

Effet du nitrate d'argent sur les potentialités embryogènes des cals issus des embryons immatures de 17 cultivars de blé (*Triticum aestivum* L. et *Triticum durum* L.)

Fatima J'AITI¹, Ouafae BENLHABIB² & Ismaïl EL HADRAMI¹

(Reçu le 21/03/1996; Accepté le 04/06/1996)

مفعول النترات الفضي على الإمكانات الجنينية للجسات المتحدرة من الأجنة الغير الناضجة ل 17 نوعا من القمح

إن دمج النترات الفضي (5mg/l) في وسط زرع الأجنة النباتية الغير الناضجة ل 17 نوعا من القمح (ترتيكوم ايستسفوم.ل. و ترتيكوم دوروم.ل.) قد حسن بشكل مهم نسب الجسات الجنينية و تجدد الجساء. كما تضاعف إنتاج الجسات الجنينية ثلاث مرات بالنسبة لنوع (كوكوري) بوجود النترات الفضي. و قد كان كذلك تجدد الزرع من خلال الجسات المدرية أمام 3AgNO₃ مهم، 7 مرات بالنسبة للنوع (1765). و قد بين هذا التجدد، مع ذلك، اختلافات مهمة حسب الأنواع المجرية. و كما ساعدت دراسة استجابة الأجنة الغير الناضجة في الأنبوب على تمييز ثلاثة نماذج من الجسات بعد أربعة أسابيع من زرعها في الوسط. و بوضعها في وسط التخلق، نجد على أن نوعا واحدا لم يجدد سوى الجذور بينما النوعين الآخرين جددوا السيقان و الجذور.

الكلمات المفتاحية : قمح - أجنة غير ناضجة - زرع الأنسجة - النترات الفضي.

Effet du nitrate d'argent sur les potentialités embryogènes des cals issus des embryons immatures de 17 cultivars de blé (*Triticum aestivum* L. et *Triticum durum* L.)

L'incorporation du nitrate d'argent (5mg/l) dans le milieu de culture des embryons zygotiques immatures de 17 cultivars de blé (*Triticum durum* L. et *T. aestivum* L.), a amélioré significativement les pourcentages d'induction de cals embryogènes et de régénération de plantules par cal. Le rendement en cals embryogènes a été multiplié par trois pour le cultivar «Cocorit» en présence de nitrate d'argent. La régénération de plantes à partir des cals initiés en présence d'AgNO₃ a été également 7 fois plus importante pour le cultivar «1765». Cette régénération a, néanmoins, montré des variations importantes selon les génotypes testés. L'étude de la réponse *in vitro* des embryons immatures après quatre semaines de culture dans le milieu d'induction a permis de distinguer trois types de cals. Placés dans le milieu de différenciation, un type n'a régénéré que des racines alors que les deux autres ont régénéré des tiges et des racines.

Mots clés : Blé - Embryogénèse somatique - Culture de tissus - Nitrate d'argent

Effect of silver nitrate on embryogenic potential of immature embryos of 17 wheat cultivars (*Triticum aestivum* L. and *T. durum* L.)

The incorporation of silver nitrate at 5mg/l in the culture medium of immature embryos of 17 wheat cultivars (*Triticum durum* L. and *T. aestivum* L.) has significantly improved the percentage of embryogenic calli and the number of plants regenerated per callus. Embryogenic callus frequency was enhanced 3 fold in «Cocorit» cultivar when AgNO₃ was used. Plant regeneration was also 7 times higher in «1765» cultivar when callus was initiated on AgNO₃ medium. Genotypic effect was significant on shoot formation. After 4 weeks of culture three types of callus were distinguished. Two types of callus were able to regenerate plants on the regeneration medium while the soft callus only forms roots.

