

L'AIA-oxydase : régulateur et marqueur potentiel de l'embryogenèse somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)

Mounir El Bellaj, Samir El Jaafari, Ismaïl El Hadrami

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) présente un intérêt socio-économique et écologique important dans les zones sahariennes et sub-sahariennes. Actuellement, le dattier se trouve confronté au Maroc à de nombreux problèmes : la sécheresse, l'ensablement, l'inadéquation des techniques culturales et le vieillissement des palmeraies. Certaines maladies (particulièrement le bayoud) ont abaissé, en un siècle, le patrimoine phœnicole marocain de 15 à 4,25 millions de pieds. Devant cette situation alarmante, un plan de reconstitution des palmeraies avec repeuplement par des cultivars de bonne qualité dattière et résistants aux maladies et stress s'impose.

L'amélioration et la propagation du palmier dattier présentent des difficultés particulières liées au caractère dioïque et au faible taux de propagation végétative de l'espèce. De nouvelles technologies (fusion de protoplastes, transformation génétique) devraient être utilisées, mais elles nécessitent la mise au point de protocoles reproductibles de régénération *in*

vitro pour augmenter le taux de multiplication et permettre une diffusion rapide des hybrides ou clones sélectionnés. L'embryogenèse somatique apparaît à cet égard comme intéressante et économique pour la multiplication des cultivars sélectionnés. Chez le dattier, elle est limitée par de nombreux facteurs : lenteur dans la réactivité des explants (1 à 2 ans pour obtenir des embryons), coefficients de multiplication faibles, aléatoires ou nuls chez certains cultivars et brunissement des tissus et des milieux de culture. La maîtrise de l'embryogenèse somatique repose sur le contrôle de la balance hormonale (en particulier des auxines). Chez de nombreuses espèces, l'induction des capacités embryogènes se fait en passant par une phase de callogenèse favorisée par l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4 D), qui doit ensuite être éliminé pour obtenir le développement embryogène [1]. Chez le géranium [2], les auxines sont inhibitrices de l'embryogenèse qui se fait chez l'igname sur un milieu sans auxine [3]. Chez le palmier à huile, l'élimination du 2,4 D lors du passage du milieu de callogenèse à celui de l'embryogenèse est déterminant pour la production d'embryons [4], avec diminution de l'acide indole acétique (AIA) endogène [5].

L'AIA-oxydase (enzyme impliquée dans la dégradation de l'AIA) joue un rôle important dans le métabolisme des plantes et peut affecter la différenciation cellulaire en modulant les concentrations en AIA endogène et en catalysant l'incorporation des composés phénoliques dans les parois cellu-

lares [6]. Chez la luzerne, l'activité de l'AIA-oxydase ionique est reliée positivement à l'induction de l'embryogenèse somatique [7].

Chez le palmier dattier, l'acquisition des compétences embryogènes est accompagnée non seulement d'une augmentation des activités peroxydasiques mais aussi de la synthèse et/ou la régulation de ses isoformes spécifiques [8, 9]. Cette note vise à rechercher le rôle de l'AIA-oxydase dans le processus d'embryogenèse somatique chez *Phoenix dactylifera*.

Matériel et méthodes

Des cœurs de rejets du dattier sont préalablement désinfectés dans une solution de Désogerme 2 % pendant 20 min, puis rincés trois fois à l'eau distillée stérile. Ils sont par la suite trempés pendant 20 min dans une solution d'hypochlorite (12°) additionnée de permanganate de potassium (300 mg.l⁻¹) sous vide avant d'être lavés trois fois avec l'eau distillée stérile puis découpés en petits fragments. L'embryogenèse est conduite sur un milieu de Murashige et Skoog modifié [10] contenant un mélange vitaminique (vitamines de Fossard), 2 mg.l⁻¹ de riboflavine, 30 g de saccharose et 150 mg.l⁻¹ de charbon actif. Ce milieu est additionné de 5 mg.l⁻¹ de 2,4 D et 5 mg.l⁻¹ de BAP pour l'initiation des cals. L'induction des capacités embryogènes est faite sur le même milieu plus 0,5 mg.l⁻¹ de BAP et 0,1 mg.l⁻¹ de 2,4 D [10].

M. El Bellaj, I. El Hadrami : Laboratoire de physiologie végétale, Jeune équipe de recherche (JER) 3008 associée à l'AUF, Département de biologie, Faculté des sciences-Semlalia, BP 2390, 40001 Marrakech, Maroc.

