

N° d'ordre : 855

50376
1980
158

50376
1980
158

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

Spécialité : Amélioration des Productions Végétales et Microbiennes

Option : Physiologie végétale

U

MORPHOGENESE ET NODULATION IN VITRO DE LA LUZERNE (Medicago sativa L. var. EUROPE)



par

Lucien Eugène OBAME

Soutenue le 19. 11. 1980 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury	M. BOURIQUET	Président
		Rapporteur
	M. J. GUILLAUME	
	Mlle C. PAUPARDIN	Examineurs

A ma Mère "IN MEMORIAM"

A mon Père

A Delphine, Stéphane, Claude, Yvan et Frédérique

Aux Parents et Amis

pour tous les sacrifices consentis

et en témoignage de mon profond attachement.

Au moment où s'achève cette étude, il m'est particulièrement agréable de témoigner à Monsieur le Professeur BOURIQUET toute ma gratitude.

En m'accueillant dans le Laboratoire de Physiologie Végétale, il n'a cessé, au cours de ces trois années, de suivre et de guider mes travaux de Recherche. Qu'il en soit vivement remercié.

Ma reconnaissance va à Monsieur le Professeur GUILLAUME qui m'a toujours permis de bénéficier des équipements de son Laboratoire et qui a bien voulu me faire l'honneur d'examiner ce travail. Je voudrais y associer Monsieur EB, son Collaborateur, pour l'aide technique qu'il m'a apportée tout au long de ces travaux.

Je sais gré à Mademoiselle le Professeur PAUPARDIN d'avoir gentiment accepté de juger ce travail. Je lui en suis très reconnaissant.

Je n'oublierai pas les Membres du Laboratoire de Physiologie Végétale avec lesquels j'ai passé trois années dans une ambiance de travail gaie et efficace.

Ils ont, à titres divers, aidé à l'aboutissement de ce travail. Qu'ils soient assurés de compter toujours parmi mes amis.

Je voudrais remercier, également, Mademoiselle DELECOURT qui a réalisé les travaux de dactylographie de ce Mémoire. C'est avec beaucoup de gentillesse qu'elle a accepté cette charge. Je lui renouvelle toute ma sympathie.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
HISTORIQUE	
I - MORPHOGENÈSE CHEZ QUELQUES LÉGUMINEUSES CULTIVÉES IN VITRO	2
II - FIXATION SYMBIOTIQUE DE L'AZOTE DE L'AIR	7
A - FORMATION DES NODULES	7
1) L'infection	7
2) L'évolution en nodule	8
B - FACTEURS INFLUENCANT LA NODULATION	11
1) La spécificité d'hôte	11
2) L'efficience	12
3) Facteurs divers	12
MATERIEL ET METHODES	
I - MISE EN GERMINATION DES GRAINES ET ENTRETIEN DES PLANTULES	15
II - ISOLEMENT DES COLONIES TISSULAIRES À PARTIR DE FRAGMENTS D'ORGANES CULTIVES IN VITRO	15

A - MILIEU ET CONDITIONS DE CULTURE	15
B - ENSEMENCEMENT DES MILIEUX DE CULTURE	17
C - TECHNIQUE HISTOLOGIQUE	17
III - RÉGÉNÉRATION DE PLANTES DE LUZERNE À PARTIR DE COLONIES TISSULAIRES	17
IV - INOCULATION DES PLANTES DE LUZERNE AVEC RHIZOBIUM MELILOTI	18
A - MILIEU ET CONDITIONS DE CULTURE	18
B - PREPARATION DE L'INOCULUM BACTERIEN ET INOCULATION DES PLANTES	18
V - EXPRESSION DES RÉSULTATS	19
A - EVALUATION DE LA CALLOGENESE ET DE LA NEOFORMATION D'ORGANES	19
B - EVALUATION DE LA CROISSANCE DES PLANTES INOCULEES AVEC RHIZOBIUM	20
1) Evaluation de la croissance et de la nodulation	20
2) Mesure de l'activité nitrogénase par le test de réduction de l'acétylène en éthylène	20
a - <i>principe du test</i>	20
b - <i>appareil de mesure et conditions de travail</i>	20
c - <i>technique de dosage et méthode de calcul des résultats</i>	21
C - ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS	21

R E S U L T A T S

I - MISE AU POINT D'UN SCHEMA EXPERIMENTAL DE REGENERATION DE LUZERNE A PARTIR DE TISSUS CULTIVES IN VITRO	22
---	----

I - OBTENTION DE COLONIES TISSULAIRES DE LUZERNE	22
A - CULTURE DE FRAGMENTS DE FEUILLES, DE TIGES ET DE RACINES ,	22
B - CULTURE DE NOEUDS	22
1) Influence du lieu de prélèvement des explantats sur l'aptitude à produire un cal organogène	24
2) Action conjuguée du 2,4-D et de K sur la formation de cals par les noeuds	25
C - FORMATION DE CALS PAR LES FRAGMENTS DE TIGES, DE FEUILLES ET DE RACINES CULTIVES SUR MILIEU DE BLAYDES RENFERMANT AIB ; 2,4-D et GA ₃	25
II - ÉTUDE DE LA NEOFORMATION D'ORGANES PAR LES TISSUS DE LUZERNE	28
A - NEOFORMATION D'ORGANES PAR LES COLONIES TISSULAIRES PROVENANT DE RACINES	29
1) Action des substances auxiniques	29
2) Action des cytokinines	29
3) Action conjuguée de l'auxine et de la cytokinine	29
B) NEOFORMATION D'ORGANES PAR LES COLONIES TISSULAIRES PROVENANT DE NOEUDS	31
1) Maintien du pouvoir caulogène des colonies tissulaires provenant de noeuds cultivées sur milieu renfermant AIB ; 2,4-D et GA ₃	31
2) Influence des hormones sur la croissance des colonies tissulaires provenant de noeuds	32
3) Influence du 2,4-D (10 ⁻⁷ M) et d'une forte teneur en GA ₃ (5.10 ⁻⁶ M) sur la néoformation et la croissance des bourgeons	33
4) Effet de l'ANA et de GA ₃ sur la néoformation de bour- geons par les colonies tissulaires provenant de noeuds ,	34
5) Problème de l'enracinement des plantules régénérées <i>in vitro</i>	35

a - action des substances auxiniques	35
b - influence de la concentration en saccharose sur la néoformation de racines par les plantules de luzerne régénérées in vitro	37
II - NODULATION DES PLANTES DE LUZERNE APRES INFECTION PAR RHIZOBIUM MELILOTI	38
I - NODULATION DES PLANTES ISSUES DE GRAINES	38
A - INFLUENCE DU SUPPORT CULTURAL SUR LA NODULATION DES PLANTES DE LUZERNE INOCULEES AVEC RHIZOBIUM MELILOTI	38
B - INFLUENCE DU $KMnO_4$ ET DE L'ACIDE CITRIQUE SUR LA NODULA- TION DES PLANTES DE LUZERNE CULTIVEES SUR SUPPORT GELOSE ..	40
C - INFLUENCE DU $KMnO_4$ ET DE L'ACIDE CITRIQUE SUR LA NODULA- TION DES PLANTES DE LUZERNE CULTIVEES SUR SUPPORT PAPIER FILTRE	40
D - INFLUENCE DE L'ABLATION DE L'EXTREMITE RACINAIRE SUR LA NODULATION DES PLANTES DE LUZERNE CULTIVEES SUR SUPPORT PAPIER FILTRE	43
E - NODULATION DES RACINES ISOLEES DE LUZERNE CULTIVEES SUR SUPPORT PAPIER FILTRE	44
II - ÉTUDE COMPARÉE DE LA NODULATION DES PLANTES DE LUZERNE ISSUES DE GRAINES ET RÉGÉNÉRÉES IN VITRO ..	45
A - INOCULATION DES PLANTES AVEC RHIZOBIUM MELILOTI	45
B - CROISSANCE ULTERIEURE DES PLANTES	48
DISCUSSION	50
RESUME	62

