

# Effets du méthomyl sur les tissus de maïs (*Zea Mays* L.) à cytoplasme normal ou à cytoplasme Texas en culture *in vitro*

B. Houndonougbo <sup>\*1</sup> et A. Bervillé <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Université nationale du Bénin, faculté des sciences et techniques, laboratoire de biologie végétale, Abomey-Calavi, BP 526 Cotonou, Bénin;

<sup>2</sup> INRA, station d'amélioration des plantes, BV 1540, 21034 Dijon Cedex, France

(reçu le 5 janvier 1988, accepté le 30 mai 1989)

**Résumé** — Les tissus mis en culture *in vitro* sont des scutellums immatures, et des rondelles de coléoptile de maïs à cytoplasme normal ou à cytoplasme Texas. Les tissus de maïs à cytoplasme normal sont résistants alors que ceux à cytoplasme Texas sont sensibles au méthomyl. Le méthomyl inhibe l'initiation et la croissance des cals des tissus à cytoplasme Texas alors que celles des tissus à cytoplasme normal ne sont pas affectées (Tableau II; Fig. 1). L'inhibition de la croissance des tissus à cytoplasme Texas sous l'action de 3,6 mM de méthomyl apparaît létale et irréversible tandis que les tissus à cytoplasme normal continuent à croître comme les tissus non traités au méthomyl. La sensibilité au méthomyl se révèle un marqueur spécifique du cytoplasme Texas.

La régénération de plantes a été réalisée chez les génotypes à cytoplasme normal : A188N, W64AN, F7N ou à cytoplasme Texas : A188T, W64AT et F7T, à partir des cals issus de scutellums immatures ou de rondelles de coléoptile de 1 à 2 mm d'épaisseur (Tableau III; Fig. 2). Les plantes à cytoplasme normal, régénérées sur le milieu de base (Tableau I), contenant 36 µM de méthomyl et 4,5 µM de 2,4-D ou 3,6 µM de méthomyl et 0,45 µM de 2,4D, sont mâle-fertiles et résistantes au méthomyl et les plantes à cytoplasme Texas néoformées, dans les mêmes conditions, sont demeurées mâle-stériles cytoplasmiques et sensibles au méthomyl.

**méthomyl – *Zea mays* L. – cytoplasme normal – cytoplasme Texas**

**Summary** — Effects of methomyl on the tissues of maize (*Zea mays* L.) with normal cytoplasm or Texas cytoplasm in *in vitro* culture. The tissues culture *in vitro* were immature scutellums, and coleoptile round slices of maize with normal or Texas cytoplasm. The maize tissues with normal cytoplasm were resistant while those with Texas cytoplasm were sensitive to methomyl. Methomyl inhibited the initiation and growth of the calluses from tissues with Texas cytoplasm, whereas those with normal cytoplasm were not affected (Table II; Fig. 1). The inhibition of the growth of Texas cytoplasm tissues under the action of 3.6 mM methomyl appeared lethal and irreversible while normal cytoplasm tissues continued to grow in the same manner as those not treated with methomyl. The sensitivity to methomyl appears as a specific marker for the Texas cytoplasm.

The regeneration of plants has been carried out in the genotypes with normal – A188N, W64AN, F7N – or Texas cytoplasm : A188T, W64T, F7T from calli formed on immature scutellums or coleoptile round slices 1 to 2 mm thick (Table III; Fig. 2). The regenerated plants with normal cytoplasm on the basic medium (Table I) containing 36 µM of methomyl and 4.5 µM of 2.4-D or 3.6 µM of methomyl and 0.45 µM of 2.4-D are male-fertile and resistant to methomyl, while the neoformed plants with Texas cytoplasm under the same conditions, remained cytoplasmic male-sterile and sensitive to methomyl.

**methomyl – *Zea mays* L. – normal cytoplasm – Texas cytoplasm**

## INTRODUCTION

Les toxines spécifiques ont fait l'objet de récentes investigations grâce à la technique de culture *in vitro*. C'est ainsi, par exemple, que Gengenbach & Green (1975) ont obtenu des cals résistants à *Helminthosporium maydis* race T, en mettant en culture des scutellums de maïs MSC-T sur un milieu synthétique contenant la

toxine partiellement purifiée; que Person & Horner (1976) ont observé le ralentissement de la croissance des cals, issus de mésocotyle de plantes mâle-stériles cytoplasmiques Texas (MSC-T) lorsqu'ils ont ajouté au milieu de culture la toxine d'*H. maydis* race T. De même Gengenbach *et al.* (1977) ont cultivé des scutellums de plantes MSC-T en présence de toxine d'*H. maydis* race T et ont régénéré, après 12 cycles de

\* Nouvelle adresse : 11/3/12, rue Ronsard, 59650 Villeneuve d'Asq, France.

repiquages, 65 plantes résistantes dont 13 sont mâle-stériles. Les 52 autres plantes sont entièrement fertiles. Jaubertie *et al.* (1978) ont effectué des recherches de variants résistants à la T-toxine par la technique de culture de cellules et de tissus végétaux, sans succès pour les génotypes utilisés.