<hadrami.fssm@cybernet.net.ma>

S. El Jaafari : Laboratoire de biotechnologie et amélioration des plantes, Faculté des sciences, 50000 Meknes, Maroc.

Tirés à part : I. El Hadrami

L'extraction des peroxydases se fait à froid à partir de 200 mg de matériel végétal dans un tampon tris-HCl 5 mmol (pH 7,2) contenant du MgCl₂ 1 mmol et du saccharose 0,25 mmol. Après centrifugation pendant 5 min à 6 000 g, le surnageant est récupéré et le résidu est épuisé par trois extractions successives dans un tampon tris-HCl 5 mmol (pH 7,2) contenant du triton X 100 à 1 %, les quatre fractions constituant la partie enzymatique soluble. La fraction ionique est obtenue par incubation du résidu dans un tampon tris-HCl 5 mmol (pH 7,2), NaCl 1 mmol pendant 1 heure. Après centrifugation, le surnageant est récupéré ; cette opération est répétée deux fois pour épuiser la fraction enzymatique ionique. Pour le piégeage des composés phénoliques inhibiteurs potentiels de l'AIA-oxydase, l'extraction est conduite en présence du polyvinylpyrrolidone (PVP) 40 000 insoluble. Les cals (500 mg poids frais) sont broyés dans un tampon acétate de sodium 0,1 mmol (pH 4,5) en présence de 250 mg de PVP (sans PVP pour le témoin). Après centrifugation à 6 000 g pendant 5 min, le surnageant est récupéré et le résidu est repris dans le même tampon pour une nouvelle extraction. Les deux surnageants réunis forment l'extrait brut sur lequel sont effectués les dosages de l'activité AIA-oxydasique en mélangeant 500 µl de tampon citrate de sodium 0,1 mmol pH 2,5, 200 µl MnCl₂ 1 mmol, 200 µl d'acide p-coumarique 1 mmol, 300 µl d'AIA 0,5 mmol et 200 µl d'extrait enzymatique. Après incubation pendant 20 min, 2 ml de la solution de Salkowsky (15 ml de FeCl₃ 0,5 M, 500 mmol H₂O et 300 ml H₂SO₄) sont ajoutés et l'absorbance est mesurée à 530 nm après 30 min à l'obscurité et sous agitation. La quantité d'AIA oxydée est estimée par la diminution de l'absorption de la coloration rose due au réactif de Salkowsky.

Résultats et discussion

L'activité AIA-oxydasique (*figure 1*) est trois fois inférieure chez les cals non embryogènes (*photo 1*) que chez des cals embryogènes (*photo 2*). Le rapport entre l'activité de l'extrait effectué en absence du PVP et celle de l'extrait obtenu en présence du PVP est de 0,90 chez les cals

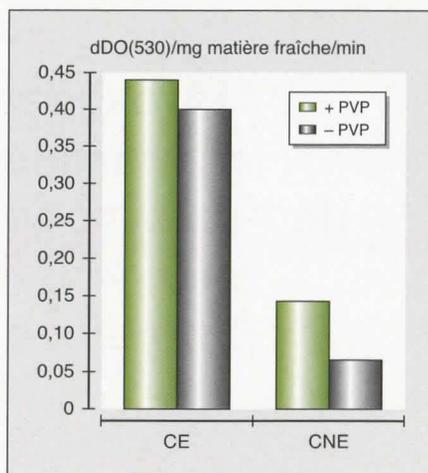


Figure 1. Effet du polyvinylpyrrolidone (PVP) sur l'activité acide indole acétique-oxydase des cals embryogènes (CE) et non embryogènes (CNE).

Figure 1. Effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) on indole acetic acid-oxidase activity in embryogenic (CE) and non embryogenic (CNE) calli.

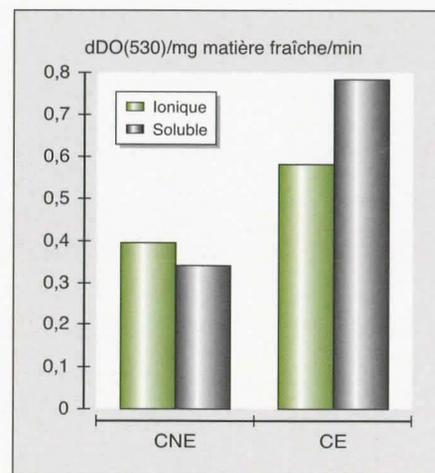


Figure 2. Comparaison des activités acide indole acétique-oxydases soluble et ionique des cals embryogènes (CE) et non embryogènes (CNE).

