

## ETUDE DE L'EFFET D'UN HERBICIDE (NORFLURAZON) SUR LA CROISSANCE DES CALS DE HARICOT (*Phaseolus vulgaris* L.)

BOULAHIA K. <sup>(1)</sup>, AÏD F. <sup>(1)</sup>, ABROUS O. <sup>(1)</sup>  
et KESRI-BENHASSAINE G. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Equipe de Physiologie Végétale, Laboratoire de Biologie et  
Physiologie des Organismes (LBPO), Faculté des Sciences  
Biologiques, USTHB, BP 32 El Alia, 16111, Alger.  
Tel : 021 24 79 50 au 64. Fax : 021 24 72 17.

### RESUME

Les cals hétérotrophiques de haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) sont obtenus, en conditions axéniques, à partir de culture de méristèmes caulinaires et racinaires sur le milieu nutritif de Murashige et Skoog (MS, 1962) complet solide contenant une auxine (2,4-D) et une cytokinine (Kinétine) à différentes concentrations molaires. Des cals à croissance optimale ont été obtenus à partir d'explants de méristèmes caulinaires cultivés en présence du 2,4-D à  $10^{-6}$  M et de la kinétine à  $10^{-5}$  M.

Le norflurazon 4-chloro-5-méthyl-amino-2-trifluoro-méthyl-phényl 3 – (2 H) pyridazinone provoque chez les cals hétérotrophiques de haricot, une diminution du poids de la matière végétale fraîche, du poids de la matière végétale sèche et de la teneur en protéines totales en fonction des doses appliquées. Le norflurazon est un herbicide qui agit fortement sur la croissance des cals de haricot.

**Mots clés :** milieu MS, cals, haricot, croissance, norflurazon.

## ملخص

الكنب (cal) غير ذاتي التغذية للفاصولياء *Phaseolus vulgaris* L. حصل في ظروف معقمة عن طريق زرع الميريستيم الساقى و المير يستيم الجذري على الوسط الغذائى ل Murashige et Skoog (MS, 1962) كامل وصلب المحتوى على الأوكسين (2,4D) و السيٲوكنين (kinéline) فى تراكيٲ مولارية مختلفة. تم الحصول على النمو الأقصى للكنب من المير يستيم الساقى النامى بوجود (2,4D) ب  $10^{-6}$  مولارية و kinéline ب  $10^{-10}$  مولارية.

يحدث النور فليرازون 4- كلور- 5- ميٲيل - أمينو 2- ثلاثى - فليور- ميٲيل 3- (H2) بيريدا زينون عند لكنب الذاتى التغذية للفاصولياء انخفاض فى وزن المادة النباتية الطازجة، المادة النباتية الجافة و فى كمية البروتينات الكلية بدلالة التراكيٲ المستعملة. النورفليرازون ، ميٲد الأعشاب الضارة ، يؤثر بقوة على نمو الكنب الفاصولياء.

كلمت المفتح : الكنب، الفاصولياء، النمو، النور فليرازون.

## ABSTRACT

The heterotrophic callus of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) are produced, under aseptic conditions, from stem and root explants cultivated on complete and solid Murashige-Skoog (MS,1962) medium supplemented with different levels of auxin (2,4-D) and cytokinin (kinetin). The optimum growth of callus have been obtained from stem explants cultivated on MS medium with  $10^{-6}$  M 2,4-D and  $10^{-5}$  M kinetin.

The norflurazon 4-chloro-5-methyl-amino-2-trifluoro-methyl-phenyl 3 - (2 H) pyridazinone causes in heterotrophic callus of bean a diminution of the fresh weight, the dry weight and the total proteins content in terms of the herbicid dose. The norflurazon is an herbicid wich affect strongly the growth of bean callus.

**Key words :** MS medium, callus, bean, growth, norflurazon.

## 1. INTRODUCTION

Les progrès spectaculaires réalisés depuis la seconde guerre mondiale dans les domaines de la physiologie végétale et de la génétique sont pour beaucoup dans le développement des techniques de pointe appliquées à l'agriculture. Les cultures in vitro et hors sol notamment ont su apporter des réponses irremplaçables aux pressantes exigences de qualité et de rentabilité de l'économie agricole. L'amélioration sanitaire des conditions de culture et des végétaux, ainsi que les possibilités de multiplication végétative s'en sont trouvées considérablement augmentées, bouleversant en quelques années certains aspects de la production agricole.

Les régulateurs de croissance sont à la base de toute manipulation in vitro. En effet, les hormones jouent un rôle fondamental dans le contrôle de la multiplication et de la différenciation cellulaire, dans le contrôle de l'organogenèse et de la croissance des plantes. Leur action est finement modulée par leur concentration. Les combinaisons d'auxines et de cytokinines se sont révélées être nécessaires pour une induction et une prolifération optimale des cals (LAPICHINO et al, 1991 ; NAWA ET OHTANI, 1992), massifs cellulaires inorganisés à caractère méristématique se divisant activement.

Les herbicides ou produits désherbants sont des substances chimiques couramment utilisées en agriculture pour détruire les adventices ou paralyser leur développement.

Les adventices (souvent qualifiées de mauvaises herbes) entrent en compétition avec les plantes cultivées pour l'eau, les éléments minéraux, l'espace, le dioxyde de carbone, ainsi que pour la lumière, ce qui diminue considérablement la qualité et la quantité des récoltes. Ainsi, l'introduction des herbicides dans la pratique agricole contribue à assurer une meilleure rentabilité des cultures. Néanmoins, pour protéger d'une manière efficace une culture contre diverses adventices, un herbicide doit être capable d'éliminer les adventices sans porter préjudice aux plantes cultivées (FREYSSINET, 1990). Parmi les nombreux travaux réalisés sur le mode d'action des herbicides, beaucoup ont été effectués sur des plantes entières ; il nous a paru donc intéressant d'étudier l'effet d'un herbicide sur des cultures de cals. Au cours de ce travail, nous nous sommes proposées d'étudier l'effet du :

- 2,4-D et de la kinétine sur les cals produits par des méristèmes de *Phaseolus vulgaris* L., en recherchant la balance hormonale qui serait à l'origine d'une callogenèse optimale.
- norflurazon sur la croissance, en mesurant le poids de la matière végétale fraîche, sèche et la teneur en protéines totales.