Les études réalisées par Humaydan & Scott (1977); Berville (1979) et Houndonoubo (1984) ont montré la toxicité du méthomyl vis-à-vis du cytoplasme Texas : sur feuilles, sur tissus en culture, sur protoplastes et sur mitochondries isolées. En absence de méthomyl la prolifération des cellules de plantes Texas est comparable à celle des plantes à cytoplasme normal. En revanche, en présence de méthomyl, la prolifération des cellules Texas est inhibée alors que celle de plantes à cytoplasme normal n'est pas affectée (Houndonoubo, 1984).

Il nous a alors paru intéressant d'étudier les effets de différentes concentrations de méthomyl sur la prolifération cellulaire (callogenèse) et le phénomène de régénération de plantes manifestés par les tissus de maïs traités par le carbamate méthomyl.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Matériel végétal utilisé

Toutes les semences certifiées des génotypes de maïs utilisés proviennent de la station d'amélioration des plantes de l'INRA de Clermont-Ferrand, du domaine Brunehaut, Estrées-Mons-de-Péronne, de la station expérimentale du maïs de Saint-Martin-de-Hinx et de la Société française des semences de maïs. Nous avons utilisé pour nos expériences les lignées A188N, W64AN, F7N mâle-fertiles sur cytoplasme normal ainsi que ces mêmes lignées converties sur cytoplasme mâle-stérile Texas (A188T, W64T, F7T).

### Méthodes

Le méthomyl a été recristallisé du lannate selon la méthode décrite par Aranda *et al.* (1981). Nous avons incorporé au milieu de base (Tableau I) différentes concentrations : 0 M, 3,6  $\mu$ M, 36  $\mu$ M, 0,36 mM, 3,6 mM de méthomyl et 0 M, 0,045  $\mu$ M, 0,45  $\mu$ M, 4,5  $\mu$ M, 9  $\mu$ M d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D). Ce milieu est autoclavé à 115 °C durant 20 min après ajustement du pH à 5,8 à l'aide de soude 0,1 N. Il est ensuite coulé en boîtes de Petri stériles en plastique de 55 ou 90 mm de diamètre.

Les plantes mères sur lesquelles les scutellums immatures sont prélevés sont cultivées en serre où la température est d'environ 25 °C le jour et 18 °C la nuit. Les épis sont prélevés à partir du 14<sup>e</sup> jusqu'au 26<sup>e</sup> jour après la pollinisation manuelle. Après ablation des spathes, les épis sont stérilisés dans une solution d'hypochlorite de calcium à 7% durant 20 min puis rincés 3

Tableau I. Milieu de base.

Macro-éléments : Murashige et Skoog (1962)	
Micro-éléments : Murashige et Skoog (1962)	
Acide nicotinique	5 mg l <sup>-1</sup>
Pyrodoxine HCl	1 mg l <sup>-1</sup>
Thiamine HCl	1 mg l <sup>-1</sup>
Méso-inositol	100 mg l <sup>-1</sup>
Glycine	2 mg l <sup>-1</sup>
Saccharose	20 mg l <sup>-1</sup>
Agar	8 mg l <sup>-1</sup>

fois à l'eau distillée stérile. Les scutellums immatures sont prélevés de 14 à 26 jours après la fécondation dans la partie médiane de l'épi.

Pour obtenir des coléoptiles, des grains secs et mûrs sont trempés dans de l'alcool à 70° pendant 10 min, ensuite dans l'hypochlorite de calcium à 7% pendant 20 min. Ils sont rincés 3 fois à l'eau distillée stérile. Ils sont réhydratés dans de l'eau distillée stérile pendant 72 h en agitation rotative (70 tours/min) à 25±1 °C à la lumière du jour. Ils sont ensuite rincés 3 fois à l'eau distillée stérile et cultivés en condition stérile sur un milieu solide ne contenant que de l'eau et 0,8% d'agar. Après 4 jours de culture sur ce milieu dans une étuve à 25±1 °C à la lumière avec une photopériode de 8 h, une intensité lumineuse d'environ 2 500 erg cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> (tubes Sylvania Grolux), les coléoptiles sont prélevés et débités en rondelles d'environ 1 à 2 mm d'épaisseur.