PLANCHE I

- CULTURE *IN VITRO* DE LA LUZERNE (*MEDICAGO SATIVA L.*) 65

PLANCHE II

- SEQUENCES DE REGENERATION DE LA LUZERNE A PARTIR DE
COLONIES TISSULAIRES PROVENANT DE NOEUDS CULTIVEES
IN VITRO 66

B I B L I O G R A P H I E 67

T A B L E D E S T A B L E A U X

TABLEAU I - COMPOSITION DES SOLUTIONS MINERALES AYANT SERVI DE BASE POUR LES MILIEUX DE CULTURE	16
TABLEAU II - COMPOSITION DES MILIEUX POUR <i>RHIZOBIUM</i> UTILISES POUR LA PREPARATION DE LA SUSPENSION BACTERIENNE DE <i>RHIZOBIUM</i> ...	19
TABLEAU III - INFLUENCE DES HORMONES SUR LA FORMATION DES CALS PAR LES FRAGMENTS D'ORGANES DE LUZERNE CULTIVES SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; LUMIERE)	23
TABLEAU IV - FORMATION DE CALS PAR LES NOEUDS CULTIVES SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; LUMIERE)	24
TABLEAU V - INFLUENCE DU LIEU DE PRELEVEMENT DES EXPLANTATS SUR L'APTITUDE A PRODUIRE UN CAL ORGANOGENE ,	26
TABLEAU VI - INFLUENCE DU 2,4-D ET DE LA K SUR LA FORMATION DE CALS PAR LES NOEUDS CULTIVES SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; LUMIERE)	27
TABLEAU VII - FORMATION DE CALS PAR LES FRAGMENTS D'ORGANES DE LUZERNE CULTIVES SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE RENFERMANT AIB ; 2,4-D ET GA_3 ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; LUMIERE)	28
TABLEAU VIII - INFLUENCE DES HORMONES SUR LA NEOFORMATION DE RACINES ET DE BOURGEONS PAR LES COLONIES TISSULAIRES PROVENANT DE RACINES CULTIVEES SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; LUMIERE)	30
TABLEAU IX - ACTION CONJUGUEE DE L'AIA ET DE LA BAP SUR LA NEOFORMA- TION DE RACINES ET DE BOURGEONS PAR LES COLONIES TISSU- LAIRES PROVENANT DE RACINES CULTIVEES SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; LUMIERE)	31
TABLEAU X - NEOFORMATION DE BOURGEONS PAR LES COLONIES TISSULAIRES PROVENANT DE NOEUDS CULTIVEES SUR MILIEU DE BLAYDES MODI- FIE RENFERMANT AIB ; 2,4-D ET GA_3 ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; LUMIERE) ...	32
TABLEAU XI - INFLUENCE DES HORMONES SUR LA NEOFORMATION DE BOURGEONS PAR LES COLONIES TISSULAIRES PROVENANT DE NOEUDS CULTI- VEES SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; LUMIERE) ..	33

TABLEAU XII - INFLUENCE CONJUGUEE DU 2,4-D (10^{-7} M) ET DE GA ₃ (5.10^{-6} M) SUR LA NEOFORMATION ET LA CROISSANCE DES BOURGEONS CULTIVES SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE (25 ± 1°C ; LUMIERE) ..	34
TABLEAU XIII - INFLUENCE DE L'ANA ET DE GA ₃ SUR LA NEOFORMATION DE BOURGEONS PAR LES COLONIES TISSULAIRES PROVENANT DE NOEUDS CULTIVEES SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE (25 ± 1°C ; LUMIERE)	35
TABLEAU XIV - INFLUENCE DES SUBSTANCES AUXINIQUES SUR LA NEOFORMATION DE RACINES PAR LES PLANTULES DE LUZERNE CULTIVEES SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE (25 ± 1°C ; LUMIERE)	36
TABLEAU XV - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SACCHAROSE SUR LA NEOFORMATION DE RACINES PAR LES PLANTULES DE LUZERNE CULTIVEES SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE EN PRESENCE D'ANA (25 ± 1°C ; LUMIERE)	37
TABLEAU XVI - INFLUENCE DU SUPPORT CULTURAL SUR LA NODULATION DES PLANTES DE LUZERNE	39
TABLEAU XVII - INFLUENCE DU KMnO ₄ ET DE L'ACIDE CITRIQUE SUR LA NODULATION DES PLANTES DE LUZERNE CULTIVEES SUR SUPPORT GELOSE	41
TABLEAU XVIII - INFLUENCE DU KMnO ₄ ET DE L'ACIDE CITRIQUE SUR LA NODULATION DES PLANTES DE LUZERNE CULTIVEES SUR SUPPORT PAPIER FILTRE	42
TABLEAU XIX - INFLUENCE DE L'ABLATION DE L'EXTREMITÉ RACINAIRE SUR LA NODULATION DES PLANTES DE LUZERNE CULTIVEES SUR SUPPORT PAPIER FILTRE	43
TABLEAU XX - NODULATION DES RACINES ISOLEES CULTIVEES SUR SUPPORT PAPIER FILTRE	44
TABLEAU XXI - NODULATION DES PLANTES DE LUZERNE ISSUES DE GRAINES (G) ET REGENEREES IN VITRO (R) APRES INFECTION PAR RHIZOBIUM MELILOTI	48

I N T R O D U C T I O N

Les légumineuses constituent une famille de plantes distribuées sous toutes les latitudes.

Leur rôle économique est très important par suite de leur intérêt alimentaire : graines aux réserves multiples (arachide, haricot, lentille, pois, soja), appareil végétatif des fourragères (luzerne, médic, sainfoin, sulla, trèfle), engrais vert des plantes améliorantes (la symbiose avec les bactéries *Rhizobium* permet la fixation de l'azote), produits d'extraction (gommes, teintures, substances médicamenteuses).

Depuis longtemps, les agronomes et les physiologistes s'attachent à mieux connaître la biologie des plantes de cette famille.

Malgré l'importance des travaux, le processus de symbiose est loin d'être totalement élucidé : la génétique des *Rhizobium* commence seulement à être précisée (KONDOROSI et al., 1977 ; MEADE et SIGNER, 1977 ; BERINGER et al., 1978 ; JULLIOT et BOISTARD, 1979), les notions de spécificité et d'efficacité des souches infectieuses comportent encore des aspects inconnus (JOHNSTON et BERINGER, 1977 ; JOHNSTON et al., 1978 ; MAOUI, 1980), etc...