## 2. MATERIELS ET METHODES

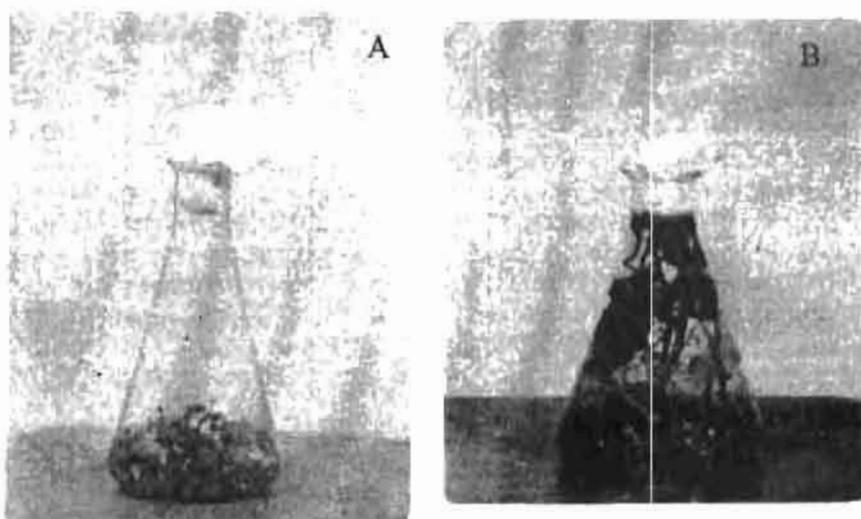
### 2.1. Obtention des cals

Les graines de *Phaseolus vulgaris* L., variété Tendergreen, sont mises à imbiber dans de l'eau distillée pendant trois heures, puis désinfectées dans de l'eau de Javel (1%). Elles sont ensuite rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile. La germination des graines, en conditions axéniques, s'effectue dans des erlenmeyers contenant de la vermiculite imbibée d'eau distillée et obturés par du coton cardé, stérilisés au préalable à l'autoclave pendant 20 mn à 120°C (photo 1A).

Les vitrosemis sont ensuite placés dans une étuve à 26°C et une photopériode de 16 heures, jusqu'au stade quatre feuilles (photo 1B).

Les cals de haricot sont obtenus, en conditions axéniques, à partir de culture de méristèmes intercalaires et racinaires sur le milieu nutritif de Murashige et Skoog (MS, 1962) complet gélosé (12g l<sup>-1</sup>) contenant une auxine (2,4-D) et une cytokinine (kinétine) à différentes concentrations : 10<sup>-4</sup> M ; 10<sup>-5</sup> M ; 10<sup>-6</sup> M ; 10<sup>-7</sup> M.

Les explants ensemencés sont placés dans une chambre de culture à une température de 26°C et une photopériode de 16 heures. Les cals obtenus sont repiqués tous les mois sur un milieu stérile neuf de même composition.



**Planche 1 :** Germination des semences de haricot en conditions axéniques.

**A :** Mise en culture des graines de haricot sur vermiculite.

**B :** Cultures axéniques de plantules de haricot sur vermiculite

## 2.2. Traitement des cals

Le norflurazon appelé également San 9789 est d'origine suisse. Il appartient à la famille des pyridazinones ; sa formule chimique est le 4-chloro-méthyl-amino-2-trifluoro-méthyl-phényl 3 - (2 H) pyridazinone et sa masse moléculaire est de 303,7 g. Il se présente sous forme d'une poudre cristalline de couleur marron ; sa solubilité dans l'eau est de 28 mg.l<sup>-1</sup> à 23°C.

Le traitement a été appliqué sur des cals en phase exponentielle de croissance. Les cals sont prélevés aseptiquement et transférés dans des milieux identiques au milieu de culture additionné du norflurazon à différentes concentrations molaires : 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-5</sup> M, 10<sup>-4</sup> M. Ces cals sont maintenus en croissance pendant quatre jours dans des erlenmeyers en chambre de culture dans les mêmes conditions (température de 16°C et une photopériode de 16 heures). Au-delà de ce temps, la toxicité du produit entraîne un brunissement et la mortalité des cellules du cal pour l'ensemble des traitements.

## 2.3. Détermination de la matière fraîche et sèche

La matière végétale fraîche est déterminée par pesée des cals (6 individus) à l'aide d'une balance de précision.

La matière sèche est déterminée après une dessiccation totale des cals pendant 48 heures dans une étuve réglée à 65°C. Les cals desséchés sont alors pesés à l'aide de la même balance.

Le pourcentage d'eau des cals est calculé par la différence entre les masses fraîche et sèche.

## 2.4. Dosage des protéines

La teneur en protéines est déterminée par la technique de Bradford (1976).

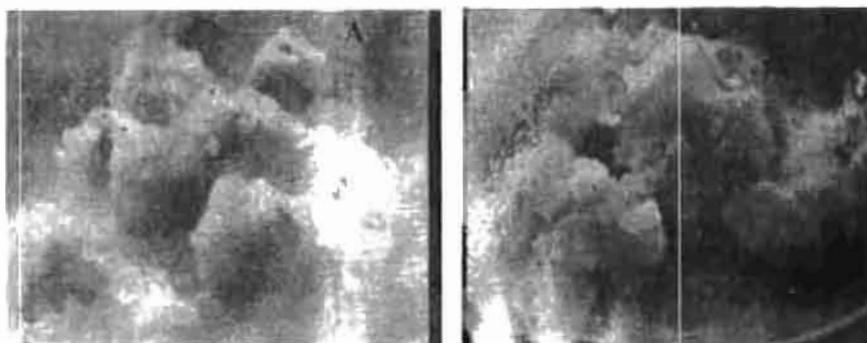
# 3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

## 3.1. Description des cals

Pour toutes les combinaisons hormonales utilisées, les cals provenant des méristèmes caulinares sont au départ chlorophylliens, compacts, fermes et denses (photo 2 A).

Les cals obtenus perdent cependant, progressivement ou rapidement leur verdissement pour devenir crèmes (dits hétérotrophiques), légèrement

translucides et friables (photo 2 B). Cette dépigmentation est fonction de la concentration en 2,4-D. En effet, les cals cultivés sur un milieu riche en auxine ( $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  M) perdent leur chlorophylle après 10 jours de croissance. Quant aux cals cultivés en présence des doses plus faibles en auxine ( $10^{-6}$  et  $10^{-7}$  M), ils ne deviennent crèmes qu'après le 20<sup>ème</sup> jour de croissance.



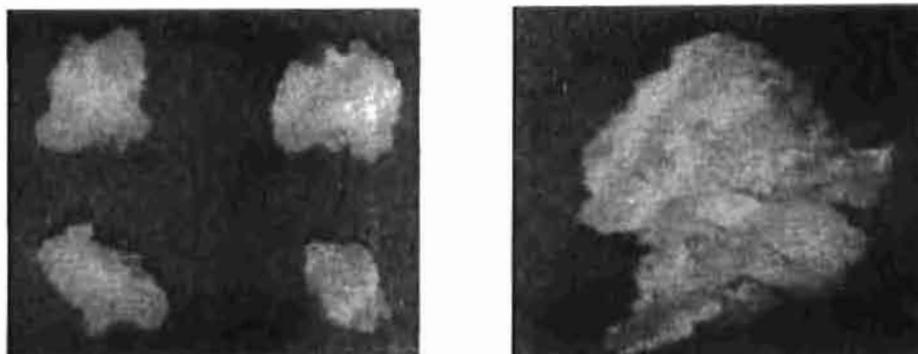
**Planche 2 :** Cals issus des méristèmes caulinaires de *Phaseolus vulgaris* L.