Key words : Wheat -Somatic embryogenesis - Tissue culture - Silver nitrate

¹ Laboratoire de Physiologie Végétale, Département de Biologie, Faculté des Sciences-Semlalia. B.P. S 15 Marrakech, Maroc

² Laboratoire de Biotechnologie Végétale, Département d'Agronomie et d'Amélioration des Plantes, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, B.P. 6202-Instituts, 10101 Rabat, Maroc

✧ Auteur correspondant

INTRODUCTION

L'embryon zygotique immature est constitué de tissus qui possèdent une bonne aptitude morphogénétique. Son utilisation en tant qu'explant a permis l'application de la technique de culture de tissus chez des espèces récalcitrantes à la régénération *in vitro*. Tel est le cas de nombreuses céréales (Bhaskaran & Smith, 1990). La culture d'embryons immatures de blé peut contribuer efficacement aux programmes de sélection classiques.

Les travaux de recherche entrepris visent essentiellement le perfectionnement et la maîtrise du développement embryogénique, l'induction des cals et la régénération des plantes (Redway *et al.*, 1990). Parmi les nombreux paramètres physiologiques impliqués dans la réponse des tissus *in vitro*, l'éthylène est connu pour ses effets variables sur la culture des tissus.

Chez *Helianthus annuus*, l'éthylène favorise la formation de cals, mais inhibe la régénération de plantes (Robinson & Adams, 1987). Une production considérable de l'éthylène chez certains cultivars de riz a été également associée à une croissance limitée et une nécrose des cals (Adkins *et al.*, 1990).

Chez *Hevea brasiliensis*, le brunissement des cals et, par conséquent, la diminution du potentiel embryogène des tissus ont été, en partie, expliqués par les teneurs élevées en éthylène (Housti *et al.*, 1992).

L'effet «néfaste» de l'éthylène peut être contrecarré par l'inhibition de sa synthèse (Songstad *et al.*, 1988) ou par l'inhibition de son activité par le nitrate d'argent (Vain *et al.*, 1989). Ce dernier, incorporé dans le milieu de culture, a souvent un effet bénéfique sur la croissance des végétaux.

L'AgNO₃ favorise, en effet, la régénération de plantes à partir de cals de *Zea mays* (Vain *et al.*, 1989) et de *Triticum aestivum* (Purnhauser *et al.*, 1987). Il permet aussi l'amélioration de la réponse androgénétique chez *Brassica oleracea var. gemmifera* (Biddington *et al.*, 1988).

Pour lever, et ce même partiellement, le caractère récalcitrant de certains cultivars de blé vis-à-vis de l'embryogenèse somatique, de nombreux facteurs

ont été étudiés. Ici, l'effet du nitrate d'argent à 5 mg/l dans le milieu d'induction sur la régénération de plantes, à partir d'embryons zygotiques immatures chez certains cultivars de blés dur et tendre, dont quelques uns sont totalement récalcitrants, est présenté.

MATÉRIEL & MÉTHODES

Dix-sept cultivars dont 12 de blé dur et 5 de blé tendre ont été utilisés dans cet essai. Les embryons ont été prélevés sur des épis encore verts, 21 jours après l'anthèse, à la fin du stade laiteux et au début du stade pâteux. Les graines immatures, débarrassées de leurs glumes et glumelles, ont été désinfectées par trempage d'abord pendant quelques secondes dans l'éthanol 70°, puis pendant 20 min dans une solution d'hypochlorite de sodium à 6° et enfin rincées à l'eau distillée stérile.

Les embryons pourvus de leur scutellum ont été ensuite extraits, puis mis en culture. Le milieu d'induction de cals est celui de Murashige & Skoog (1962) (MS) auquel ont été ajoutés le saccharose à 30 g/l, l'hydrolysate de caséine à 100 mg/l, la glutamine à 500 mg/l et l'agar à 8 g/l. L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) a été additionné à 2mg/l et l'AgNO₃ à 0 ou 5 mg/l. Les cultures ont été incubées dans une chambre de culture où la température est de 25 ± 2 °C et la photopériode de 16 heures.

Les cals produits ont été transférés dans le même milieu d'initiation dépourvu d'AgNO₃ et ne contenant que 0,5 mg/l de 2,4-D. Pour la régénération des plantes, le milieu MS sans hormones a été employé. Le test d'indépendance X² de Pearson a été adopté pour la comparaison entre les différents traitements. Les pourcentages ont subi une transformation angulaire au préalable.