La culture de tissus végétaux, pouvant être un moyen pour aborder certains aspects du problème de la symbiose, nous avons tout d'abord étudié la néoformation d'organes par des tissus de luzerne (*Medicago sativa* L., var. Europe) cultivés *in vitro*, puis nous avons porté notre attention sur la néoformation de nodosités en présence de *Rhizobium meliloti*.

Le but de cette étude n'était pas d'envisager l'ensemble du problème posé par la symbiose *Rhizobium*-légumineuse, mais de mettre au point un schéma expérimental de régénération de luzerne qui permette ultérieurement d'aborder certains aspects du phénomène de symbiose.

Après des généralités sur la morphogenèse chez quelques légumineuses cultivées *in vitro*, et des rappels sur la fixation symbiotique de l'azote, la suite du mémoire rassemble les informations recueillies sur la néoformation d'organes par les tissus de luzerne et les premières données sur la symbiose des plantes avec *Rhizobium meliloti* (agent infection spécifique du groupe *Medicago*).

HISTORIQUE

I - MORPHOGENÈSE CHEZ QUELQUES LÉGUMINEUSES CULTIVÉES IN VITRO

Comme pour de nombreuses espèces, des auteurs ont recherché les moyens de multiplier rapidement les légumineuses. A côté de la technique classique du bouturage (WHITE, 1946 ; NEEDENRIEP, 1964 ; CHESNEAUX, 1974 ; FOTIADIS, 1977; etc...), la culture de tissus constitue une des voies pour atteindre cet objectif. Seulement, son application suppose que les tissus auxquels l'on s'adresse soient doués de morphogenèse, et capables de régénérer les organes de la plante. La réalisation de programmes morphogénétiques par les tissus de légumineuses reste donc un point fondamental auquel divers auteurs ont déjà consacré de nombreuses études.

De tels programmes dépendent généralement de l'action de certains messagers chimiques endogènes ou exogènes. Diverses légumineuses ont déjà été utilisées.

Les premiers essais portent sur le haricot et le pois (HILDEBRANDT et al., 1963). Les tissus de pois sont capables de produire des organes (tiges, feuilles et fleurs) mais ceux de haricot n'ont permis aucune néoformation d'organes. Pendant longtemps d'ailleurs, le haricot ne servira qu'aux études de croissance cellulaire ou tissulaire et de métabolisme (LAMPART, 1964 ; GAMBORG, 1966 ; MEHTA et al., 1967 ; LIAU et BOLL, 1971 ; VELIKY et MARTIN, 1972 ; ...).

En 1971, NIIZEKI et GRANT obtiennent chez deux espèces tétraploïdes de lotus la régénération de plantes à partir de cals d'anthères cultivés sur milieux synthétiques pourvus d'auxines et de cytokinines. Ces auteurs mentionnent la nature polyploïde des plantes néoformées (plantes tétraploïdes et octaploïdes), ce qui suggère que les cals proviennent des tissus somatiques des anthères.

Travaillant sur le trèfle blanc, PELLETIER et PELLETIER (1971) signalent la formation d'organes (racines et bourgeons) sur des cals de cotylédons cultivés en présence d'acide 2,4-dichlorophénoxy-acétique (2,4-D), d'acide naphthalène acétique (ANA), de kinétine (K) et de lait de coco. Sur 70 plantes extraites de la souche morphogène pendant deux années de culture, 42 présentent une variabilité morphologique (folioles dentées, pétioles plus gros et des feuilles plus raides). Au niveau chromosomique, les auteurs notent des plantes à 30, 31, 32 et 62 chromosomes, la majorité d'entre-elles ayant 31 chromosomes.

De leur côté, SAUNDERS et BINGHAM (1972) mentionnent la formation de cals organogènes sur des anthères et ovaires immatures, puis des fragments de tiges (épi - et hypocotyle) de luzerne en utilisant diverses combinaisons de 2,4-D et ANA.

Les cals d'anthères proviennent en majorité de l'assise mécanique. On note sur les cals d'ovaires la présence d'embryoïdes. La formation d'organes survient sur milieux dépourvus d'hormones. Ces travaux montrent en outre une certaine stabilité chromosomique chez la luzerne, les plantes néoformées présentant dans leur majorité le même nombre de chromosomes que les plantes-mères ($2n = 32$), même si les auteurs ont relevé la présence d'octaploïdes dont ils n'ont pu préciser l'origine.

S'adressant aux fragments d'hypocotyle et aux méristèmes racinaires, HESZKY (1975) observe des néoformations de plantes de sainfoin à partir de cals issus de ces tissus. Là encore, il faut passer en milieu dépourvu d'hormones pour induire ces néoformations.

Toujours en 1975, diverses possibilités de multiplication végétative en culture *in vitro* sont analysées chez *Hedysarum coronarium* L. par DELLAGI-LAKHOUA. Les résultats mettent en évidence des potentialités caulogènes chez les organes ou les fragments d'organes, celles-ci étant stimulées par la 6-benzyladénine (BAP), qui, selon l'auteur, provoquerait l'apparition de cellules méristématiques et leur organisation ultérieure en bourgeons. La présence d'embryoïdes témoignerait en outre d'un rajeunissement survenant dans les cellules parenchymateuses dont ils sont dérivés.

C'est aussi en 1975 que SAUNDERS et BINGHAM précisent l'influence de diverses phytohormones sur la formation de bourgeons par les cals d'ovaires immatures de luzerne. Les résultats font apparaître le rôle prépondérant du 2,4-D dans la néoformation de bourgeons.

Reprenant l'étude de la morphogénèse chez le haricot, CROCOMO et al. (1976) signalent la production de racines par des cals de feuilles cultivées en présence d'auxines (AIA et ANA). L'addition de K au milieu de culture n'a cependant nullement induit la formation de bourgeons, ce qui a fait dire aux auteurs que la néoformation de bourgeons chez le haricot pourrait dépendre d'une balance hormonale plus stricte et d'interactions physico-chimiques précises dans le milieu de culture.

L'influence conjuguée des phytohormones associées à deux alcaloïdes (nicotine et caféine) fait également l'objet d'études de PETERS et al. (1976). La rhizogenèse des cals de feuilles de haricot est stimulée par l'AIA associée à la nicotine et à K. Au-delà d'une concentration optimale, la nicotine inhibe cette rhizogenèse, inhibition qui s'observe très tôt avec la caféine, et à des concentrations nettement inférieures.

Les cellules isolées des cals d'hypocotyle de haricot (HADDON et NORTHCOTE, 1976) ne manifestent pas de pouvoir caulogène, même en présence de lait de coco. La rhizogenèse a été par contre aisément observée.

Ce sont finalement CROCOMO et al. (1976) qui obtiennent la première néoformation de bourgeons sur des cals de feuilles de haricot en additionnant au milieu de culture, en plus de l'AIA et de K, des extraits de graines de haricot.

Dans le même temps, SCOWCROFT et ADAMSON (1976) isolent des colonies tissulaires organogènes en cultivant des cotylédons et des racines de *Stylosanthes hamata*. La formation des bourgeons est dans ce cas stimulée par des doses de K de l'ordre de 10^{-5} M/l, alors que l'initiation des cals nécessite la présence conjuguée de K et d'AIA.