- A :** cals photomixotrophiques (verts) après 20 jours de culture.  
**B :** cals hétérotrophiques (crèmes) après 50 jours de culture.

La coloration verte des cals indique un développement des structures chloroplastiques

(WILLIAMS et al, 1991) et la présence de chlorophylle (AID et al, 1996). Ces cals sont qualifiés alors de photomixotrophiques (Manoharan et al, 1987 ; FITCH et MOORE, 1990). Le 2,4-D est une auxine de synthèse aux propriétés similaires à un herbicide. A fortes doses, le 2,4-D provoque des perturbations dans le fonctionnement des membranes thylakoidales et des changements dans la morphologie du chloroplaste (ASHTON et CRAFTS, 1973 ; SCALLA, 1991 ; WILLIAMS et al, 1993) Par ailleurs, l'obtention des cals hétérotrophiques chez *Lemna minor* (FRICK, 1991) et *Acacia auriculiformis* (RANGA - RAO et PRASAD, 1991) a été reliée avec la concentration de la source carbonée utilisée dans le milieu nutritif. La richesse du milieu de culture en sucre induit une synthèse accrue d'amidon dans les chloroplastes qui se transformeraient en amyloplast.

Les cals provenant des méristèmes racinaires sont toujours de couleur crème, friables et légèrement translucides (photo 3).



**Planche 3 :** Cals de *Phaseolus vulgaris* L. issus des méristèmes racinaires.

Après deux mois de croissance, sans repiquage, les cals produits à partir des deux types de méristèmes (intercalaires et racinaires) présentent un brunissement suivi d'un dessèchement général de leur surface ; c'est la phase de sénescence (photo 4) Selon RANGA – RAO et PRASAD, (1991), le brunissement des cultures résulterait d'une accumulation excessive des substances phénoliques.



**Planche 4 :** Cals de *Phaseolus vulgaris* L. sénescents (bruns)

### 3.1.1. Induction de la croissance des cals par les hormones

#### 3.1.1.1. Méristèmes caulinares

Les courbes de croissance des cals produits par les méristèmes intercalaires en fonction des concentrations hormonales présentent toutes une allure sigmoïde caractérisée par trois phases principales (Fig.1).

Une première phase, ou phase accélérée de croissance, couvre les 35 premiers jours pendant laquelle l'augmentation du poids de la matière végétale fraîche est importante. Une deuxième phase appelée phase de ralentissement va jusqu'au 55<sup>ème</sup> jour ; l'accumulation est plus lente. Enfin une dernière phase ou phase stationnaire est marquée par une stabilisation du poids frais. Elle se situe entre le 60<sup>ème</sup> et le 80<sup>ème</sup> jour de croissance.

La prolifération cellulaire et la croissance mesurée par le poids frais sont dépendantes de la concentration en 2,4-D et kinétine. Les courbes de croissance ont été regroupées en quatre lots par ordre décroissant :

Le lot A (Fig.1A) est formé par les faibles doses de 2,4-D combinées aux fortes doses de kinétine ( $10^{-6}/10^{-5}$  ;  $10^{-7}/10^{-5}$  ;  $10^{-6}/10^{-4}$  ;  $10^{-7}/10^{-4}$  M : 2,4-D/Kin) : nous remarquons une forte accumulation de la matière végétale fraîche. Toutefois, le 2,4-D à  $10^{-6}$  M et la kinétine à  $10^{-5}$  M se sont révélés les concentrations adéquates à une croissance optimum des cals ; le poids de matière fraîche passe de  $283 \pm 78$  mg le 5<sup>ème</sup> jour à  $3480 \pm 135$  mg le 60<sup>ème</sup> jour de culture.

Le lot B (Fig.1B) constitué par les faibles doses de 2,4-D combinées aux faibles doses de kinétine ( $10^{-6}/10^{-7}$  ;  $10^{-7}/10^{-6}$  M : 2,4-D/Kin) ou les fortes doses de 2,4-D combinées aux fortes doses de kinétine ( $10^{-4}/10^{-5}$  ;  $10^{-5}/10^{-4}$  M : 2,4-D/Kin) : une croissance nettement plus faible est enregistrée en présence de ces différentes concentrations hormonales. En effet, pour toutes ces doses, le poids frais varie entre  $660 \pm 36$  mg et  $1020 \pm 12$  mg au 60<sup>ème</sup> jour.

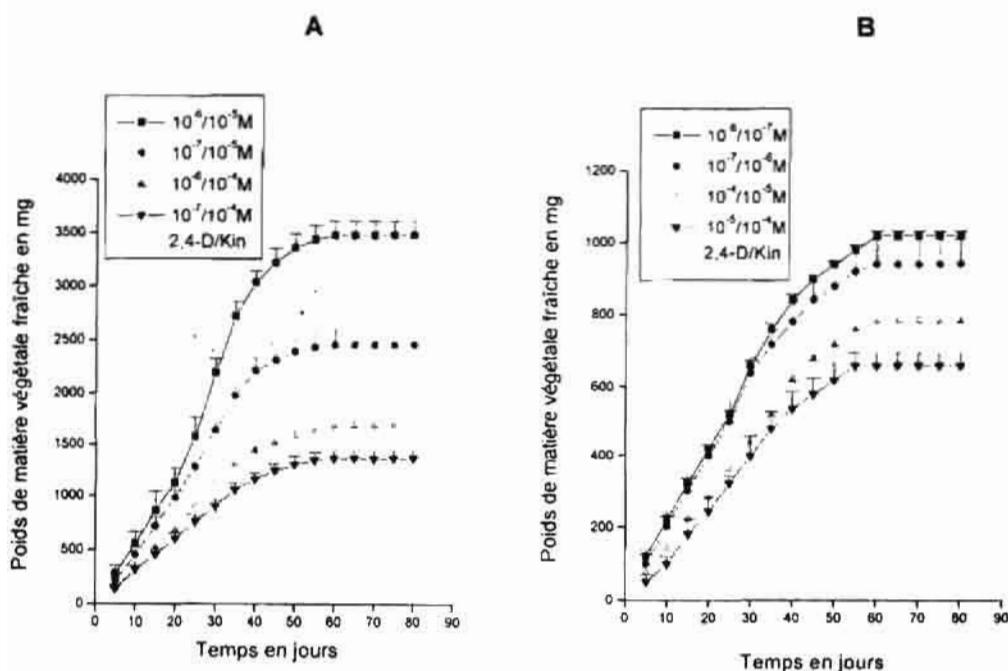
Le lot C (Fig.1C) comprend les fortes doses de 2,4-D combinées aux faibles doses de kinétine ( $10^{-4}/10^{-6}$  ;  $10^{-4}/10^{-7}$  ;  $10^{-5}/10^{-6}$  ;  $10^{-5}/10^{-7}$  M : 2,4-D/Kin) : l'accumulation de la matière fraîche est beaucoup plus faible pour ces différents traitements hormonaux. Ainsi, les valeurs finales des poids frais sont comprises seulement entre  $545 \pm 19$  mg et  $605 \pm 52$  mg au 60<sup>ème</sup> jour de culture.