Figure 2. Comparison of soluble and ionic indole acetic acid-oxidase activities in embryogenic (CE) and non embryogenic (CNE) calli.

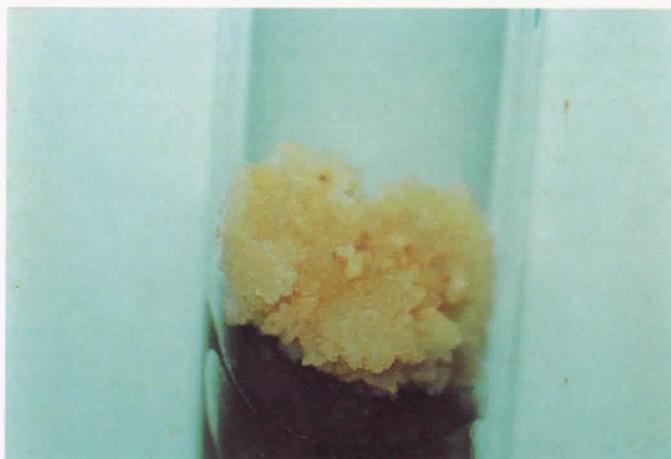


Photo 1. Illustration d'un cal non embryogène issu de cœurs de palmier dattier.

Photo 1. Illustration of a non-embryogenic callus obtained by shoot-tip explant culture of date palm.



Photo 2. Cultures embryogènes à croissance nodulaire chez le palmier dattier.

Photo 2. Embryogenic culture showing nodular growth in date palm.

en phase d'embryogenèse et de 0,46 chez les calcs en phase de callogenèse. Les extraits des calcs non embryogènes contiennent des composés (probablement phénoliques) exerçant une action inhibitrice sur l'AIA-oxydase, qui sont adsorbés par le PVP. Ceci peut expliquer l'acquisition tardive de potentialités embryogènes chez les calcs formés sur un milieu d'induction sans charbon actif, l'addition de 150 mg.l⁻¹ de charbon actif donnant une réponse deux fois plus rapide.

Par ailleurs, les activités AIA-oxydasiques solubles et ioniques (figure 2) sont moins élevées chez les calcs non embryogènes que chez les calcs embryogènes, lesquels montrent une activité AIA-oxydasique soluble supérieure à l'activité ionique, alors que, chez les calcs non embryogènes, aucune différence significative entre les deux activités n'est relevée.

L'importance des peroxydases (dont l'AIA-oxydase) dans le processus de l'embryogenèse somatique résulte probablement de leur participation à la restriction de l'expansion des parois cellulaires durant les premiers stades de formation des embryons [11]. Chez le palmier dattier, les fortes activités féruloyle et p-coumaroyle oxydases ioniques dans les tissus embryogènes sont à associer à l'aptitude de ces tissus à incorporer les esters phénoliques au niveau des parois cellulaires [12]. Chez la luzerne [7], durant les premiers stades de formation des embryons, les parois cellulaires subissent une augmentation de la fixation des acides phénoliques dues aux peroxydases.

L'embryogenèse somatique requiert, généralement, chez le palmier dattier une longue phase d'induction de la callogenèse (qui peut durer jusqu'à 6 mois, voire 1 an de culture). Les calcs isolés à partir de ce milieu sont transférés sur un milieu d'expression de l'embryogenèse, avec des concentrations en 2,4 D réduite de 50 fois et en BAP réduite de 10 fois par rapport à la première phase, ce qui paraît déterminant pour l'expression des capacités embryogènes [10]. Chez certaines espèces de graminées, le 2,4 D est très utilisé pour l'initiation de l'embryogenèse, mais sa concentration doit être ensuite réduite pour favoriser le développement des embryons [1].