A partir de cals d'ovaires immatures d'un clone de luzerne, McCOY et BINGHAM (1977) signalent la néoformation de bourgeons sous l'action conjuguée d'auxines et de cytokinines. La culture de cellules isolées de ces cals permet de constater que la capacité de ces dernières à régénérer des organes est fonction de leur durée de séjour en milieu liquide. Plus cette durée est longue, moins les cellules sont capables de former des organes *de novo*, et notamment des bourgeons.

Dans les cultures de quelques espèces de soja, BEVERSDORF et BINGHAM (1977) observent la rhizogenèse accrue de cals issus d'organes divers tels que hypocotyles, cotylédons, apex et embryons. Les cellules de ces cals cultivées isolément mettent en évidence le phénomène de pseudo-embryoïdes qui, tout en évoquant les formes classiques des embryoïdes, ne permettent cependant pas de développement de plantes entières.

En modifiant les rapports auxines/cytokinines, OSWALD et al. (1977) parviennent à la néoformation de bourgeons sur des cals et cellules de soja et de trèfle blanc. Si un rapport voisin de 50 est nécessaire pour l'initiation des cals, il n'est plus que de 0,5 pour l'induction des bourgeons.

Sur des cals d'ovaires immatures de plusieurs clones de luzerne, WALKER et al. (1978) étudient l'influence des auxines et des cytokinines sur la néoformation de bourgeons. La capacité organogène des cals est fonction du type d'hormone utilisée et du génotype des plantes-mères. Chez un de ces clones en effet, il apparaît que ce sont les fortes doses de 2,4-D associées aux faibles doses de K qui stimulent la néoformation de bourgeons, tandis qu'un rapport inverse favorise la rhizogénèse. La réponse de ce matériel témoigne de la complexité des interactions des substances hormonales.

La néoformation d'organes par les tissus de luzerne (var. Europe) fait également l'objet d'études qui permettent la mise en évidence d'aptitudes variables chez ces tissus (OBAME, 1978). Les feuilles et les tiges ne manifestent aucune capacité néoformatrice de bourgeons, même en présence de fortes doses de cytokinines.

Sur les cals de racines, on observe une faible aptitude au bourgeonnement, qui se perd au cours des repiquages successifs. La rhizogénèse par contre s'est révélée abondante, notamment lors de la culture des cellules par la présence de pseudo-embryoïdes dont la culture ultérieure n'a pu permettre l'évolution en plantes entières telle que l'ont observée BEVERSDORF et BINGHAM (1977).

Une grande aptitude à la rhizogénèse est observée sur les cals de cotylédons et d'hypocotyles d'arachide par LAKSHMANAN (1978). Il observe par ailleurs des différences morphologiques entre racines produites par ces deux types de cals.

Avec les protoplastes de luzerne obtenus à partir du mésophyle, KAO et MICHAYLUK (1980) notent des potentialités organogènes. Remis en culture après isolement, les protoplastes produisent des bourgeons, des racines et des embryoïdes sur divers milieux renfermant ou non des hormones.

Le maintien des potentialités morphogènes s'observe aussi chez le pois où les méristèmes de tiges, après action de froids intenses, permettent la reconstitution de plantes normales (KARTHA et al., 1979). En effet, après avoir été soumis progressivement au froid et séjourné dans l'azote liquide, les méristèmes remis en culture ont présenté un taux de survie élevé (73 %).

MALMBERG (1979) rapporte les résultats obtenus sur des cals de diverses lignées de pois cultivées *in vitro*. Sur six lignées utilisées, deux sont capables de produire des bourgeons après six mois de culture.

Une expérience semblable menée sur deux espèces de trigonelle (*T. corniculata* et *T. foenum-graecum*) montre que les aptitudes morphogènes des cals de feuilles se conservent de façon satisfaisante au cours du temps (SEN et GUPTA, 1979).

Les résultats qui viennent d'être évoqués montrent que la morphogenèse chez les légumineuses dépend presque toujours de l'influence d'hormones exogènes dont les rapports varient en fonction des espèces considérées et des organes utilisés.

C'est ainsi que, dans bien des cas, les cytokinines sont des stimulateurs de la néoformation de bourgeons, tandis que les auxines interviennent surtout pour l'initiation des cals et l'enracinement ultérieur des bourgeons lors du passage aux plantes entières. Cela ne se vérifie pas tout à fait dans le cas de la luzerne, qu'ils s'agissent de variétés américaines ou européennes où l'on note souvent l'effet prépondérant du 2,4-D dans le bourgeonnement.

La variété "Europe" n'a cependant pas permis de mettre en évidence de façon nette les effets des cytokinines et des auxines, les unes et les autres n'ayant pas favorisé davantage la néoformation de bourgeons. Cela nous a contraint à rechercher d'autres tissus susceptibles de former des bourgeons, étape indispensable à toute régénération de plantes entières.

A cet effet, nous nous sommes orienté vers la culture de noeuds et nous avons recherché leur aptitude au bourgeonnement en vue d'établir un schéma expérimental de régénération de luzerne afin de disposer en permanence de plantes néoformées qui nous permettent de réaliser des études de symbiose avec *Rhizobium meliloti*.

Faut-il rappeler que la symbiose avec les *Rhizobium* est la propriété essentielle des légumineuses ? Aussi allons-nous aborder les aspects principaux de cette symbiose qui représente actuellement l'une des formes associatives les plus étudiées.

II - FIXATION SYMBIOTIQUE DE L'AZOTE DE L'AIR

L'azote est un élément indispensable au maintien de la vie végétale et animale.

Au cours de son cycle, l'azote de l'air est fixé par les bactéries fixatrices libres et par les *Rhizobium* associés aux racines de légumineuses (BURRIS, 1965 ; STEWARD et DURZAN, 1965 ; SIRONVAL et BONNIER, 1967), cette seconde possibilité étant de loin la plus importante, tant ses implications en agriculture sont nombreuses.

Ce sont en effet près de 12 000 espèces qui sont concernées par ce phénomène de symbiose.

La systématique des légumineuses est bien connue. Une description complète de ces plantes est par exemple fournie par DUVIGNEAUD et VAN BOCKSTAL (1968).

Les bactéries du genre *Rhizobium* sont définies, elles, en sept espèces en fonction des groupes de plantes-hôtes qu'elles infectent (VINCENT, 1974).

A - FORMATION DES NODULES

Les nodules sont le siège de la fixation symbiotique de l'azote de l'air. Leur présence sur les racines de légumineuses résulte d'étapes successives impliquant l'infection de celles-ci par le *Rhizobium* spécifique, l'initiation des nodules et leur développement dans les tissus racinaires.

1) L'infection

Les *Rhizobium* vivent dans tous les sols non toxiques, et la culture d'une légumineuse favorise le développement du *Rhizobium* qui lui est spécifique.

Il est généralement admis que l'infection a lieu au niveau des poils absorbants, mais de jeunes blessures sur les poils ou les racines peuvent être des voies de pénétration possibles (SIRONVAL et BONNIER, 1967). Chez certaines légumineuses telle que *Lotus hispidus* Desf. (RAO, 1977a), le *Rhizobium* peut traverser directement le rhizoderme.

L'infection est la conséquence des interactions entre *Rhizobium* et racines.