Le lot D (Fig.1D) regroupe les combinaisons de même rapport molaire ( $10^{-6}/10^{-6}$  ;  $10^{-7}/10^{-7}$ ).

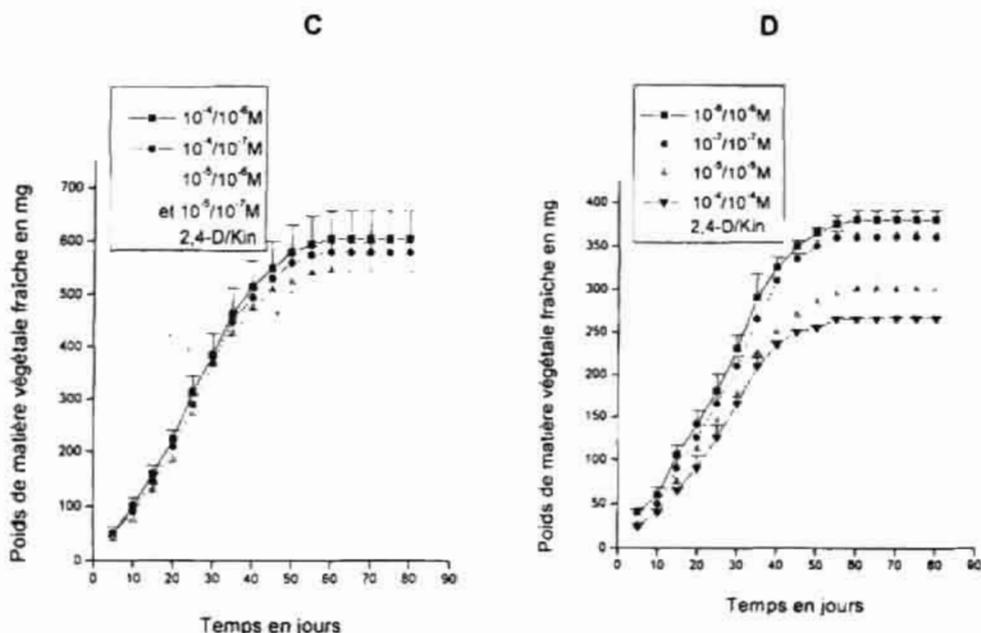
$10^{-5}/10^{-5}$  ;  $10^{-4}/10^{-4}$  : 2,4-D/Kin) : quelque soit la concentration hormonale, la croissance est encore plus faible. En effet, le poids de matière fraîche varie entre  $265 \pm 2$  mg et  $380 \pm 11$  mg au 60<sup>ème</sup> jour.

Nos résultats corroborent ceux de MALIK et SAXENA, (1991) ayant travaillé sur la même espèce végétale et ceux de AL-KHAYRI et al, (1991 ; 1992) utilisant les cals de *Spinacia oleracea* L.

Le 2,4-D utilisé à faibles doses de l'ordre de  $10^{-8}$  à  $10^{-6}$  M, est l'auxine de synthèse nécessaire pour l'obtention des cals (DAVIS et OLSON, 1993). Néanmoins, les combinaisons d'auxines (en particulier le 2,4-D) et de cytokinines, hormones favorisant les mitoses, stimuleraient davantage la callogénèse (LAPICHINO et al, 1991 ; NAWA et OHTANI, 1992).



**Figure 1** : Effets des différentes concentrations en 2,4-D et kinétine sur l'évolution du poids de la matière végétale fraîche (A, B) des cals de haricot issus des méristèmes intercalaires. (Chaque point est la moyenne de 6 mesures)



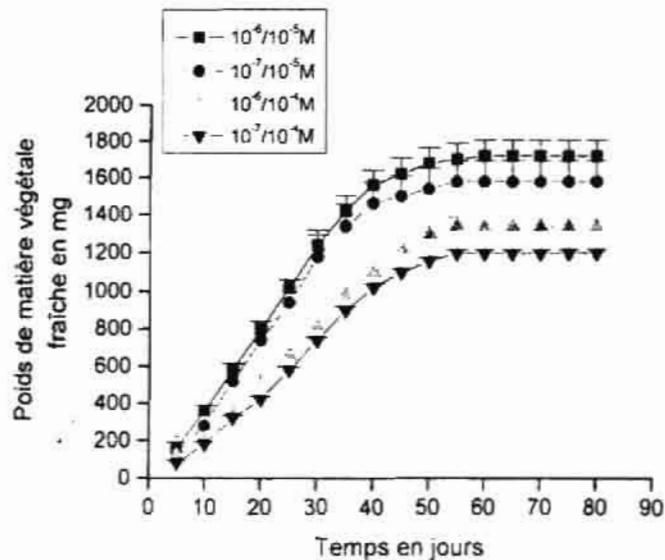
**Figure 1'** : Effets des différentes concentrations en 2,4-D et kinétine sur l'évolution du poids de la matière végétale fraîche (C, D) des cals de haricot issus des méristèmes intercalaires. (Chaque point est la moyenne de 6 mesures)

### 3.1.1.2. Méristèmes racinaires

Les courbes de croissance des cals provenant des méristèmes racinaires présentent également une allure sigmoïde (Fig.2).

Seules les faibles doses en 2,4-D combinées aux fortes doses en kinétine ( $10^{-6}/10^{-5}$  ;  $10^{-7}/10^{-5}$  ;  $10^{-6}/10^{-4}$  ;  $10^{-7}/10^{-4}$  ; 2,4-D/Kin) se sont révélées efficaces pour l'obtention des cals mais leur croissance demeure réduite par rapport à celle observée pour les cals issus des méristèmes intercalaires.

Les autres concentrations hormonales n'ont pas d'effets sur la callogenèse. L'obtention des cals à partir des méristèmes caulinaires est généralement favorisée par un apport d'auxine exogène à doses relativement élevées (2,4-D de  $10^{-7}$  à  $10^{-5}$  M), par contre la croissance des méristèmes racinaires nécessite un apport d'auxine très faible (MARGARA, 1989 ; AL-KHAYRI et al., 1992).