Les scutellums immatures, soit 216 scutellums par génotype, et les rondelles de coléoptiles sont ensemençés en boîte de Petri contenant du milieu de culture. Les boîtes de Petri sont serties de bandes de Parafilm et sont alors portées dans une salle de culture à 25±1 °C, à la lumière avec une photopériode de 16 h et une intensité lumineuse d'environ 2 500 erg cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> au niveau des explants.

Après 15 jours de culture, des scutellums Texas traités par 3,6 mM de méthomyl sont rincés 3 fois à l'eau distillée stérile afin d'éliminer le méthomyl. Ils sont ensuite transférés sur le milieu de base, neuf, contenant seulement 9  $\mu$ M de 2,4-D. Après un mois de culture, le rythme de croissance permet un cycle de repiquage des cals verts embryogènes en 15 jours. Nous avons déterminé le poids de matière sèche en mg des explants, une fois le rythme de croissance atteint, soit après le premier mois de culture.

En fin de culture, nous avons procédé au dénombrement des plantes régénérées.

Nous avons éprouvé la résistance en cours de végétation à l'aide de la scarification des feuilles de jeunes plantes régénérées de maïs cultivées en serre et du dépôt sur la blessure de 10  $\mu$ l de 0,123 M de méthomyl et sur la blessure servant de témoin 10  $\mu$ l d'eau distillée.

## RÉSULTATS

### Callogenèse

L'addition de 3,6 mM de méthomyl au milieu de base (Tableau I) inhibe complètement la crois-

sance des scutellums immatures des génotypes de maïs à cytoplasme Texas : A188T et W64AT tandis que, dans les mêmes conditions, la croissance des scutellums des génotypes à cytoplasme normal : A188N et W64N est analogue à celle des tissus témoins, non traités par le méthomyl (Tableau II).

Le poids des cals obtenus sur les scutellums immatures de plantes Texas après un mois de culture sur le milieu de base contenant 3,6 mM de méthomyl avec ou sans 2,4-D est nul. Les doses plus faibles de méthomyl – 0,36 mM, 36  $\mu$ M, 3,6  $\mu$ M – retardent l'apparition des cals ainsi que leur croissance ultérieure.

Le méthomyl bloque, dès le début de son application, la multiplication cellulaire (Tableau II; Fig. 1). Après 15 jours de culture sur le milieu de base contenant 3,6 mM de méthomyl et 9  $\mu$ M de 2,4-D, 72 scutellums immatures Texas sont rin-

cés 3 fois à l'eau distillée stérile et sont transférés sur un milieu de base, neuf, renfermant 9  $\mu$ M de 2,4-D sans méthomyl. Ils ne croissent pas, après un mois de culture sur ce dernier milieu (non montré). En revanche, dans les mêmes conditions de culture, les scutellums immatures à cytoplasme normal : A188N et W64AN continuent à croître comme les tissus témoins traités par le méthomyl.

Le méthomyl n'inhibe pas la croissance des tissus à cytoplasme normal. Ces tissus sont résistants au méthomyl. Les effets du méthomyl sur les tissus de maïs à cytoplasme Texas sont spécifiques.

### Régénération de plantes

#### Régénération de plantes à partir des rondelles de coléoptile

Des rondelles de 1 à 2 mm d'épaisseur de coléoptile de maïs en culture *in vitro* sur le milieu de base (Tableau I) contenant du méthomyl et du 2,4-D initient des cals, mais très souvent, la plupart forment rapidement des racines et développent des plantes entières (Tableau III; Fig. 2). Cette forme de multiplication végétative *in vitro* se réalise aisément chez les génotypes de maïs à cytoplasme normal : A188N, W64AN et F7N. En revanche, chez les génotypes à cytoplasme Texas : A188T, W64AT et F7T, quelques plantes ont pu être régénérées seulement pour les très faibles doses de méthomyl 36  $\mu$ M et 3,6  $\mu$ M (Tableau III). Les plantes néoformées ont été repiquées en terre à la serre. Celles qui ont pu se développer ont fleuri et ont produit des grains. Les plantes néoformées à cytoplasme normal