Les racines en croissance excrètent dans leur rhizosphère des substances qui permettent l'augmentation du nombre de *Rhizobium*. En étudiant divers exsudats racinaires (et notamment de racines de légumineuses), CURRIER et STROBEL (1976) ont mis en évidence un chimiotactisme préférentiel des *Rhizobium* pour les exsudats racinaires de légumineuses ; il concerne des produits aussi divers que les amino-acides, les sucres simples, les di ou trisaccharides, ou des corps plus complexes.

De leur côté, les *Rhizobium* libèrent au cours de leur croissance des substances auxquelles on attribue un rôle dans la réalisation de l'infection. On a cité par exemple les composés auxiniques et particulièrement l'acide 3-indolylacétique (AIA) qui seraient responsables de la courbure de l'extrémité du poil absorbant (VIRTANEN et MIETTINEN, 1963). Des travaux ultérieurs sur le métabolisme indolique chez *Rhizobium meliloti* (RIGAUD, 1970 ; RIGAUD et TRINCHANT, 1973) ont apporté la preuve de la synthèse de l'indolyl-3-acétaldéhyde (précurseur de l'AIA) et de l'alcool-déshydrogénase, enzyme qui permet le passage à l'AIA.

Actuellement, on sait que les cytokinines participent également à la courbure de l'extrémité du poil absorbant (SOLHEIM et RAA, 1973).

2) L'évolution en nodule

Une fois dans le poil absorbant, les *Rhizobium* progressent vers la zone interne de la racine à l'intérieur d'un cordon d'infection.

Dans les premiers stades de sa formation, on peut observer à l'intérieur du poil absorbant un doublement de taille du noyau qui se trouve toujours dans l'axe de la cellule et semble orienter la progression du cordon d'infection. A ce stade, le cordon est composé de deux couches distinctes : une couche fibrillaire cellulosique et une couche amorphe contenant les bactéries en division active (BLONDEAU, 1977).

Chez la luzerne et le pois, des études cytologiques ont permis de constater que la présence du cordon d'infection provoque la dédifférenciation des cellules corticales internes, celles-ci recouvrant un caractère

méristématique (LIBBENGA et BOGERS, 1974 ; TRUCHET, 1978). Le fonctionnement de ce méristème détermine la mise en place successive de zones cytologiquement distinctes (DENARIE et TRUCHET, 1979).

Ces auteurs ont suggéré la notion de "principe inducteur de la nodulation". Sa nature reste inconnue, mais on évoque une action des phytohormones. Il a été en effet démontré que les nodules sont plus riches en auxines (DULLAART, 1970) et en cytokinines (PUPPO et al., 1974 ; HENSON et WHELLER, 1976 ; SYONO et TORREY, 1976 ; PUPPO et RIGAUD, 1978).

Les zones cytologiquement distinctes qui caractérisent la différenciation du tissu central sont de trois types : une zone méristématique, une zone riche en cordons d'infection dans laquelle les bactéries infectent les cellules et se multiplient, enfin une zone où les bactéries sont devenues des bactéroïdes dans des cellules de grande taille, polyploïdes et contenant de la leghémoglobine.

La libération des bactéries a lieu dans la deuxième zone. Elle fait intervenir deux enzymes : une pectinase (d'origine bactérienne) et une cellulase produite par l'hôte (VERMA et al., 1978). Chaque bactérie libérée est entourée d'une membrane de séquestration dérivée du plasmalemme des cellules de l'hôte (TU, 1974 et 1975).

C'est dans la zone d'infection qu'apparaît l'endopolyploïdie qui s'établit selon un gradient disto-proximal (TRUCHET, 1978), celle-ci étant par ailleurs indispensable pour la fixation d'azote (TRUCHET et al., 1978).

Les racines possèdent de petites quantités de cellules polyploïdes, en dehors même de toute infection (SIRONVAL et BONNIER, 1967). On a néanmoins constaté que leur nombre augmente considérablement après l'infection par *Rhizobium*, augmentation que PHILLIPS et TORREY (1970 et 1972) attribuent aux cytokinines qui agiraient sur la régulation des endomitoses dans les cellules.

De leur côté, DENARIE et TRUCHET (1979) ont suggéré, pour expliquer cette polyploïdisation importante après infection, l'hypothèse d'un "principe inducteur d'endopolyploïdie dans le tissu central". Celui-ci ferait intervenir également des phytohormones. Ces auteurs ont traduit les influences respectives des deux principes inducteurs dans le cas de la nodulation de la luzerne (fig. 1).

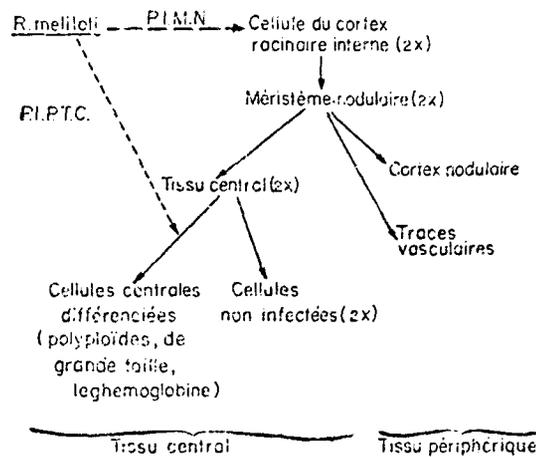


FIGURE 1

UN MODELE POUR L'INDUCTION DE LA MORPHOGENESE DES
 NODOSITES DE LUZERNE PAR *RH. MELILOTI*
 (d'après DENARIE et TRUCHET, 1979)

En conclusion, il apparaît que les nodules sont des structures organisées tirant leur origine du cortex racinaire et n'ont pas d'homologie avec les racines secondaires (LIBBENGA et BOGERS, 1974). Ils sont constitués d'un tissu périphérique dans lequel se différencient des traces vasculaires reliées au cylindre central racinaire, et d'un tissu central contenant des bactéroïdes fixateurs d'azote (LIBBENGA et BOGERS, 1974 ; DART, 1977 ; GOODCHILD, 1977).

Les nodules capables de fixer l'azote se caractérisent par la présence d'une protéine spécifique, la leghémoglobine. Cette hémoprotéine n'a pu en effet être détectée que dans les nodules fonctionnels. Des études sur l'hybridation de l'ADN ont permis de préciser la composition chimique de la leghémoglobine (voir pour revue DENARIE et TRUCHET, 1979).

La fixation de l'azote de l'air fait intervenir un complexe enzymatique, la nitrogénase, qui transforme l'azote moléculaire en azote organique qui est ensuite assimilé par la plante-hôte, celle-ci offrant en retour aux *Rhizobium* les éléments nécessaires à leur survie.

Le fonctionnement de la nitrogénase nécessite un apport d'énergie, celle-ci provient de la photosynthèse. Des informations relatives à la fi-

xation de l'azote et son assimilation sont mentionnées par DENARIE et TRUCHET (1979).

La formation et le fonctionnement des nodules restent liés à divers facteurs, provenant des *Rhizobium*, des plantes-hôtes et de l'environnement. Aussi allons-nous examiner quelques facteurs susceptibles d'influencer la nodulation.

B - FACTEURS INFLUENÇANT LA NODULATION

1) La spécificité d'hôte

La spécificité d'hôte est un caractère essentiel. Elle traduit la capacité qu'a un *Rhizobium* pour infecter sélectivement une légumineuse donnée ou des espèces apparentées.