**Figure 2 :** Effets des différentes concentrations en 2,4-D et kinétine sur l'évolution du poids de la matière végétale fraîche des cals de haricot issus des méristèmes racinaires. (Chaque point est la moyenne de 6 mesures)

### 3.1.2. Etude de la croissance

L'ensemble des résultats obtenus au cours de la première partie du travail, nous ont permis de déterminer à la fois les concentrations hormonales (2,4-D et kinétine) et la nature de l'explant favorisant une callogenèse optimum. Nous avons choisi pour cette étude, des cals provenant des méristèmes caulinaires (intercalaires) cultivés sur des milieux pauvres en 2,4-D et riches en kinétine ( $10^{-6}/10^{-5}$ ;  $10^{-7}/10^{-5}$ ;  $10^{-6}/10^{-4}$  M).

La croissance des cals est déterminée par l'évaluation de la masse de la matière végétale fraîche, de la matière végétale sèche et de la teneur en protéines totales.

#### 3.1.2.1. Poids de la matière végétale fraîche

Nous constatons que la croissance des cals est importante dès les premiers jours de culture pour les trois traitements hormonaux sélectionnés

(Fig.3A). En effet, le poids de matière fraîche augmente très rapidement pour atteindre au 35<sup>ème</sup> jour  $2582 \pm 304$  mg pour la combinaison hormonale  $10^{-6}/10^{-5}$  M,  $1980 \pm 85$  mg pour la combinaison  $10^{-7}/10^{-5}$  M et  $1360 \pm 99$  mg pour la  $10^{-6}/10^{-4}$  M (2,4-D/Kin). Au-delà du 35<sup>ème</sup> jour, la croissance ralentit et se stabilise à partir du 55<sup>ème</sup> jour pour atteindre un maximum au 60<sup>ème</sup> jour ;  $3400 \pm 240$  mg,  $2400 \pm 148$  mg et  $1740 \pm 132$  mg pour les combinaisons respectives  $10^{-6}/10^{-5}$ ,  $10^{-7}/10^{-5}$  et  $10^{-6}/10^{-4}$  M (2,4-D/Kin). Ces valeurs demeurent inchangées entre le 60<sup>ème</sup> et le 80<sup>ème</sup> jour.

### 3.1.2.2. Poids de la matière végétale sèche

L'évolution de la matière végétale sèche montre une cinétique similaire à celle observée par la matière végétale fraîche (Fig.3B). Le poids sec est important durant les 35 premiers jours où il atteint  $132 \pm 18$  mg pour la concentration  $10^{-6}/10^{-5}$ ,  $102 \pm 10$  mg pour la  $10^{-7}/10^{-5}$  et  $65 \pm 8$  mg pour la  $10^{-6}/10^{-4}$  M (2,4-D/Kin). Après le 35<sup>ème</sup> jour on constate un ralentissement de croissance qui tend à se stabiliser à partir du 55<sup>ème</sup> jour et atteint une valeur finale au 60<sup>ème</sup> jour ;  $170 \pm 15$  mg pour la  $10^{-6}/10^{-5}$ ,  $128 \pm 12$  mg pour la  $10^{-7}/10^{-5}$  et  $82 \pm 8$  mg pour la  $10^{-6}/10^{-4}$  M.

Nous remarquons que l'évolution du poids frais et du poids sec est identique. En effet, le pourcentage d'eau est constant dans les cais pour les différents traitements hormonaux. Ce qui indique que l'accumulation de la matière végétale fraîche n'est pas dû à une hyperhydricité des tissus mais bien à une augmentation de croissance.

### 3.1.2.3. Protéines totales

Pendant les 20 premiers jours de culture, l'accumulation des protéines est faible (Fig.3C). Durant cette période dite phase de latence, les cais élaborent probablement des systèmes enzymatiques intervenant dans la protéogénèse. Puis, cette accumulation augmente fortement entre le 20<sup>ème</sup> et le 35<sup>ème</sup> jour en passant de  $164 \pm 36 \mu\text{g.g}^{-1}$  MVF à  $447 \pm 65 \mu\text{g.g}^{-1}$  MVF pour la combinaison  $10^{-6}/10^{-5}$  M. Cette augmentation est moindre pour la  $10^{-7}/10^{-5}$  M puisqu'elle passe de  $103 \pm 22 \mu\text{g.g}^{-1}$  MVF à  $310 \pm 34 \mu\text{g.g}^{-1}$  MVF alors que pour la combinaison  $10^{-6}/10^{-4}$  M, on enregistre une augmentation encore plus faible (de  $60 \pm 14 \mu\text{g.g}^{-1}$  MVF à  $210 \pm 22 \mu\text{g.g}^{-1}$  MVF). Au-delà du 35<sup>ème</sup> jour, l'accumulation des protéines ralentit et tend à se stabiliser à partir du 55<sup>ème</sup> jour pour atteindre son optimum au 60<sup>ème</sup> jour pour les trois combinaisons hormonales.

La phase exponentielle marquée par une augmentation importante de la matière fraîche, de la matière sèche et de la quantité en protéines totales se situe entre le 20<sup>ème</sup> et le 35<sup>ème</sup> jour de culture. Ainsi, la masse

