

Aptitude à la callogenèse et à l'embryogenèse somatique de fragments foliaires de trois variétés de sorgho (*Sorghum bicolor* L. Moench) avec et sans tannins

A. Jabri, R. Chaussat, M. Jullien et Y. Le Deunff

Institut national agronomique, Paris-Grignon, Laboratoire de Physiologie végétale, 16, rue Claude-Bernard, 75231 Paris Cedex 05, France

(reçu le 11-7-1988, accepté le 5-10-1988)

Résumé — Des explants foliaires de jeunes plants de sorgho (*Sorghum bicolor* L. Moench) appartenant à trois variétés caractérisées par des teneurs différentes en tannins sont cultivés sur milieu minéral de Murashige et Skoog additionné de 2 mg.l⁻¹ de 2,4-D. L'aptitude à la callogenèse et à la morphogenèse est toujours limitée aux régions proximales des feuilles en croissance. Chez la variété pauvre en tannins, seules les très jeunes feuilles donnent directement des cals blancs embryogènes. Les feuilles plus âgées présentent à leur base une zone dont les explants produisent d'abord des cals jaunes sur lesquels se forment ensuite des cals blancs embryogènes. Elle est surmontée d'une zone intermédiaire donnant uniquement des cals jaunes, dont les potentialités sont limitées à la production de racines. Les régions plus distales ne donnent jamais de cals. Cette dynamique ne se retrouve qu'en partie sur les deux autres variétés à cause de leur génotype ou de leur richesse en tannins.

sorgho – explants foliaires – tannins – embryogenèse somatique

Summary — Callogenesis and somatic embryogenesis ability of leaf portions of three varieties of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) with and without tannins. Leaf explants of young plants of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) of three varieties with different tannin content were cultivated under Murashige & Skoog mineral medium supplemented with 2,4-D (2 mg.l⁻¹). Callogenetic and morphogenetic ability is always limited to proximal areas of growing leaves. In the variety with weak tannin content, only the very young leaves directly produce white embryogenic calli. The older leaves present at their bases an area whose explants produce yellow calli on which white embryogenic callus appears afterwards. Above this area an intermediate leaf portion only produces yellow calli whose ability is limited to root production. The more distal areas never produce calli. This evolution was only partially observed the two other varieties because of genotypic effects or variations in tannin content.

sorghum – foliar explants – tannin – somatic embryogenesis

Introduction

Chez les végétaux, la régénération *in vitro* est bien maîtrisée pour de nombreuses espèces dicotylédones (Flick *et al.*, 1983) mais elle reste encore de pratique difficile chez les monocotylédones (Vasil, 1985). Des bourgeons, ou même des embryons somatiques ont cependant été obtenus à partir de divers types d'explants chez les grami-

nées. Certains explants sont de nature végétative, comme la base de jeunes feuilles de riz (Wernicke *et al.*, 1981), de dactyle (Gray et Conger, 1985), de sorgho (Masteller et Holden, 1970; Wernicke et Brettell, 1982; Cai *et al.*, 1987) ou de blé (Wernicke et Milkovits, 1984), alors que d'autres appartiennent à l'appareil reproducteur. Ce sont alors, soit de jeunes inflorescences (Chen *et al.*, 1982; Boyes et Vasil, 1984; Swedlund et Vasil,

1985), soit des anthères (Schaeffer *et al.*, 1979; Genovesi et Collins, 1982; Rose *et al.*, 1986) soit enfin, et surtout, des embryons immatures (Green et Phillips, 1975; Mott et Cure, 1978; Shimada et Yamada, 1979; Ozias-Akins et Vasil, 1983; Lai et Liu, 1982; Gamborg *et al.*, 1977; Dunstan *et al.*, 1978; Dunstan *et al.*, 1979). Ce qui caractérise les résultats positifs ci-dessus reportés est l'utilisation d'explants tissulaires encore jeunes. Il apparaît donc que les cellules des monocotylédones et des céréales en particulier perdent rapidement leur totipotence. Afin de comprendre les origines de cette perte et éventuellement de rétablir cette potentialité, nous avons entrepris d'examiner l'influence de l'âge des tissus sur l'aptitude à la régénération chez le sorgho (*Sorghum bicolor* L. Moench).