DAZZO et al. (1976) ont montré par des études de microscopie qu'il existe une spécificité dans l'attachement du *Rhizobium* à la surface du poil absorbant. Actuellement, on pense qu'une glycoprotéine de l'hôte, la lectine, joue un rôle dans cet attachement spécifique.

BOHLOOL et SCHMIDT (1974), puis BAUER (1977) ont en effet montré que les lectines préparées à partir de graines ou de racines de soja et rendues fluorescentes après traitement à l'isothiocyanate de fluorescéine, se fixent exclusivement sur la plupart des souches de *Rhizobium japonicum*. La trifoliine, lectine isolée du trèfle, a le même comportement vis-à-vis de *Rhizobium trifolii*. Dans les deux cas, l'association bactérie-lectine est inhibée par l'addition d'un haptène commun, le D-galactose ou la N-acétyl-D-galactosamine (BAUER, 1977).

L'adsorption des bactéries sur les racines se fait de façon sélective. En 1977, DAZZO et BRILL ont constaté que les polysaccharides capsulaires de *Rhizobium trifolii*, marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine, se fixent à l'extrémité des poils absorbants de trèfle. C'est également à ce site que se fixe un antisérum fluorescent antilectine (DAZZO et al., 1978).

2) L'efficience

Outre la spécificité, un *Rhizobium* doit être efficace. L'efficience traduit son aptitude à fixer l'azote de l'air au sein du nodule. Dans les conditions de laboratoire, des mutations apparaissent dans les souches de *Rhizobium* au cours des entretiens successifs. Cela entraîne une expression différente des caractères de ces souches.

WILSON et al. (1975) ont observé chez *Rhizobium meliloti* des réponses anormales aux réactions d'agglutination antisérum-extrait de bactéries chez les souches âgées d'une dizaine d'années en comparaison de celles données par les souches isolées plus récemment des nodules.

LABANDERA et VINCENT (1975) ont noté chez le trèfle inoculé avec des souches âgées de *Rhizobium trifolii* une réduction du nombre de nodules et de leur aptitude à fixer l'azote.

Des travaux sur la fève infectée avec *Rhizobium leguminosarum* ont permis par ailleurs de constater des symbioses qualitativement variables, notamment dans les rendements en matière fraîche, en taux d'azote, dans la capacité à utiliser l'azote de l'air, ainsi que dans la date des premières floraisons (EL-SHERBENNY et al., 1977).

3) Facteurs divers

Il importe aussi qu'un *Rhizobium* soit compétitif. Sur un sol donné, une compétition peut s'instaurer entre diverses souches d'un même genre, entre souches de genres différents, entre souches locales et introduites, entre souches efficaces et inefficaces, ou encore entre *Rhizobium* et d'autres microorganismes.

ROUGHLEY et al. (1976) ont en effet montré que les souches de *Rhizobium trifolii* introduites dans les cultures de trèfle entrent en compétition avec les souches locales, apportent davantage de nodules et persistent plus longtemps dans le sol.

Le rôle de certains éléments chimiques a été très vite perçu.

L'effet de l'ion calcium a été particulièrement mis en évidence. La croissance des *Rhizobium* requiert la présence du calcium (LOWE et al.,

1960 ; AHMED et EVANS, 1960 et 1961 ; LOWTHER et LONERAGAN, 1968).

Chez *Medicago sativa* L. divers auteurs ont précisé l'effet indispensable du calcium dans la réalisation de l'infection et de la nodulation (LONERAGAN et DOWLING, 1958 ; MUNNS, 1970 ; ROBSON et LONERAGAN, 1970 ; RICE, 1975 ; RICE et al., 1977).

L'azote minéral, à faible dose, a un effet favorable sur la nodulation. Cet effet s'annule dès que les teneurs augmentent (SUBBA RAO et al., 1972).

L'importance des oligoéléments, notamment du cobalt, a été également rapportée. L'absence de cobalt provoque un ralentissement de la croissance des *Rhizobium*, une réduction du nombre de nodules et du développement des plantes (LOWE et al., 1960 ; AHMED et EVANS, 1960 et 1961).

Dans le sol, la survie et la multiplication des *Rhizobium* restent une condition préalable à toute possibilité de symbiose.

Le pH du sol exerce une influence prédominante sur la croissance des *Rhizobium*. C'est ainsi que dans un sol basaltique rouge (pH 5,2), seuls 4 600 *Rhizobium* ont été dénombrés dans la rhizosphère de jeunes plantes de *Dolichos lablad* après 13 jours pour un inoculum initial de 140 000 germes (CLOOMAN et VINCENT, 1967). Cette sensibilité au pH du sol est cependant variable. *Rhizobium meliloti* semble en effet plus affecté par les pH bas que *Rhizobium trifolii* (JENSEN, 1942).

En solution nutritive, un pH inférieur ou égal à 4,5 inhibe la nodulation chez *Medicago* (MUNNS, 1968), entre 4,8 et 5,5 celle-ci est faible (MUNNS, 1969), et il faut atteindre un pH supérieur à 5,5 pour obtenir une nodulation accrue (ROBSON et LONERAGAN, 1970).

L'acidité affecte la croissance des *Rhizobium*, mais aussi celle des plantes-hôtes. Ces dernières sont en effet responsables de la synthèse des lectines, protéines impliquées dans l'adsorption des *Rhizobium* aux poils absorbants. On peut donc penser que l'acidité modifie la structure de ces protéines qui deviendraient inaptés à réaliser l'adsorption des *Rhizobium*.

Pour corriger le pH acide du sol, on réalise généralement un chaulage (apport de chaux). On a ainsi amélioré le rendement des cultures de trèfle et de luzerne dans les sols acides (MUNNS, 1965).

Outre la pratique de chaulage, on s'oriente également vers la mutagenèse expérimentale pour créer des souches de *Rhizobium* acido-résistantes. Une telle souche a été obtenue chez *Rhizobium meliloti* et testée dans les sols acides de Bretagne (RAKATOARISOA, 1980).

La température joue également un rôle dans la survie et la croissance des *Rhizobium*. Si les températures supérieures à 50°C sont léthales (BONNIER, 1960), c'est généralement entre 20 et 30°C que prolifèrent la plupart des *Rhizobium* (exception faite du *Rhizobium meliloti* dont l'optimum de croissance est à 37°C), ces températures se révélant également meilleures pour la nodulation et l'activité nitrogénase (RAO, 1977a et 1977b).

De nombreux facteurs interfèrent donc pour favoriser ou entraver la symbiose *Rhizobium*-légumineuse. De celle-ci dépend l'alimentation des plantes-hôtes en azote. Leur productivité est par conséquent largement tributaire du bon fonctionnement de la symbiose.

C'est cette propriété symbiotique que l'on exploite en agriculture. Il faut en effet signaler que les légumineuses assurent de façon essentielle le maintien et l'amélioration de la fertilité des sols, notamment grâce aux cultures de fourragères comme la luzerne et le trèfle ou bien lors des rotations culturales avec les céréales par exemple (LIPMAN et CONYBEARE, 1936 ; HAYWARD, 1938 ; VIRTANEN et MIETTINEN, 1963 ; SIRONVAL et BONNIER, 1967).