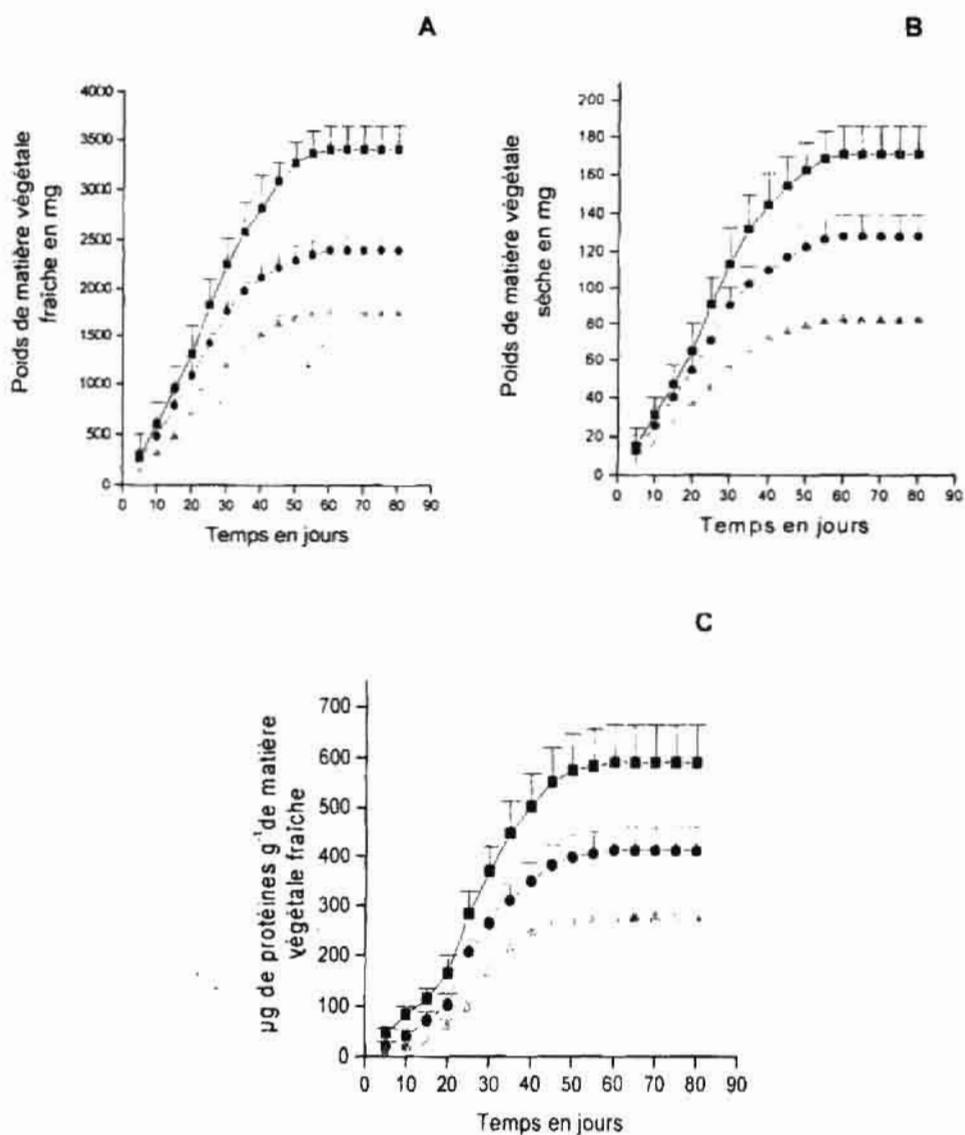
fraîche, sèche et la teneur en protéines acquises pendant cette phase sont la conséquence d'une prolifération et d'une croissance active des cellules du cal. Puis la croissance des cals ralentit et tend à se stabiliser à partir du 55<sup>ème</sup> jour pour atteindre un optimum au 60<sup>ème</sup> jour. En effet, une stabilisation de la croissance est marquée par l'apparition d'un plateau entre le 60<sup>ème</sup> et le 80<sup>ème</sup> jour de croissance. Ceci est peut être le résultat d'un arrêt de la multiplication cellulaire qui résulterait probablement d'un épuisement en éléments nutritifs dans le milieu de culture puis d'un épuisement des réserves cellulaires entraînant ainsi la mort de la cellule. En effet, l'accroissement rapide acquis durant la phase exponentielle de croissance induit une augmentation des besoins et pose des problèmes d'approvisionnement du milieu (JOUANNEAU, 1973). Nos résultats ont mentionné une réduction de la synthèse protéique pendant la phase stationnaire de la croissance. Par ailleurs, il a été démontré que les activités biochimiques, notamment la synthèse des phospholipides, diminuent durant la phase stationnaire (DA SILVA et FOWLER, 1976; MOORE, 1977; BOULAHIA, 1997). La stabilisation de la croissance des cals pourrait être due également à l'augmentation des substances toxiques (ex : tanins, polyphénols, alcaloïdes) élaborées par le végétal (MARGARA, 1989).

### 3.1.3. Effets du norflurazon sur la croissance des cals

Le traitement au norflurazon ( $10^{-7}$  M ;  $10^{-6}$  M ;  $10^{-5}$  M et  $10^{-4}$  M) a été réalisé sur des cals âgées de 28 jours, période qui correspond à la phase exponentielle de croissance.

L'effet de l'herbicide sur la croissance a été étudié par l'évolution du poids de la matière végétale fraîche, de la matière végétale sèche et de la teneur en protéines totales en fonction du temps.

Sous l'effet du norflurazon, les cals hétérotrophiques de haricot maintiennent la couleur crème pendant les quatre premiers jours du stress. Au-delà de ce temps, un brunissement et un dessèchement général des cellules du cal sont observés.



**Figure 3 :** Evolution de la matière végétale fraîche (A), sèche (B) et de la teneur enprotéines, (C) des cals de haricot pour les trois principales combinaisons hormonales de 2,4-D et kinétine en fonction du temps. (Chaque point est la moyenne de 6 mesures).  $10^{-6}/10^{-5}$  M (■) ;  $10^{-7}/10^{-5}$  M (●) ;  $10^{-6}/10^{-4}$  M (▲) : 2,4-D/Kin.

### 3.1.3.1. Poids de la matière végétale fraîche

Le poids de la matière végétale fraîche des cals témoins augmente en fonction du temps, il passe de  $2219 \pm 25$  mg le 2<sup>ème</sup> jour à  $2376 \pm 49$  mg le 4<sup>ème</sup> jour de culture (Fig.4A). Les cals traités montrent une diminution importante du poids frais pendant les deux premiers jours du stress, suivi d'une tendance à la stabilisation entre le 2<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jours. Cette réduction de croissance est d'autant plus prononcée que la dose en herbicide est élevée. En effet, pendant le 2<sup>ème</sup> jour du traitement, le poids de matière fraîche passe de  $2219 \pm 25$  mg dans les cals témoins à  $740 \pm 33$  mg dans les cals traités par la forte dose  $10^{-4}$  M. Les pourcentages de réduction du poids frais par rapport au témoin sont 27,7 ; 36,8 ; 41,4 et 66,6 % pour les doses respectives  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$  M.