Cette étude a été menée avec des explants foliaires d'âge déterminé prélevés sur trois variétés choisies en raison de leurs richesses différentes en tannins et dont les aptitudes *in vitro* n'avaient pas encore été examinées.

Matériel et Méthodes

Les semences utilisées (fournies par l'Union des coopératives agricoles des semences de Provence, rue Gaspard-Monge, zone industrielle Sud, 13200 Arles, France) appartiennent à la variété Argence, hybride inscrit au catalogue français et à deux lignées SP9 et SP10. Leurs teneurs moyennes en tannins sont de 0,250% pour la première et respectivement de 0,017% et de 1,070% pour les deux autres.

Les semences sont désinfectées pendant 15 min dans une solution à 10% (v:v) d'un désinfectant commercial (Domestos) puis lavées trois fois à l'eau bidistillée stérile. Elles sont ensuite mises à germer aseptiquement en tubes (Pyrex, 20/2 cm) sur 20 ml de milieu de Murashige et Skoog (1962), sans hormone, (milieu MS) additionné de 10 g.l⁻¹ de saccharose et 6 g.l⁻¹ de gélose (Bacto-difco). Les tubes ensemencés sont placés à une température de 24 ± 1°C sous une photopériode de

16 h. L'éclairement de 50 µE .m⁻².s⁻¹ est fourni par des tubes fluorescents Mazda Fluor, lumière du jour.

Six jours après la mise en germination, cinq jeunes plantes par génotype sont prélevées stérilement et les feuilles sont découpées transversalement en fragments de 2 mm sur environ 3 cm à partir de leur base. Le Tableau I montre les longueurs des feuilles au moment du prélèvement.

Les fragments des différentes feuilles sont déroulés, puis ensemencés dans des boîtes de Petri, une boîte contenant l'ensemble des explants correspondant à une plante. Dans les boîtes, les explants sont disposés suivant le rang de la feuille et leur position sur cette feuille. Les boîtes ensemencées sont placées à l'obscurité à 27 ± 1°C. Les explants primaires sont cultivés sur un milieu d'induction MS additionné de 20 g.l⁻¹ de saccharose, 2 mg.l⁻¹ de 2,4-D et 8 g.l⁻¹ de gélose (milieu MS1). Le pH est ajusté à 5,8 avec de la soude normale avant autoclavage (20 min à 120°C, 1 bar).

Les cals obtenus sont transférés sur un milieu de développement (Chu *et al.*, 1975), (milieu N6) contenant 0,1 mg.l⁻¹ d'AIA, 0,5 mg.l⁻¹ de zéatine et 20 g.l⁻¹ de saccharose. Un troisième milieu, MS dilué de moitié et dépourvu de régulateur de croissance (milieu MS2), est utilisé pour assurer la croissance ultérieure des jeunes plantes. Ces deux dernières étapes sont réalisées sous une photopériode de 16 h à une température de 25 ± 1°C.

L'observation des embryons somatiques est réalisée au microscope électronique à balayage selon la technique de préparation de Guiderdoni (1984). Les poids de la matière fraîche et de la matière sèche sont obtenus par une moyenne arithmétique de cinq pesées. La matière sèche est mesurée après une déshydratation des cals à 50°C pendant une nuit. D'autres expériences non rapportées ici ont permis de confirmer les résultats présentés.

Résultats

Examen de la callogenèse et de la morphogénèse

Les premières manifestations de callogenèse sont perceptibles une semaine après la mise en culture sur milieu d'induction. De petits amas tissulaires

Tableau I. Longueur moyenne, avec écart type, du coléoptile (FO), des gaines (G) et des limbes (L) des cinq premières feuilles (F1 à F5) mesurés sur cinq plantes au moment du prélèvement des explants.