Poids moyen des cals formés en mg de matière sèche par scutellum immature

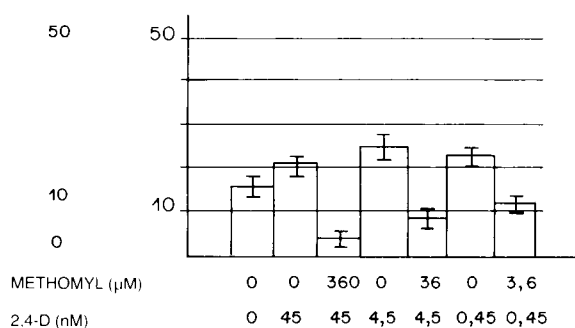


Fig. 1. Action du méthomyl et du 2,4-D sur la callogenèse des scutellums immatures de maïs à cytoplasme Texas (A188T). I = intervalle de confiance.

Tableau II. Indication du poids moyen de cal formé en mg de matière sèche par scutellum immature pour un mois de culture (intervalle de confiance  $\alpha = 5\%$ ).

Méthomyl	0	3,6 mM	0	0,36 mM	0
2,4-D	0	0	0,04 5 $\mu$ M	0,045 $\mu$ M	4,5 $\mu$ M
A188N	13,0 $\pm$ 1,4 <sup>(a)</sup>	11,1 $\pm$ 1,3	14,1 $\pm$ 1,5	12,6 $\pm$ 1,3	22,6 $\pm$ 2,4
A188T	15,9 $\pm$ 1,7	0	19,8 $\pm$ 1,9	4,1 $\pm$ 0,4	24,6 $\pm$ 1,9
W64AN	15,1 $\pm$ 2,0	13,2 $\pm$ 1,9	18,2 $\pm$ 2,0	16,3 $\pm$ 2,0	24,1 $\pm$ 1,9
W64AT	17,9 $\pm$ 1,9	0	21,8 $\pm$ 1,3	4,4 $\pm$ 0,2	25,1 $\pm$ 2,8

Méthomyl	36 $\mu$ M	0	3,6 $\mu$ M	0	3 600 $\mu$ M
2,4-D	4,5 $\mu$ M	0,45 $\mu$ M	0,45 $\mu$ M	9 $\mu$ M	9 $\mu$ M
A188N	21,8 $\pm$ 2,3	19,0 $\pm$ 2,6	18,0 $\pm$ 2,6	29,7 $\pm$ 2,0	27,7 $\pm$ 2,0
A188T	8,2 $\pm$ 0,7	22,9 $\pm$ 2,5	11,5 $\pm$ 1,2	22,7 $\pm$ 2,1	0
W64AN	23,1 $\pm$ 1,8	22,8 $\pm$ 2,1	22,0 $\pm$ 2,1	24,5 $\pm$ 2,4	22,6 $\pm$ 2,2
W64AT	8,4 $\pm$ 1,0	24,4 $\pm$ 1,4	12,2 $\pm$ 0,7	26,9 $\pm$ 1,8	0

(a) : 216 scutellums par répétition.

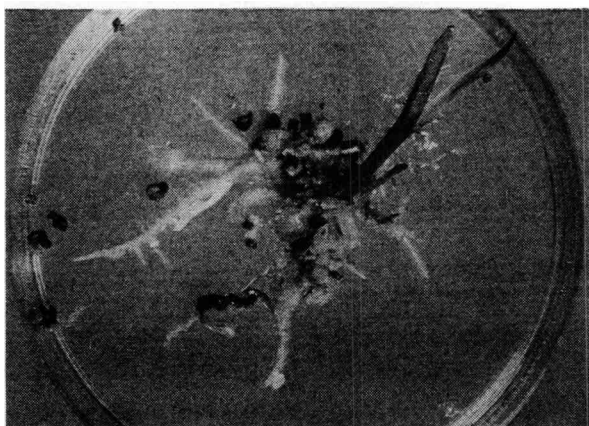
**Tableau III.** Indication du nombre de plantes régénérées par milieu et par génotype à partir de rondelles de coléoptile de maïs à cytoplasme normal (N) ou à cytoplasme Texas (T) et total des plantes régénérées par génotype.