RÉSULTATS

La réponse des embryons zygotiques à la culture *in vitro* a été évaluée au bout de quatre semaines. L'ensemble des embryons ont formé des cals sur le premier milieu d'induction. Trois types de cals ont été identifiés :

- un premier à apparence amorphe et vitrifiée,
- un second à croissance nodulaire,
- un troisième présentant des structures chlorophylliennes.

Ces deux derniers cals dits régénérants, placés sur milieu de différenciation, ont été les seuls à pouvoir régénérer des plantes vertes. En revanche, les cals amorphes n'ont formé que des racines.

Quelques embryons ont germé dès la première ou la deuxième semaine de culture. Ces germinations précoces des embryons zygotiques ont été écartées avant le repiquage sur le milieu de croissance.

Une variabilité importante de la capacité de régénération a été notée entre les différents génotypes testés. Le test de X² a révélé un effet génotypique hautement significatif.

En effet, chez le blé dur le pourcentage de cals embryogènes a varié entre 36,8% chez «Sabil-1» et 100% chez «Anouar» (Figure 1). Quant au pourcentage de régénération, il s'est situé entre 3,6% chez les cultivars «Jawhar» et 55,6% chez les cultivars «Belbachir» (Figure 2).

Chez le blé tendre, le pourcentage de cals embryogènes a varié entre 63,9 et 80,8% (Figure 3).

La plus faible valeur reste celle du cultivar «Acsad 59». Pour le pourcentage de régénération, il varie entre 25% chez «Jouda» et 55,6% chez «Acsad 59» (Figure 4).

L'addition d'AgNO₃ au milieu d'induction s'est avérée favorable. En effet, les résultats indiquent bien que le pourcentage de cals embryogènes (Figures 1 & 3) est plus élevé sur le milieu contenant 5 mg/l d'AgNO₃.

Les cals initiés en présence de nitrate d'argent semblent montrer également des capacités de régénération beaucoup plus élevées que ceux obtenus sur le milieu dépourvu d'AgNO₃ (Figures 2 & 4).

Ainsi, chez le blé dur, deux cultivars «Jawhar» et «Cocorit» classés récalcitrants sur le milieu témoin (dont les cals initiés sur milieu sans AgNO₃ n'ont formé aucune plante verte) ont pu régénérer des plantes vertes en présence de cet inhibiteur de l'action de l'éthylène.

% de cals embryogènes

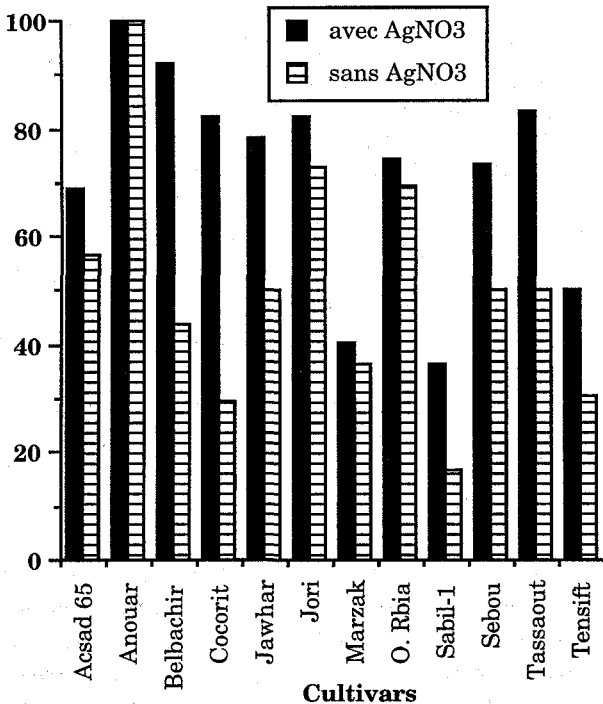


Figure 1. Effet de l'AgNO₃ sur le pourcentage de cals embryogènes chez le blé dur