Organe prélevé	FO	F1		F2		F3		F4		F5	
		G	L	G	L	G	L	G	L	G	L
Longueur moyenne (mm)	10,12	18,25	20,50	7	46,50	0	6,75	0	4,25	0	0,80
Ecart type	0,85	2,75	1,73	1,60	7,32	0	1,50	0	1,25	0	0,24

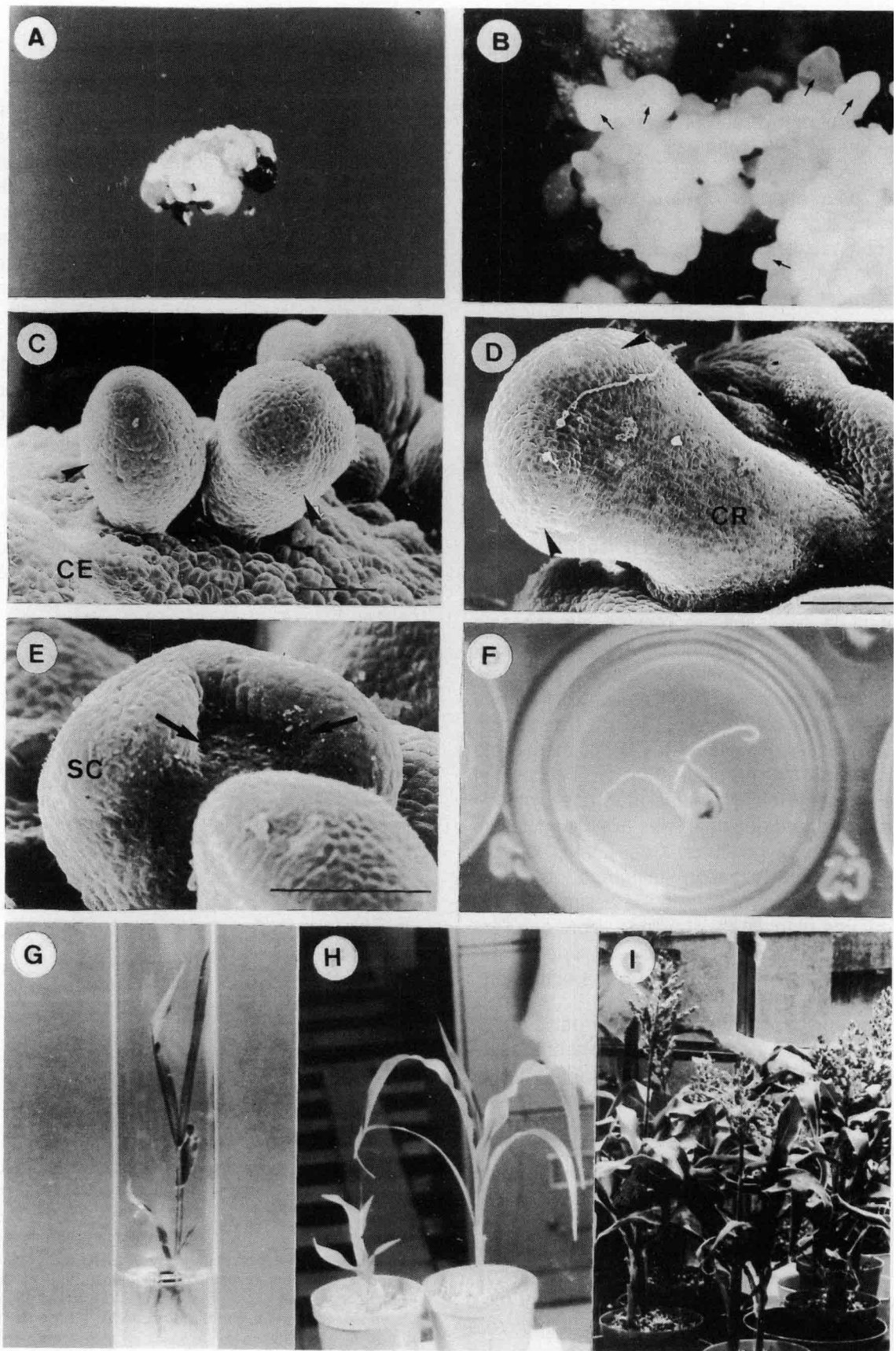


Fig. 1. Principales étapes de la formation et du développement de plantes de sorgho, par embryogenèse somatique, à partir de cal blanc issu de la base de jeunes feuilles de la variété SP9. A : cal blanc compact (5 semaines après le début des cultures); B : apparition d'embryoïdes à la surface du cal (7 semaines); C : embryoïdes de formes subglobulaires; D : embryoïde s'élargissant au sommet (têtes de flèches); E : formation d'une dépression centrale (flèches); F : germination et enracinement d'un embryon zygotique isolé; G : développement de plante régénérée (11 semaines); H : croissance de plantes sur vermiculite après repiquage en pots (20 semaines); I : floraison de plusieurs plantes régénérées (24 semaines).