C'est pourquoi, au titre d'une contribution à une meilleure connaissance de ces plantes, nous avons, dans le cas de la luzerne, travaillé dans deux directions :

- 1 - une étude de la morphogenèse chez des tissus de luzerne cultivés *in vitro*,
- 2 - une récolte des premières données sur la nodulation des plantes de luzerne issues de graines et régénérées *in vitro*.

MATERIEL ET METHODES

Les graines de luzerne utilisées pour nos expériences nous ont été gracieusement fournies par le laboratoire de Microbiologie.

I - MISE EN GERMINATION DES GRAINES ET ENTRETIEN DES PLANTULES

Les graines sont désinfectées par une solution de mercryl laurylé (3 %) pendant 15 minutes, puis par une solution de chlorure mercurique (0,5 %) pendant 10 minutes ; elles sont ensuite rincées trois fois à l'eau distillée stérile et mises à germer sur de l'eau solidifiée avec de l'agar (0,8 %), préalablement autoclavée 20 minutes à 120°C et coulée en boîtes de Pétri après autoclavage. Les boîtes ensemencées sont maintenues pendant 4 jours à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ dans une pièce où elles reçoivent, en plus de la lumière du jour, 12 heures d'éclairement d'appoint fourni par des tubes fluorescents (environ 500 lux).

Après germination, les plantules obtenues sont repiquées aseptiquement dans des tubes (24 x 160 mm) contenant environ 20 ml de la solution minérale de STREET (1957) modifiée (les microéléments initiaux sont remplacés par ceux de la solution minérale de GAMBORG et al. (1974) plus riche en cobalt et molybdène, tableau I), additionnée d'agar (0,8 %) et autoclavée avant ensemencement 20 minutes à 120°C. La culture aseptique des plantules se réalise dans les mêmes conditions que les germinations et se poursuit jusqu'à ce qu'elles atteignent un développement suffisant (environ 10 à 15 cm) pour y prélever des explantats.

II - ISOLEMENT DE COLONIES TISSULAIRES À PARTIR DE FRAGMENTS D'ORGANES CULTIVÉS IN VITRO

A - MILIEU ET CONDITIONS DE CULTURE

Le milieu de base comporte les sels minéraux de la solution de BLAYDES (1966) modifiée dans laquelle nous avons remplacé les nitrates d'ammonium et de calcium respectivement par le phosphate d'ammonium et le chlorure de calcium. Les microéléments sont ceux de la solution de GAMBORG et al. (1974) (tableau I).

A cette solution de base, nous avons ajouté du sucre (saccharose 2 % ou 3 %), des vitamines (1 ml par litre de milieu de culture d'une solution contenant pour 100 ml d'eau distillée : glycolle (20 mg), acide nicotinique (5 mg), thiamine.HCl (1 mg), pyridoxine.HCl (1 mg)), des substances de croissance (2,4-D ; AIA ; ANA ; K ; 6-benzylaminopurine (BAP) ; acide gibbèrellique (GA₃).

Le pH du milieu est ajusté à 5,5 avec KOH 1 N, il est solidifié avec de l'agar (0,8 %) et autoclavé 20 minutes à 120°C.

Les cultures sont réalisées à 25 ± 1°C et à la lumière blanche continue fournie par des tubes fluorescents (environ 500 lux).

TABLEAU I
COMPOSITION DES SOLUTIONS MINÉRALES AYANT SERVI
DE BASE POUR LES MILIEUX DE CULTURE

	BLAYDES (1966) modifié	STREET (1957) modifié
<i>Macroéléments</i>		
Ca (NO ₃) ₂ , 4 H ₂ O	-	200
KCl	-	65
KNO ₃	1000	80
NH ₄ H ₂ PO ₄	300	-
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	350	35
Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	-	16,5
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	440	-
Na ₂ - E D T A	37,25	-
Fe SO ₄ , 7 H ₂ O	25,85	-
<i>Microéléments</i>		
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	2	2
MnSO ₄ , 4 H ₂ O	10	10
H ₃ BO ₃	3	3
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,025	0,025
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	0,25	0,25
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0,025	0,025

(les concentrations sont données en mg/l)

B - ENSEMENCEMENT DES MILIEUX DE CULTURE

Les fragments de racines (1 cm), de tiges (1 cm) et de feuilles (5 à 10 mm) prélevés aseptiquement sont placés horizontalement sur les milieux de culture pour l'initiation des cals.

Après environ un mois de culture des plantes de luzerne, les noeuds sont sectionnés et mis en culture, la section reposant sur la gélose.

C - TECHNIQUE HISTOLOGIQUE

Pour l'étude histologique, nous nous sommes inspiré de la technique de HA NGOC et TRAN THANH VAN (1979) que nous avons modifiée afin de l'adapter à notre matériel. Les explantats primaires et les cals sont fixés pendant 18 heures par le fixateur de Brachet composé d'éthanol à 95°, d'aldéhyde formique à 30 % et d'acide acétique concentré dans les proportions de 85, 10 et 5. Les explantats et les cals sont ensuite lavés à l'eau courante 4 à 5 fois, puis déshydratés dans des solutions d'éthanol à concentration progressivement croissante (alcool à 70° : 4 h ; à 95° : 2 h ; à 100° : 1 h), et passés dans deux bains de toluène d'une heure chacun. Ils sont inclus dans la paraffine et débités en coupe de 12 à 14 µm. Après déparaffinage (2 bains de xylène de 5 minutes chacun ; alcool absolu : 10 mn ; 5 minutes dans l'alcool à 95°, 70° et 50°), les coupes sont colorées pendant 1 à 2 heures par le mélange vert de méthyle et pyronine, puis montées dans l'euparal et séchées à l'étuve.

III - RÉGÉNÉRATION DE PLANTES DE LUZERNE À PARTIR DE COLONIES TISSULAIRES

Nous avons gardé le milieu de base tel qu'il a été décrit auparavant. Les cultures sont réalisées soit en milieu solide (agar 0,8 %) soit en milieu liquide avec comme support du papier filtre plié en accordéon (RACCA, 1980). Avec ce milieu de base, nous avons testé l'influence de diverses phytohormones sur la néoformation de bourgeons et de racines.

Les conditions de culture sont celles définies précédemment.

IV - INOCULATION DES PLANTES DE LUZERNE AVEC RHIZOBIUM MELILOTI

A - MILIEU ET CONDITIONS DE CULTURE

C'est la solution de STREET (1957) modifiée qui a été utilisée. Elle renferme des vitamines et ne contient ni sucre, ni azote. Ce milieu est soit solidifié (agar 0,8 %), soit liquide (support papier filtre plié en accordéon). Le pH est ajusté à 6,0 - 6,5. Le milieu est ensuite autoclavé 20 minutes à 120°C.

Les cultures sont placées à $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et à la lumière blanche continue, les parties racinaires étant maintenues à l'obscurité.

B - PREPARATION DE L'INOCULUM BACTERIEN ET INOCULATION DES PLANTES

La souche de *Rhizobium meliloti* est la 2011 streptomycine résistante DENARIE.