Méthomyl 2,4-D	0	0,045 µM	0,45 µM	4,5 µM	9 µM	Total (1)
A188N	19	18	17	13	5	72
A188T	15	11	8	5	3	42
W64AN	7	6	3	2	1	19
W64AT	18	15	7	6	3	49
F7N	3	2	1	1	1	8
F7T	10	9	5	3	1	28

Méthomyl 2,4-D	0	0,36 mM	36 µM	3,6 µM	3,6 µM	Total (1)
	0	0,045 µM	4,5 µM	0,45 µM	9 µM	
A188N	19	8	5	6	1	39
A188T	15	0	3	5	0	23
W64AN	7	5	1	3	1	17
W64AT	18	0	1	3	0	22
F7N	3	1	1	1	1	7
F7T	10	0	2	3	0	15

(1) : Total des plantes régénérées par génotype.

**Fig. 2.** Régénération de plante à partir d'une rondelle de 1 à 2 mm d'épaisseur de coléoptile de maïs (*Zea mays* L.) à cytoplasme Texas (A188T) en culture *in vitro* sur le milieu de Murashige et Skoog (1962) contenant 3,6 µM de méthomyl et 0,45 µM de 2,4-D.

sont mâle-fertiles et résistantes au méthomyl et les plantes régénérées à cytoplasme Texas sont mâle-stériles cytoplasmiques et sensibles au méthomyl.

## DISCUSSION

L'initiation des cals *in vitro* sur divers milieux sans toxine spécifique à partir de scutellums immatures, de fragments de mésocotyle et de coléoptile de maïs ainsi que la régénération de plantes entières ont été réalisées par Green & Phillips (1975), Harms *et al.* (1976), Vuillaume & Deshayes (1977), Raffail (1978), Beckert & Pol-

lacek (1979), Torne *et al.* (1980). L'effet stimulant du 2,4-D sur la croissance est important.

Les résultats de notre étude sur les effets du méthomyl sur les tissus de maïs à cytoplasme normal ou à cytoplasme Texas nous suggèrent les idées suivantes.

En présence de méthomyl les tissus à cytoplasme Texas sont inhibés *in vitro* quel que soit le critère de croissance choisi, alors que ceux à cytoplasme normal continuent à croître. La spécificité *in vitro* du méthomyl est donc absolue, (Houndonoubo, 1984).

Nous observons que les doses de méthomyl qui ont un effet d'inhibition pour les tissus Texas sont de l'ordre de 36 µM. Le mode d'action supposé du méthomyl, reconnu dans les mitochondries Texas, serait de détruire le potentiel membranaire des mitochondries (Berville *et al.*, 1985) et de provoquer un effet découplant (Klein & Koeppe, 1985). Les doses actives de méthomyl sur les mitochondries Texas sont de l'ordre de 1 mM à 3 mM pour une inhibition totale.

Les tissus de maïs Texas en culture sont donc inhibés en quelques jours par des concentrations 10 à 15 fois plus faibles que celles qui ont un effet de diminution sur le couplage des mitochondries. On peut se demander alors si les tissus Texas accumulent le méthomyl. Les expériences réalisées par Berville *et al.* (1985) infirment cette hypothèse puisque aucune accumulation de méthomyl radioactif n'a été décelée dans les tissus sensibles (T) par rapport aux tissus résistants (N). Une autre hypothèse serait que le

méthomyl ait un site d'action sur la membrane cellulaire d'affinité plus grande pour le méthomyl que la mitochondrie. Cette hypothèse, pour être éprouvée, demande une expérimentation que nous réalisons.

Les quelques plantes Texas régénérées sont sensibles au méthomyl; nous n'avions réalisé que 2 cycles de repiquage et obtenu que peu de plantes. Nous pensons maintenant que les conditions sont déterminées pour réaliser sur un effectif plus important la sélection de plantes résistantes au méthomyl comme cela a pu être fait avec la T-toxine d'*H. maydis* (Gengenbach *et al.*, 1977 et Brettel *et al.*, 1980).

## CONCLUSION

Le méthomyl inhibe *in vitro* l'initiation et la croissance des cals des tissus à cytoplasme Texas, alors que celles des tissus à cytoplasme normal ne sont pas affectées. La toxicité du méthomyl s'accompagne rapidement d'effets létaux pour les tissus à cytoplasme Texas. L'inhibition de la croissance des tissus à cytoplasme Texas sous l'action de 0,36 mM de méthomyl apparaît totale et irréversible alors que les tissus à cytoplasme normal continuent à croître comme les tissus non traités au méthomyl (Houndonougbo, 1984). La spécificité de l'inhibition par le méthomyl de la croissance des tissus à cytoplasme Texas permet d'envisager de cribler des cellules ou des cals résistants. Pour cela il fallait déterminer la gamme de sensibilité *in vitro*. Nous avons constaté que les doses actives sont beaucoup plus faibles pour les cellules *in vitro* que pour les mitochondries isolées.