apparaissent au niveau des sections, puis ce phénomène se propage sur le reste de l'explant. On observe, le plus souvent, la formation d'un cal jaune fortement hydraté et d'aspect homogène. Chez la variété SP9, cette callogenèse se poursuit pendant environ trois à quatre semaines et peut ensuite, pour certains niveaux de prélèvement, donner naissance à un deuxième type de cal, blanc, compact et présentant des aspérités nodulaires (Fig. 1A). Ce deuxième type de cal apparaît généralement à partir des régions superficielles du premier, en contact avec le milieu de culture. La production d'un cal blanc nécessite donc la formation préalable d'un cal jaune. Toutefois, dans quelques cas particuliers, nous verrons que des cals blancs peuvent naître directement sur des explants ensemencés.

Même si, sur des cals blancs, quelques structures globulaires ont pu réaliser un début de développement sur milieu d'induction, il faut attendre le transfert sur milieu N6 pour obtenir des ensembles cellulaires organisés. On constate alors systématiquement la formation de racines sur les cals jaunes et des structures qualifiées d'embryoïdes (Fig. 1B, flèches), sur les cals blancs. De forme d'abord subglobulaire (Fig. 1C, têtes de flèches), les embryoïdes s'élargissent à leur sommet en forme d'éventail (Fig. 1D, têtes de flèches). Une dépression se met en place (Fig. 1E, flèches), et dès le troisième ou quatrième jour, une symétrie bilatérale suggère des analogies avec le scutellum des embryons zygotiques. Ces analogies sont confirmées par l'initiation ultérieure, dans la dépression, d'une première feuille assimilable à la piléole d'une plantule de graminée, alors que l'ensemble reste attaché au cal par une sorte de cordon jouant, vraisemblablement, un rôle nourricier.

Après repiquage, isolément ou par petits amas, sur le milieu MS2 les embryoïdes croissent, développent des feuilles et s'enracinent (Fig. 1F) en même temps. Les individus ainsi obtenus sont repiqués en tube (Fig. 1G) puis, ayant produit 5 ou 6 feuilles, ils sont placés dans des pots (Fig. 1H), pour vérifier que leur cycle morphogénétique est analogue à celui des plantes issues de graines et, qu'en particulier, ils fleurissent (Fig. 1) et produisent normalement de nouvelles semences. Les cals blancs sont ainsi capables d'initier des structures, comparables à des embryons et dont elles ont les aptitudes morphogénétiques. On notera que des racines peuvent aussi s'individualiser sur les cals blancs; leur formation, généralement tardive, ne compromet pas l'organogenèse caulinaire.

Localisation de l'aptitude à la callogenèse

L'aptitude à la callogenèse des explants prélevés à différents niveaux des organes foliaires de plantes âgées de six jours est présentée sur la Figure 2. On constate que l'obtention de cals est toujours limitée aux régions proximales sur une longueur ne dépassant pas 4 à 6 mm. Les potentialités de callogenèse affectent la totalité de la cinquième feuille et une proportion importante des limbes de la troisième et quatrième feuille. Les explants callogènes les plus nombreux sont obtenus sur la deuxième feuille. L'aptitude est réduite au niveau de la première feuille et s'annule pour le coléoptile. On note que cette aptitude concerne aussi bien les tissus du limbe en croissance, alors qu'il est très jeune (F3, F4, F5) que ceux de la gaine en fin de croissance (F1, F2).

