walker K. A. & Sato S. J. (1981) Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa* : The role of ammonium on somatic embryogenesis. *Plant Tissue Cell Organ Culture* 1: 109-121

Wetherell D. F. & Dougall D.K. (1976) Source of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiol. Plant.* 37: 97-103

Zair I., Chlyah B. & Chlyah H. (1995) Effet de deux extraits biologiques sur l'embryogenèse somatique et sur la rétention des capacités de régénération. *Can. J. Bot.* 73: 498-504