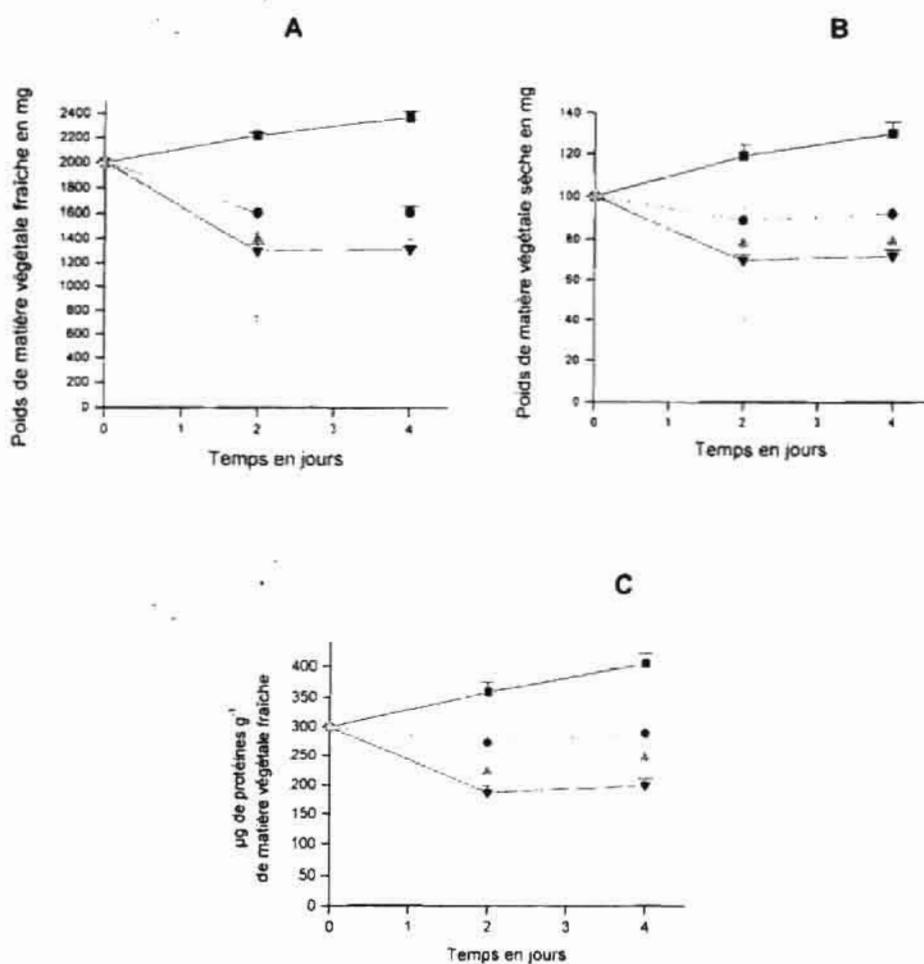
### 3.1.3.2. Poids de la matière végétale sèche

L'évolution de la matière végétale sèche (Fig.4B) montre une cinétique similaire à celle observée par la matière végétale fraîche. Ainsi, au 2<sup>ème</sup> jour du traitement, le poids sec des cals témoins est de  $119 \pm 8$  mg et au fur et à mesure que les concentrations augmentent, le poids de la matière sèche diminue ; il passe à  $89 \pm 6$  mg pour la dose  $10^{-7}$  M et  $41 \pm 3$  mg pour la dose élevée  $10^{-4}$  M, soit une baisse de 25,2 et 65,5 % pour les doses respectives.

Nous remarquons que la diminution du poids frais et du poids sec est identique, ce qui signifie que l'herbicide n'intervient pas dans les mouvements d'eau. En effet, le pourcentage d'eau est constant dans les cals pour les différents traitements d'herbicides. La diminution du poids de la matière végétale fraîche par le norflurazon n'est donc pas due à une déshydratation cellulaire, mais serait le résultat d'un arrêt des activités métaboliques et surtout à des processus intenses de dégradation.

### 3.1.3.3. Protéines totales

Dans les cals témoins, la quantité de protéines augmente régulièrement en fonction du temps, elle est de  $359 \pm 16$   $\mu\text{g.g}^{-1}$  le 2<sup>ème</sup> jour et de  $406 \pm 17$   $\mu\text{g.g}^{-1}$  le 4<sup>ème</sup> jour de croissance (Fig.4C). Sous l'effet du norflurazon, une baisse importante de la teneur en protéines totales est enregistrée pendant les deux premiers jours du traitement ; cette baisse est fonction de la dose administrée. Au-delà de ce temps, une stabilisation de croissance est enregistrée. Contrairement aux plantes entières, le cal étant un amas de cellules, l'herbicide atteint donc rapidement les sites sensibles.



**Figure 4 :** Effets du norflurazon sur l'évolution du poids de la matière végétale (A), sèche (B) et de la teneur en protéines des cals de haricot. (Chaque point est la moyenne de 6 mesures), Témoin (■) ;  $10^{-7}$  M (●) ;  $10^{-6}$  M (▲) ;  $10^{-5}$  M (▼) ;  $10^{-4}$  M (-).

Ainsi, durant le 2<sup>ème</sup> jour du stress, la teneur en protéines varie de  $359 \pm 16 \mu\text{g.g}^{-1}$  MVF chez les cals témoins à  $151 \pm 12 \mu\text{g.g}^{-1}$  MVF chez les cals traités avec la  $10^{-4}$  M. Le pourcentage de réduction, comparativement au témoin, va de 23,9 % pour la faible dose  $10^{-7}$  M à 57,9 % pour la forte dose  $10^{-4}$  M.

La diminution de la croissance (poids frais, poids sec et protéines totales) des cals par le norflurazon est très importante pendant les deux premiers jours du stress. Contrairement aux plantes entières, le cal étant un amas de cellules, l'herbicide atteint donc rapidement les sites sensibles.

La réduction de la croissance des cals serait due à une diminution de la synthèse protéique et/ou à une hydrolyse des protéines provoquée par le norflurazon. D'après GRONWALD (1991), l'emploi des herbicides provoque généralement une baisse du taux de protéines qui est souvent un effet secondaire à des blocages primaires de certains compartiments de la cellule (chloroplaste, mitochondrie, noyau). Par ailleurs, SAGAR et al, (1988) et OELMULLER (1989) ont montré que les protéines chloroplastiques codées par le génome nucléaire sont sensibles aux pyridazinones. Plus récemment, DAHLIN et FRANZEN (1997) et YURINA et KLOPPSTECH (2001) ont signalé que le norflurazon inhibe l'importation des protéines par les plastes.

#### 4. CONCLUSION

La culture de méristèmes caulinaires et racinaires de *Phaseolus vulgaris* L., en milieu nutritif de MS complet gélosé additionné d'auxine (2,4-D) et de cytokinine (kinétine) à différentes concentrations a permis l'induction et la prolifération des cals provenant des deux types de méristèmes.

Toutefois, les cals caulinaires ont été obtenus pour toutes les combinaisons hormonales utilisées, alors que pour les cals racinaires, ce sont les concentrations faibles en auxine qui se sont révélées efficaces. L'initiation des méristèmes caulinaires est généralement favorisée par un apport d'auxine exogène à concentrations relativement élevées ( $10^{-7}$  à  $10^{-5}$  M), tandis que la croissance des méristèmes racinaires demande un apport d'auxine très faible.

Les cals de couleur crème, dits hétérotrophes sont issues de la dépigmentation totale des cals verts, due à l'accumulation du 2,4-D dans les cellules. Le 2,4-D entraîne à fortes doses, la dégradation de la chlorophylle et l'altération des systèmes thylakoidaux. Le milieu étant riche en saccharose, les chloroplastes peuvent évoluer en amyloplast.