Tandis que les explants de la cinquième feuille sont capables de former directement des cals blancs embryogènes, une majorité d'explants pro-

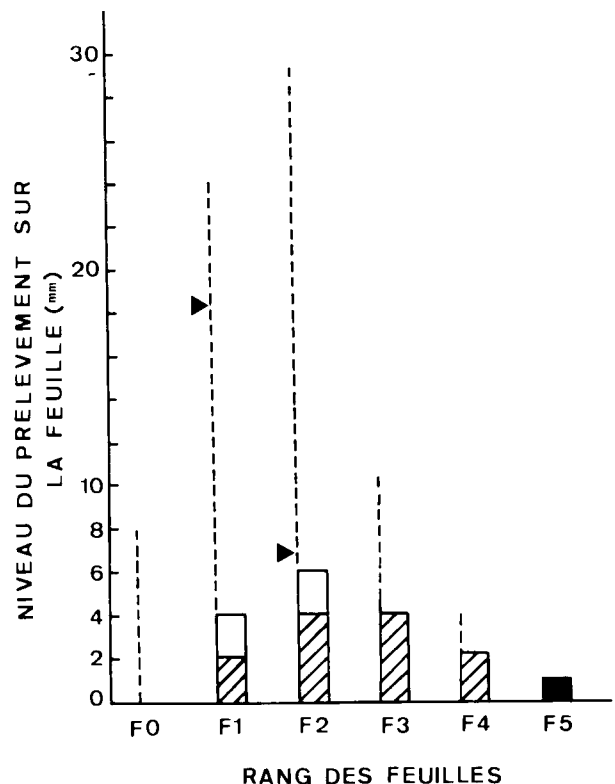


Fig. 2. Callogenèse obtenue *in vitro* à partir des explants prélevés à différents niveaux du coléoptile (F0) et des cinq premières feuilles (F1 à F5) d'une plantule âgée de 6 jours de la variété SP9. Le niveau 0 correspond à la base de l'organe. Le signe (▶) représente la position de la ligule séparant la gaine du limbe. - - - : Explants inaptes à la callogenèse; □ : explants donnant uniquement des cals jaunes non embryogènes; ▨ : explants donnant d'abord des cals jaunes puis des cals blancs embryogènes; ■ : explants donnant directement des cals blancs embryogènes.

duisent d'abord des cals jaunes sur lesquels apparaissent plus tard des cals blancs embryogènes. On observe enfin sur les feuilles de rang 1 et 2 la présence d'une zone intermédiaire à partir de laquelle seuls des cals jaunes non embryogènes (Fig. 2) peuvent être produits.

Effet du génotype

Les aptitudes à la callogenèse précédemment précisées pour des explants de la variété SP9 ne sont pas générales. La Figure 3 montre que certains explants des deux autres variétés utilisées, conduisent à un brunissement important du milieu qui les entoure et deviennent alors incapables de produire un cal. Ce brunissement qui ne concerne que quelques explants chez Argence atteint une majorité d'entre eux chez SP10, variété très riche en tannins. La pigmentation affecte plus particulièrement les explants provenant de l'ensemble des feuilles âgées ou des parties apicales de feuilles plus jeunes. Chez la variété très riche en tannins, la callogenèse ne reste possible qu'à la base des très jeunes feuilles (Fig. 3).

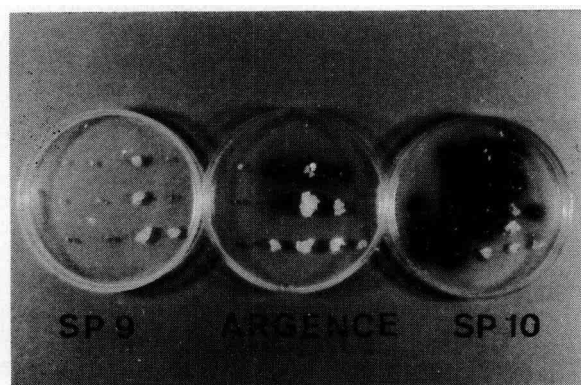


Fig. 3. Production de pigments bruns et de cal chez trois variétés de sorgho caractérisées par différentes teneurs en tannins (SP9, pauvre; Argence, moyennement riche et SP10, très riche) après 4 semaines de culture des explants foliaires sur le milieu d'induction.

La comparaison du poids de la matière fraîche et de la matière sèche des cals jaunes, obtenues à partir des trois premières feuilles des variétés Argence et SP9 (Fig. 4) montre une nette différence en faveur de l'hybride, surtout en ce qui concerne les explants de la deuxième feuille. Les cals de la variété Argence, pourtant plus riche en tannins, ont une croissance plus grande que ceux de la variété SP9.