% de régénération

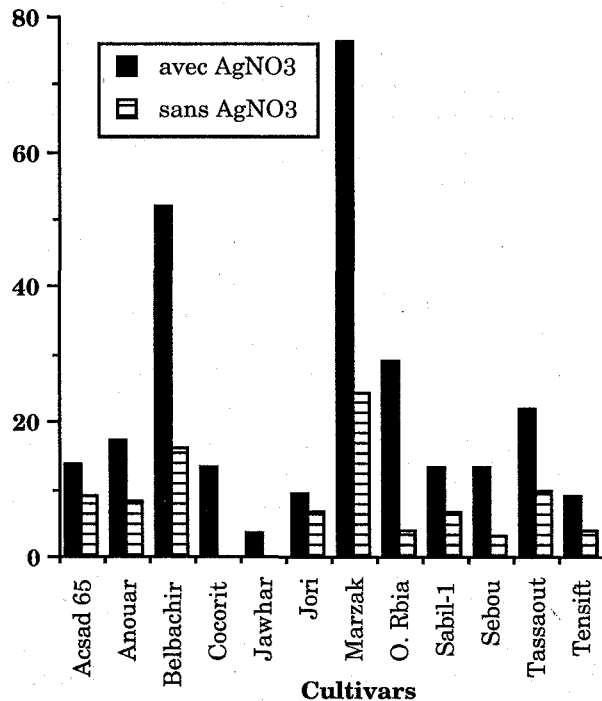


Figure 2. Effet de l'AgNO₃ sur la régénération chez le blé dur

% de cals embryogènes

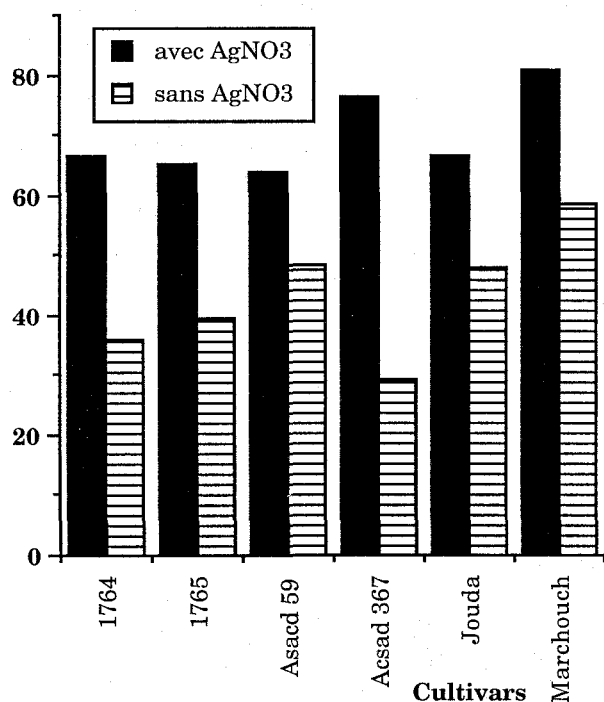


Figure 3. Effet de l'AgNO₃ sur le pourcentage de cals embryogènes chez le blé tendre