Au cours de ce travail, nous avons montré également qu'une croissance optimale des cals de haricot a été obtenue à partir de fragments de méristèmes caulinaires cultivés sur des milieux pauvres en 2,4-D ( $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M) et riches en kinétine ( $10^{-5}$  et  $10^{-4}$  M). La faible croissance des cals cultivés sur un milieu riche en 2,4-D ( $10^{-5}$  et  $10^{-4}$  M) peut être expliquée par le fait que le 2,4-D, à fortes concentrations, est qualifié d'herbicide auxinique. Ainsi, son accumulation dans les tissus entraînerait des phénomènes de toxicité.

Le norflurazon diminue considérablement la croissance des cals de haricot. En effet, nos résultats montrent une réduction du poids de la matière végétale fraîche, de la matière végétale sèche et de la teneur en protéines totales d'autant plus prononcée que la dose appliquée est élevée. Cette réduction de croissance est très importante pendant les deux premiers jours du stress et se stabilise entre le 2<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour. La baisse de croissance serait due éventuellement à une diminution de la synthèse des protéines et/ou à une protéolyse intense due au traitement par le norflurazon.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AÏD F., BENADJAOU A., ACHAB N et KESRI-BENHASSAINE G., 1996.-** Effets des chocs thermiques sur le métabolisme cellulaire des cals de colza (*Brassica napus* L.). 4<sup>èmes</sup> journées scientifiques de l'URBFA. ISN. USTHB. (Alger). pp 8.
- AL-KHAYRI J. M., HUANG F. H. et MORELOCK T. E., 1991.-** Regeneration of spinach from leaf callus. Hort Sci., 26 (7): 913 - 914.
- AL-KHAYRI J. M., HUANG F.H., MORELOCK T. E. et BUSHARAR T. A.- 1992.-** In vitro plant regeneration of spinach from mature seed-derived callus. In vitro Cell. Dev. Biol., 28: 64 - 66.
- ASHTON F. M. et CRAFTS A. S., 1973.-** Mode of action of herbicides. Wiley-Interscience. New York : 226 - 288.
- BOULAHIA K., 1997.-** Etude de la croissance et des lipides membranaires des cals de haricot *Phaseolus vulgaris* L. : Effets d'un herbicide; le norflurazón. Thèse de Magister. FSB. USTHB. (Alger). pp 105.
- BRADFORD M., 1976.-** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72 : 248 - 254.
- DA SILVA N. S. et FOWLER M. W., 1976.-** The lipid composition of *Acer pseudoplatanus* cells grown in culture. Phytochemistry., 15 : 1735 - 1740.
- Dahlin C. et Franzen L. G., 1997.-** Carotenoid - deficient young wheat etioplasts are able to bind precursor protein on the plastid surface but are impaired in their translocation ability. Physiol. Plant., 99 : 279 - 285.
- DAVIS D. G. et OLSON P. A., 1993.-** Organogenesis in leaf spurge (*Euphorbia esula* L.). In vitro Cell. Dev. Biol., 29 : 97 - 101.
- FITCH M. M. M. et MOORE P. H., 1990.-** Comparison of 2,4-D and picloram for selection of long-term totipotent green callus of sugarcane. Plant Cell, Tissue, Organ. Cult., 20 : 157 - 163.
- FREYSSINET G., 1990.-** Résistance aux herbicides et transfert de gènes. Phytoma., 415 : 9 - 13.
- FRICK H., 1991.-** Callogenesis and carbohydrate utilization in *Lemna minor*. J. Plant Physiol., 137 : 397 - 401.
- GRONWALD J. W., 1991.-** Lipid biosynthesis inhibitors. Weed Sci., 39 : 435-449.

- JOUANNEAU J.P., 1993.-** Contribution à l'étude du rôle moléculaire des cytokinines dans le contrôle de la mitose chez les cellules de tabac. Thèse de Doctorat d'Etat. Paris.
- LAPICHINO G., LEE S.P., CHEN T.H. et FUCHIGAMI L.H., 1991.-** In vitro plant regeneration in *Solanum commersonii*. J. Plant Physiol., 137 : 734 - 738.
- MALIK K.A. et SAXENA P.K., 1991.-** Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L. Promotive role of N<sup>6</sup>-benzylaminopurine in cultures from juvenile leaves. Planta., 184 : 148 - 150.
- MANOHARAN K., PRASAD R. et GUHA-MUKHERJEE S., 1987.-** Greening and shoot-differentiation related lipid changes in callus cultures of *Datura innoxia*. Photochemistry, 26 : 407 - 410.
- MARGARA J., 1989.-** Bases de la multiplication végétative : les méristèmes et l'organogenèse. INRA. Paris.
- MOORE T.S., 1977.-** Phospholipid turnover in soybean tissue cultures. Plant Physiol., 60 : 754 - 758.
- MURASHIGE T. et SKOOG F., 1962.-** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15 : 473 - 497.
- NAWA Y. et OHTANI T., 1992.-** Induction of callus from flesh of *Gardenia jasminoides* Ellis fruit and formation of yellow pigment in the callus. Biosci., Biotech. Biochem., 56 : 1732 - 1736.
- OELMULLER R., 1989.-** Photooxidative destruction of chloroplasts and its effect on nuclear gene expression and extraplasmidic enzyme levels. Photochem. Photobiol., 49 : 229 - 239.
- RANGA-RAO G.V. et PRASAD N.V., 1991.-** Plantlet regeneration from the hypocotyl callus of *Acacia auriculiformis*- Multipurpose tree legume. J. Plant Physiol., 137 : 625 - 627.
- SAGAR A.D., HORWITZ B.A., ELLIOT R.C., THOMPSON W.F. et BRIGGS W.R., 1988.-** Light effects on several chloroplast components in norflurazon-treated pea seedling. Plant Physiol., 88 : 340 - 347.
- SCALLA R., 1991.-** Les herbicides : mode d'action et principes d'utilisation. INRA. Paris. ISBN.

- WILLIAMS M., FRANCIS D., HANN A.C. et HARWOOD J.L., 1991.-**  
Changes in lipid composition during callus differentiation in cultures of  
oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J. Exp. Bot.*, 42 (245) : 1551 - 1556.
- WILLIAMS M., SANCHEZ J., HANN A.C. et HARWOOD J.L., 1993.-**  
Lipid biosynthesis in olive cultures. *J. Exp. Bot.*, 44 (268): 1717 - 1723.
- YURINA N. P. et KLOPPSTECH K., 2001.-** Accumulation of plastid protein  
precursors under norflurazon-induced carotenoid deficiency and  
oxidative stress in barley. *Plant Physiology and Biochemistry.*, 39 (9) :  
807 - 814.