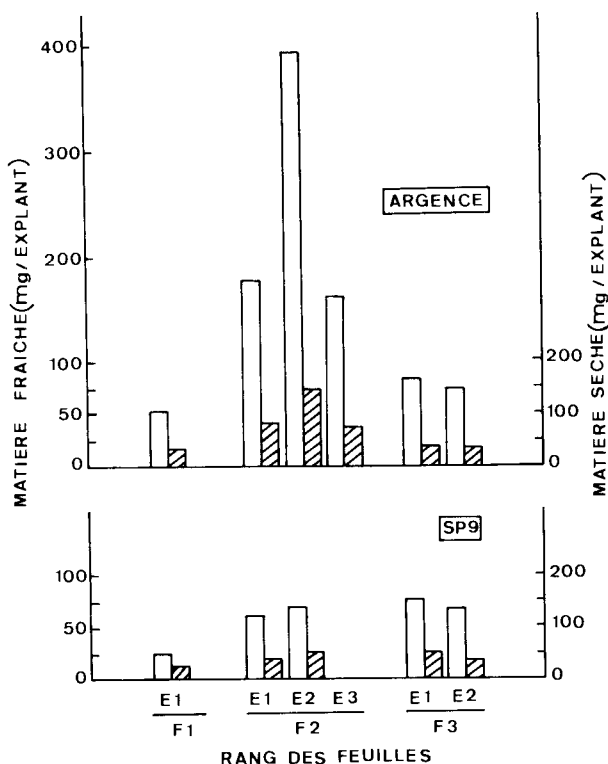


Fig. 4. Poids de matière fraîche (□) et de matière sèche (▨) des cals produits à partir d'explants (E), prélevés à la base des trois premières feuilles (F1 à F3) des variétés Argence et SP9, après 4 semaines de culture. E1 à E3 : niveaux de prélèvement. E1 de 0 à 2 mm. E2 de 2 à 4 mm et E3 de 4 à 6 mm à partir de la base des feuilles.

Signalons enfin que la callogenèse observée sur la variété Argence, bien que vigoureuse, se limite à la formation de cals jaunes rhizogènes. Les explants, dans nos conditions expérimentales, sont incapables de produire des cals blancs embryogènes analogues à ceux observés chez la variété SP9. Comme cela a déjà été démontré chez d'autres graminées (Sharman *et al.*, 1980), l'aptitude morphogénétique *in vitro* paraît donc dépendre fortement du génotype.

Discussion et Conclusion

Les explants prélevés sur les feuilles de jeunes plants de sorgho et cultivés *in vitro* manifestent des aptitudes très variées. Les uns, provenant des parties distales des feuilles les plus âgées ne réagissent pas, alors que d'autres, d'origine basale, forment des cals. Dans nos conditions expérimentales, la formation de cals jaunes ne produisant que des racines traduit une aptitude morphogénétique réduite alors que les cals

blancs, capables par une morphogenèse caulinaire et racinaire d'engendrer une nouvelle plante témoignent d'une aptitude morphogénétique complète.

Compte tenu de la localisation des méristèmes intercalaires des feuilles de graminées, il est évident que la totipotence reste l'apanage des ensembles cellulaires encore méristématiques et que la perte d'aptitude morphogénétique accompagne la différenciation cellulaire, comme cela a été signalé sur le *Pennisetum* (Haydu et Vasil, 1981) et la canne à sucre (Bonnel *et al.*, 1983; Guiderdoni, 1986).

Nos résultats suggèrent que la perte d'aptitude morphogénétique s'installe selon une dynamique progressive. Tout d'abord sur les explants prélevés à la base des très jeunes feuilles, la production directe de cals blancs embryogènes représente la manifestation la plus favorable de la totipotence dans nos conditions expérimentales. Mais le plus souvent, sur des explants de la base des feuilles, l'expression de la totipotence exige un cheminement en deux étapes : production de cals jaunes puis de cals blancs embryogènes. Ce processus de régénération, en deux étapes, semble très général chez les graminées puisqu'il a déjà été observé à partir de différents organes tels que des embryons de blé (Shimada et Yamada, 1979), des feuilles de riz (Wernicke *et al.*, 1981), de divers *Triticum* (Wernicke et Milkovits, 1984) et d'autres variétés de sorgho (Wernicke et Brettell, 1980).