% de régénération

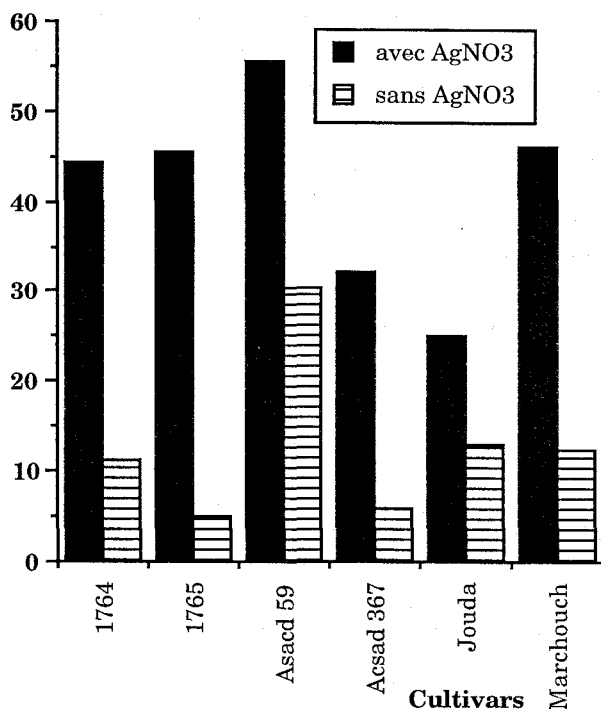


Figure 4. Effet de l'AgNO₃ sur la régénération chez le blé tendre

DISCUSSION & CONCLUSIONS

L'étude de la réponse des embryons zygotiques immatures a permis de distinguer 3 types de cals. Les cals nodulaires et les cals présentant des structures chlorophylliennes ont régénéré des tiges et des racines.

Les cals amorphes vitrifiés n'ont régénéré que des racines. Ce résultat est en accord avec les travaux de Felfoldi & Purnhauser (1992) sur des embryons immatures de blé tendre et ceux de Fernandez (1994) sur des embryons immatures de blé dur.

Les structures chlorophylliennes observées se séparent facilement du cal donneur. Il s'agit de germination précoce d'embryons somatiques. Ce résultat concorde avec celui de Felfoldi & Purnhauser (1992).

À l'opposé, les structures chlorophylliennes décrites par Fernandez (1994) ont été identifiées histologiquement comme étant des néoformations de tiges.

L'influence génotypique sur le pourcentage d'induction des cals embryogènes a été rapportée par plusieurs auteurs (Carman *et al.*, 1987 ; Gu *et al.*, 1990). Les génotypes qu'on a testé ont également montré des différences à la fois dans la fréquence d'induction des cals régénérants et dans le pourcentage de régénération de plantes.

Cette variation de la compétence des embryons immatures à former des cals régénérants serait due à des différences dans la teneur endogène initiale dans l'explant en régulateurs de croissance notamment les auxines et les cytokinines (Carman *et al.*, 1987). Elle peut être également due à l'existence d'une sensibilité à ces hormones à un stade précis de la croissance de la culture (Songstad *et al.*, 1989).

D'autre part, Sears & Deckard (1982) ont suggéré l'existence de différences génotypiques dans le métabolisme de 2,4-D. De même, Bristol *et al.* (1977) ont trouvé que les suspensions cellulaires du blé métabolisent rapidement le 2,4-D à travers une hydroxylation suivie d'une conjugaison soit avec les sucres donnant, dans ce cas, un produit ne

présentant aucune activité auxinique, soit avec les acides aminés auquel cas le produit montre une activité auxinique élevée.

L'ion Ag⁺ est connu pour son inhibition de l'action de l'éthylène produit par les cellules végétales. Plusieurs travaux ont montré l'effet dépressif de cette hormone dans la croissance et le développement des plantes *in vitro* et dans la régénération en culture des tissus (Purnhauser *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 1990).

Il est généralement connu que le stress, provoqué par la culture de tissus *in vitro*, induit la synthèse de l'éthylène. L'addition de l'AgNO₃ a permis la régénération de plantes à partir de cultivars récalcitrants. Ceci laisse supposer que ces variétés pourraient soit avoir une synthèse beaucoup plus importante de l'éthylène endogène, soit être plus sensibles à son action.

Roustain *et al.* (1993) ont étudié l'effet de l'éthylène sur l'embryogenèse somatique de la carotte en analysant son interaction avec les polyamines, substances impliquées dans le processus de différenciation.

En effet, il est reconnu que les polyamines ont souvent des actions antagonistes chez les plantes. Ces auteurs ont démontré que l'éthylène affecte la synthèse des polyamines. Par contre, l'inhibition de sa production favorise l'accumulation de la putrescine, la spermidine et la spermine dans les cellules de la carotte.