Les doses de méthomyl utilisées pour le criblage devront être très faibles de 100  $\mu$ M à 1 mM.

Pour expliquer la sensibilité des cellules *in vitro*, nous recherchons des modifications physiologiques induites par le méthomyl, la fuite d'un cofacteur le NAD a été détectée (Houndonougbo & Bervillé, 1988).

## RÉFÉRENCES

- Aranda G., Bervillé A., Cassini R., Fetizon M. & Poirat P. (1981) Etude de l'hydrolyse et des propriétés toxiques vis-à-vis des mitochondries de maïs Texas d'un insecticide, le méthomyl ou S-méthyl-N [méthyl-carbamoyl]oxy] thioacétimide. *Experientia* 37, 112-113
- Beckert M. & Pollacsek M. (1979) Expression de la variabilité du maïs (*Zea mays* L.) en différentes conditions de culture de tissus. *Ann. Amélior. Plantes* 29, 563-581
- Bervillé A. (1979) Etude préliminaire de la stérilité mâle cytoplasmique. Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles présentée à l'Université de Paris-Sud (XI), Centre d'Orsay, 1-173
- Bervillé A., Schneider C., Bonavent J.F., Bodergat R. & Aranda G. (1985) No accumulation of methomyl in Texas maize mitochondria. *International Symposium on "Achievements and Perspectives in Mitochondrial Research"* 148, 114 (Abstract)
- Brettel R.I.S., Thomas E. & Ingram D.S. (1980) Reversion of Texas male-sterile cytoplasm maize in culture to give fertile, T-toxin resistant plants. *Theor. Appl. Genet.* 58, 55-58
- Gengenbach B.G. & Green C.E. (1975) Selection of T-cytoplasm maize callus cultures resistant to *Helminthosporium maydis* race T pathotoxin. *Crop. Sci.* 15, 645-649
- Gengenbach B.G., Green C.E. & Donovan C.M. (1977) Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5113-5117
- Green C.E. & Phillips R.L. (1975) Plant regenerated from tissue culture of maize. *Crop Sci.* 15, 417-421
- Harms C.E., Lorz H. & Potrykus J. (1976) Regeneration of plantlets from callus cultures of *Zea mays* L. *Z. Pflanzenzuchtg.* 77, 347-351
- Houndonougbo B. (1984) Contribution au mode d'action d'un carbamate : le méthomyl, par la réaction des protoplastes et culture de tissus de maïs (*Zea mays* L.) à cytoplasme normal ou à cytoplasme Texas. Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles présentée à l'Université de Paris-Sud (XI), Centre d'Orsay, 1-201
- Houndonougbo B. & Bervillé A. (1988) Effets du méthomyl sur la libération du nicotinamide adénine nucléotide des protoplastes de maïs (*Zea mays* L.) à cytoplasme normal ou à cytoplasme Texas en culture *in vitro*. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sér. III* 307, 459-464
- Humaydan D.S. & Scott E.W. (1977) Methomyl insecticide selective phytotoxicity on sweet corn hybrids and inbreds having the Texas male-sterile cytoplasm. *Hort. Sci.* 12, 312-320
- Jaubertie J.P., Lafouasse M., Bervillé A., Branchard M., Cassini R., Cornu A., Deshayes A. & Vuillaume E. (1978) Recherches de variants résistants à des toxines par la technique de culture de cellules et de tissus végétaux. *Physiol. Vég.* 16, 401-409
- Klein R.R. & Koeppel D.E. (1985) Mode of methomyl and *Bipolaris maydis* (race T) toxin in uncoupling Texas male-sterile cytoplasm corn mitochondria. *Plant Physiol.* 77, 912-916
- Murashige T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-497
- Person C.B. & Horner H.T. (1976) Callus formation and differentiation in tissue cultures of normal and Texas cytoplasmic male sterile corn. *Proc. Towa Acad. Sci.* 82, 163-165
- Raffail W.S. (1978) The initiation of callus tissue from immature embryos of maize. *Maize Genet. Coop. News Lett.* 52, 3-5
- Torne J.M., Santos M.A., Pons A. & Blanco M. (1980) Regeneration of plants from mesocotyl tissue cultures of immature embryos of *Zea mays*. *Plant Sci. Lett.* 17, 339-344
- Vuillaume E. & Deshayes A. (1977) Initiation des cals *in vitro* à partir de fragments de mésocotyle et de coléoptile chez le maïs. *Ann. Amélior. Plantes* 27, 657-673