Enfin les explants de position intermédiaire, obtenus à partir des feuilles les plus âgées de la variété SP9, uniquement capables de produire des cals rhizogènes, fournissent des ensembles cellulaires ayant perdu une partie de leur aptitude. Cette perte devient complète au cours de la différenciation ultérieure.

Cependant la dynamique, établie pour l'essentiel à l'aide d'explants foliaires de la variété SP9, est loin d'être générale. Les deux autres cultivars illustrent les différences de comportement. Les explants de SP10 sont en majorité incapables d'assurer une callogenèse notable, alors que ceux d'Argence n'ont pu produire de cal embryogène.

Parmi les causes de ces différences, on note tout d'abord la présence de phénols bien connus pour leur action inhibitrice sur la callogenèse (Monaco *et al.*, 1977). Leur teneur, plus élevée pour SP10 que pour Argence, semble constituer également chez le sorgho un handicap proportionnel à la richesse de chaque variété. L'influence des phénols tend cependant à s'estomper lorsque les explants sont prélevés sur de très jeunes feuilles.

L'inaptitude de la variété Argence, à produire des cals embryogènes pose, par ailleurs, un problème complexe. Il est possible que l'aptitude morphogénétique des explants soit perdue plus précocement chez cette variété hybride et que les explants prélevés dans nos expériences soient déjà trop différenciés. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en prélevant des primordia encore plus proches de l'apex. Mais il est possible aussi que le milieu utilisé ne soit pas adapté pour révéler la totipotence des cellules de cette variété. Une attention particulière est à porter à la teneur en 2,4-D. On sait en effet que les céréales présentent une sélectivité à ce désherbant et qu'une telle variabilité du comportement a été montrée *in vitro* chez le blé (Wernicke et Milkovits, 1984). En augmentant la concentration en 2,4-D, ces auteurs ont pu étendre l'aptitude à la callogenèse aux régions apicales des feuilles de jeunes plantes.

Ces observations suggèrent que si l'on veut obtenir des régénérations à partir de cellules ou de protoplastes de feuilles de sorgho et probablement d'autres graminées, mieux vaudra les prendre dans les régions manifestant le maximum de potentialités, c'est-à-dire les parties proximales des feuilles les plus jeunes. Chez les sorghos riches en tannins, ces régions présentent, en plus, l'avantage de ne pas produire de phénols *in vitro*. Cependant, pour certaines variétés particulièrement réfractaires, on devra sûrement aussi rechercher de nouveaux équilibres hormonaux pour rétablir la totipotence cellulaire.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier Mme le Pr Nougarede pour la lecture du manuscrit et les remarques fructueuses qu'elle a apporté.

Références

- Bonnel E., Demarly Y. & Essad S. (1983) Evolution anatomique des tissus foliaires de canne à sucre (*Saccharum* sp.) cultivés *in vitro*. *Can. J. Bot.* 61, 830-836
- Boyes C.J. & Vasil I.K. (1984) Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured young inflorescences of *Sorghum arundinaceum* (DESV.) stapf. var. sudanense (Sudan grass). *Plant Sci. Lett.* 35, 153-157
- Cai T., Daly B. & Butler B. (1987) Callus induction and plant regeneration from shoot portions of mature embryos of high tannin sorghums. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 9, 245-252