Les teneurs en AIA endogène jouent un rôle très important dans l'embryogenèse somatique. Chez la carotte, les cultures

avec 2,4 D contiennent des concentrations élevées en AIA endogène, alors que leur transfert sur milieu sans 2,4 D (qui initie le processus de formation des embryons) se traduit par une diminution spectaculaire des concentrations en AIA [1]. Les activités AIA-oxydasiques semblent donc jouer un rôle régulateur dans l'acquisition des capacités embryogènes chez le palmier dattier notamment via la modulation des concentrations endogènes des tissus en AIA ■

Remerciements

Ce travail est réalisé dans le cadre du Fonds francophone de la recherche « Jeune équipe de recherche JER 3008 et LAF 612 associés à l'AUF » et Bourse de recherche de l'AUF. Il bénéficie également d'une Bourse de recherche de la Fondation internationale pour la science (FIS, D/1937-2) et d'un soutien financier dans le cadre de la coopération franco-marocaine, PRAD, 97-8 (1997-2000).

Références

- Ribinicky DM, Ilic N, Cohen JD, Cooke TJ. The effect of exogenous auxins on endogenous Indole-3-Acetic Acid metabolism: the implication of carrot somatic embryogenesis. *Plant Physiol* 1996 ; 112 : 449-58.
- Wilson DPM, Sullivan JA, Marjolais AQA, Tsujita MJ, Senatrata T. Improvement of somatic in zonal Geranium. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 1996 ; 47 : 27-32.
- Twyford CT, Mantell SH. Production of somatic embryos and plantlets from root-cells of the Greater Yam. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 1996 ; 46 : 17-26.
- Rival A, Berleenc FA, Morcillo F, et al. Scaling-up *in vitro* clonal propagation through somatic embryogenesis the case of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Plant Tissue Culture Technol Biotechnol* 1997 ; 3 : 74-83.
- Michalcuk L, Cooke TJ, Cohen JD. Auxin levels at different stages of carrot embryogenesis. *Phytochemistry* 1992 ; 31 : 1097-103.
- Pedreno MA, Ferrer MA, Gaspar T, et al. The polyfunctionality of cell wall peroxydases avoids the necessity of an independent H₂O₂-generating system for phenolic coupling in the cell wall. *Plant Peroxydase Newsletter* 1997 ; 5 : 3-8.
- Cvikrova M, Hrubocova M, Josef E, et al. Changes in the levels of endogenous phenolics, aromatic monoamines, phenylalanine ammonia-lyase, peroxydase and auxin oxidase activities during initiation of alfalfa embryogenic and non embryogenic calli. *Plant Physiol Biochem* 1996 ; 34 : 853-61.

Summary

AIA-oxidase: regulator and potential marker of somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.)

M. El Bellaj, S. El Jaafari, I. El Hadrami

Culture of date palm (Phoenix dactylifera L.) shoot-tip explants on modified MS medium, supplemented with 5 mg.l⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 5 mg.l⁻¹ benzylaminopurine, induced cell division and callus proliferation. Calli exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (0.1 mg.l⁻¹) and benzylaminopurine (0.5 mg.l⁻¹) were embryogenic. Indole acetic acid-oxidase activity in embryogenic calli was threefold that of non-embryogenic calli. The activity of this enzyme was inhibited in crude extract (probably due to phenolic effects), as shown by the effect of adding polyvinylpyrrolidone during enzyme extraction, and was more inhibited in non-embryogenic calli as compared to embryogenic calli. Soluble indole acetic acid-oxidase activity in embryogenic calli was higher than that of ionic oxidases, while no such difference was detected in non-embryogenic calli. Indole acetic acid-oxidase, as well as endogenous indole acetic acid, may therefore have a crucial role in date palm somatic embryogenesis.

Cahiers agricoles 2000 ; 9 : 193-5.

- El Hadrami I, Baaziz M. Somatic embryogenesis and analysis of peroxydases in *Phoenix dactylifera* L. *Biologia Plantarum* 1995 ; 37 : 197-203.
- Baaziz M, Aissam F, Brakez Z, et al. Electrophoretic patterns of acid soluble proteins and active isoforms of peroxydase and polyphenol-oxidase typing calli and somatic embryos of two reputed date palm cultivars in Morocco. *Euphytica* 1994 ; 76 : 159-68.
- El Hadrami I, Cheikh R, Baaziz M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from shoot-tip explant in *Phoenix dactylifera* L. *Biologia Plantarum* 1995 ; 37 : 205-11.
- Van Engelen FA, De Vries SC. Extracellular proteins in plant embryogenesis. *Trends Genet* 1992 ; 8 : 66-80.
- El Bellaj M, El Hadrami I. Rôle possible des phénols liés aux parois et des féruloyle et p-coumaroyle oxydases dans l'embryogenèse somatique du palmier dattier. *Polyphenol Communications* 1998 ; 2 : 483-4.