Les résultats obtenus mettent en évidence l'importance que peut constituer la régulation de la synthèse et de l'action de l'éthylène dans la réponse génotypique à l'embryogenèse somatique chez le blé. Des études plus approfondies dans ce sens peuvent constituer une voie prometteuse pour l'amélioration de cette réponse.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par l'USAID dans le cadre d'un Programme de Coopération Science et Technologie entre Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II et Purdue University, Budget N° HRN-5600-G-00-2032-0 et dans le cadre du Fonds Francophone de la Recherche « Jeune Équipe de Recherche associé à l'AUPELF-UREF, JER n° 3008 ».

RÉFÉRENCES CITÉES

- Adkins S.W., Shiraishik T. & Mc Comb J.A. (1990) Rice callus physiology: identification of volatile emissions and their effects on culture growth. *Physiol. Plant.* 78 : 526-531
- Bhaskaran S. & Smith R.H. (1990) Regeneration in cereal tissue culture. *Crop Sci.* 30 : 1328-1336
- Biddington N.L., Sutherland R.A. & Robinson H.T. (1988) Silver nitrate increases embryo-production in anther culture of Brussels sprouts. *Ann. Bot.* 62 : 181-186
- Bristol D.W., Ghanuni A.M. & Oleson A.F. (1977) Metabolism of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid by wheat cell suspension cultures. *J. Agric. Food. Chem.* 25 : 1308-1314
- Carman J.G., Jefferson N.E. & Campbell W. (1987b) Induction of embryogenie *Triticum aestivum* L. calli. II. Quantification of organic addenda and other culture variable effects. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 10 : 115-128
- Felfoldi K. & Purnhauser L. (1992) Induction of regenerating callus cultures from immature embryos of 44 wheat and 3 triticale cultivars. *Cer. Res. Com.* 20 : 3-4
- Fernandez S. (1994) Culture d'embryons zygotiques immatures de blé dur (*Triticum durum* L.): Régénération par organogenèse et par embryogenèse somatique. D.E.A en biotechnologie et Amélioration des Plantes. Université de Montpellier II, France
- Gu D.F., Wu X.K., Zhang Y.Z. & Zhang W.A. (1990) Factors affecting callus induction and plantlet regeneration in *in vitro* culture of immature barley embryos. *J. Jilin Agric. Univ.* 12 : 1-6
- Housti F., Coupé M. & d'Auzac J. (1992) Effect of ethylene on enzymatic activities involved in browning of *Hevea brasiliensis* callus. *Physiol. Planta* 86 : 445-450
- Murashigie T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-479
- Purnhauser L., Medgyesy P., Czako M., Dix P.J. & Marton I. (1987) Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃. *Plant Cell. Rep.* 6 : 1-4
- Redway F.A., Vasil V., Lu D. & Vasil I.K. (1990) Identification of callus types for long term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 79 : 609-617

- Robinson K.E. P. & Adams D.O. (1987) The role of ethylene in the regeneration of *Helianthus annuus* (sunflower) plants from callus. *Physiol Plant.* 71: 151-156
- Roustain J.P., Latche A. & Fallot J. (1993) Role de l'éthylène et des polyamines dans le contrôle de l'embryogenèse somatique de la carotte. XII colloque de la Section Française de l'IAPTC. Montpellier-16-17 novembre
- Sears R.G. & Deckard E.L. (1982) Tissue culture variability in wheat: Callus induction and plant regeneration. *Crop Sci.* 27 : 588-593
- Songstad D.D., Duncan D.K. & Widholm J.M. (1988) Effect of L-aminocyclopropane-1 carboxylic acid, silver nitrate and norbornadiene on plant regeneration. *Plant Cell Rep.* 7 : 263-265
- Songstad D.D., Petracek P.D., Sams C.F. & Conger B.V. (1989) Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and aminoethoxyvinylglycine on ethylene emanation and somatic embryogenesis from Orchardgrass leaf cultures. *Plant Cell Rep.* 7 : 677-679
- Vain P., Yean H. & Flament P. (1989) Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays L.* by AgNO₃. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 18 : 143-151
- Williams J., Pink D.A.C. & Biddington N.L. (1990) Effect of silver nitrate on long-term culture and regeneration of callus from *Brassica oleracea var. gemmifera*. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 21 : 61-6