- Chen C.H., Chen L.F., Lo L.F. & Ross J.G. (1982) Plant regeneration from cultured inflorescences of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Euphytica* 31, 19-23
- Chu C.C., Wang C.C. & Sun C.S. (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* 28, 659-668
- Dunstan D.I., Short K.C. & Thomas E. (1978) The anatomy of secondary morphogenesis in cultured scutellum tissues of *Sorghum bicolor*. *Protoplasma* 97, 251-260
- Dunstan D.I., Short K.C., Dhaliwal H. & Thomas E. (1979) Further studies on plantlet production from cultured tissues of *Sorghum bicolor*. *Protoplasma* 101, 355-361
- Flick C.E., Evans D.A. & Sharp W.R. (1983) Organogenesis. In: *Handbook of Plant Cell Culture* (Evans *et al.*, eds.), MacMillan, New York, vol. 1
- Gamborg O.L., Shyluk J.P., Brar R.S. & Constabel F. (1977) Morphogenesis and plant regeneration from callus of immature embryos of sorghum. *Plant Sci. Lett.* 10, 67-74
- Genovesi A.D. & Collins G.B. (1982) *In vitro* production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Sci.* 22, 1137-1144
- Gray D.J. & Conger B.V. (1985) Time-lapse light photomicrography and electron microscopy of somatic embryo ontogeny from cultured leaves of *Dactylis glomerata* (Gramineae). *Trans. Am. Microsc. Soc.* 104, 4, 395-399
- Green C.E. & Phillips R.L. (1975) Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Sci.* 15, 417-421
- Guiderdoni E. (1984) Etude des cultures *in vitro* de tissus, de cellules et de protoplastes de canne à sucre (*Saccharum* sp.). Callogenèse et embryogenèse somatique. Thèse de troisième cycle. Développement et amélioration des végétaux, Orsay
- Guiderdoni E. (1986) L'embryogenèse somatique des explants foliaires de canne à sucre (*Saccharum* sp.) cultivés *in vitro*. I. Initiation des cultures. *Agron. Trop.* 40, 50-59
- Haydu Z. & Vasil I.K. (1981) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues and anthers of *Pennisetum purpureum* S. *Theor. Appl. Genet.* 59, 262-273
- Lai K.L. & Liu L.F. (1982) Induction and plant regeneration of callus from immature embryos of rice plants (*Oryza sativa* L.). *Jpn. J. Crop Sci.* 51, 1, 70-74
- Masteller V.J. & Holden D.J. (1970) The growth of and organ formation from callus tissue of sorghum. *Plant Physiol.* 45, 362-364
- Monaco L.C., Söndahl M.R., Cavalho A., Crocomo O.J. & Sharp W.R. (1977) Applications of tissue cultures in the improvement of coffee. In: *Plant Cell. Tissue Organ Culture* (Reinert J. and Bajaj Y.P.S., eds), Springer Verlag, pp. 109-129
- Mott R.L. & Cure W.W. (1978) Anatomy of maize tissue cultures. *Physiol. Plant.* 42, 139-145
- Murashige T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497
- Ozias-Akins P. & Vasil I.K. (1983) Improved efficiency and normalization of somatic embryogenesis in *Triticum aestivum* (wheat). *Protoplasma* 117, 40-44
- Rose J.B. Dunwell J.M. & Sunderland N. (1986) Anther culture of *Sorghum bicolor*. I. Effect of panicle pretreatment, anther incubation temperature and 2,4-D concentration. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 6, 15-22
- Schaeffer G.W., Baenziger P.S. & Worley J. (1979) Haploid plant from anthers and *in vitro* embryo culture of wheat. *Crop Sci.* 19, 697-702
- Sharman G.C., Bello L.L. & Sapra V.T. (1980) Genotypic differences in organogenesis from callus of ten triticales lines. *Euphytica* 29, 751-754
- Shimada T. & Yamada Y. (1979) Wheat plants regenerated from embryo cell cultures. *Jpn. J. Genet.* 54, 379-385
- Swedlund B. & Vasil I.K. (1985) Cytogenetic characterization of embryogenic callus and regenerated plants of *Pennisetum americanum* (L.) Schum. *Theor. Appl. Genet.* 69, 575-581
- Vasil I.K. (1985) Somatic embryogenesis and its consequences in the gramineae. In: *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*. Plenum Publ. Corp., pp. 31-47
- Wernicke W. & Brettell R. (1980) Somatic embryogenesis from *Sorghum bicolor* leaves. *Nature* 287, 138-139
- Wernicke W. & Brettell R. (1982) Morphogenesis from cultured leaf tissue of *Sorghum bicolor* – culture initiation. *Protoplasma* 111, 19-27
- Wernicke W. & Milkovits (1984) Developmental gradients in wheat leaves – response of leaf segments in different genotypes cultured *in vitro*. *J. Plant Physiol.* 115, 49-58
- Wernicke W., Brettell R., Wakisaka T. & Potrikus I. (1981) Adventitious embryoïd and root formation from rice leaves. *Z. Pflanzenphysiol.* 103, 361-365