On additionne 0,5 ml d'une culture de *Rhizobium* (conservée antérieurement dans du glycérol à -20°C), à 9,5 ml de milieu complet pour *Rhizobium* (R C, tableau II) renfermant 1 % de glucose. Les tubes de culture, agités, sont mis à incuber à 30°C pendant 24 ou 36 heures afin que les bactéries atteignent une croissance exponentielle (D.O. 80, lue au spectrophotomètre à 600 nm). Après incubation, les cultures sont centrifugées pendant 10 minutes à 8 000 tours/minute. Le culot bactérien, après élimination du surnageant, est repris avec du milieu pour *Rhizobium* sans azote (R, tableau II), puis centrifugé comme précédemment. Le surnageant est à nouveau éliminé et le culot est repris avec du milieu NICOL-THORNTON (tableau II), cette opération constituant la dernière phase de la préparation.

Les plantes sont inoculées avec 0,5 ml de suspension bactérienne. Les plantes inoculées sont cultivées pendant 45 jours.

TABLEAU II

COMPOSITION DES MILIEUX POUR *RHIZOBIUM* UTILISES POUR LA
PREPARATION DE LA SUSPENSION BACTERIENNE DE *RHIZOBIUM*

	RC	R	NICOL-THORNTON
<i>Eléments</i>			
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	200	200	200
K ₂ HPO ₄	1000	1000	1000
FePO ₄	-	-	1000
Ca ₃ (PO ₄) ₂	-	-	2000
NaCl	-	-	100
FeCl ₃	-	-	10
Extrait de levure	1000	-	-
Glucose	1000	-	-

(concentrations exprimées en mg/l)

V - EXPRESSION DES RÉSULTATS

A - EVALUATION DE LA CALLOGENESE ET DE LA NEOFORMATION D'ORGANES

Le nombre de cals formés a été exprimé en % du nombre de cultures. Nous avons également noté la présence ou non d'organes néoformés, et parfois leur aspect morphologique.

Le nombre de cals porteurs de bourgeons et racines a été exprimé en % du nombre de cultures. Les plantes entières obtenues à partir de ces cultures sont aussi dénombrées.

B - EVALUATION DE LA CROISSANCE DES PLANTES INOCULEES AVEC RHIZOBIUM

1) Evaluation de la croissance et de la nodulation

45 jours après l'inoculation, nous dénombrons les racines néoformées et les nodules apparus sur ces racines. Nous mesurons les plantes et les pesons.

2) Mesure de l'activité nitrogénase par le test de réduction de l'acétylène en éthylène

a - principe du test

La nitrogénase est l'enzyme qui catalyse la réduction de l'azote en ammoniacque :



L'étude de l'inhibition compétitive de la fixation d'azote par l'acétylène (DILWORTH, 1966) a conduit KOCH et EVANS (1966) à proposer l'utilisation de la mesure de la réduction de l'acétylène en éthylène comme moyen de mesurer l'activité nitrogénase.

L'acétylène est réduit suivant la réaction :



Elle correspond au transfert de deux électrons par molécule d'éthylène formée alors qu'il faut 6 électrons pour réduire une molécule d'azote. La fixation d'une molécule d'azote se fait donc dans les mêmes conditions que les 3 molécules d'éthylène. C'est cette analogie qui rend la méthode applicable.

b - appareil de mesure et conditions de travail

L'appareil utilisé pour la mesure de l'activité nitrogénase est le chromatographe en phase gazeuse INTERSMAT I.G.C. 112 F.L. II est muni d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne (2 m de long/0,31 cm de diamètre) remplie de sphérosil X OB 075.

c - technique de dosage et méthode de calcul des résultats

45 jours après l'inoculation, les plantes sont transférées dans un flacon de 140 ml fermé hermétiquement. On retire à l'aide d'une seringue 14 ml d'air du flacon que l'on remplace par 14 ml d'acétylène, puis 2 ml de propane (témoin interne pour le dosage). Le flacon est ensuite homogénéisé par agitation manuelle et on y prélève à la micro-seringue 0,5 ml pour l'injecter dans le chromatographe. Ce prélèvement correspond à la quantité d'éthylène formé au temps $t : 0$.

Après l'injection au temps 0, le flacon est placé dans l'étuve à 32°C. Au bout de 7 heures d'incubation, on homogénéise à nouveau le contenu du flacon et on injecte 0,5 ml dans le chromatographe pour mesurer la quantité d'éthylène produite.

La quantité d'éthylène produite est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$Q = C \times K \times \frac{H_1}{H_2}, \text{ dans laquelle :}$$

Q = nombre de μmoles de C_2H_4 produites dans le flacon

C = nombre de μmoles de C_3H_8 injectées dans le flacon

$C = 1,27 \mu\text{moles}$ de C_3H_8 injectées dans le flacon

K = coefficient de proportionnalité défini auparavant ($K = 1,5$ pour le rapport propane/éthylène). Il est établi à partir d'un mélange en proportions égales (V/V) de propane et d'éthylène dans l'air.

H_1 = hauteur du pic d'éthylène (C_2H_4)

H_2 = hauteur du pic de C_3H_8 (propane)

$$\text{d'où : } W = Q_7 - Q_0$$

où : Q_7 = quantité d'éthylène au temps $t = 7$ heures

Q_0 = quantité d'éthylène produite au temps $t = 0$

C - ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS

La valeur statistique des résultats a été recherchée par le test du F de SNEDECOR à un facteur contrôlé et par le test de t de STUDENT (MOREAU et MATHIEU, 1979). Les calculs sont effectués sur calculatrice programmable.

RESULTATS

I

MISE AU POINT D'UN SCHEMA EXPERIMENTAL DE REGENERATION
DE LUZERNE A PARTIR DE TISSUS CULTIVES IN VITRO

I - OBTENTION DE COLONIES TISSULAIRES DE LUZERNE

A - CULTURE DE FRAGMENTS DE FEUILLES, DE TIGES ET DE RACINES

Cultivés sur milieu de base (solution de BLAYDES modifiée, renfermant 3 % de saccharose et des vitamines), les fragments de feuilles, de tiges et de racines ne manifestent aucune activité prolifératrice, celle-ci ne s'observe qu'en présence de facteurs de croissance. Le tableau III montre la formation de cals après 20 jours de culture sur milieu de base contenant différentes substances de croissance, utilisées seules ou associées.

Parmi les organes mis en culture, les racines montrent une plus grande aptitude à proliférer ; les tiges ont des réponses variées vis-à-vis des phytohormones ; les feuilles présentent souvent des nécroses quelques jours après la mise en culture, avec, dans quelques cas, des cals bien formés. Les explantats de feuilles forment généralement des cals compacts sur lesquels apparaissent ultérieurement des amas plus friables à croissance rapide.

Lorsque le milieu de culture ne contient que des substances auxiniques (ANA ou 2,4-D), les cals obtenus sont jaune-blanc ; les racines apparaissent parfois en présence de l'ANA. L'adjonction d'une cytokinine (K ou BAP) provoque le verdissement des colonies

Aucune néoformation de bourgeons sur les cals n'a été cependant observée.

B - CULTURE DE NOEUDS

Les noeuds prélevés sur des plantes cultivées aseptiquement sont mis en culture sur le milieu de base additionné de saccharose (2 %), d'AIB (10^{-6} M), de 2,4-D (10^{-7} M) et de GA₃ (10^{-7} M).

TABLEAU III

INFLUENCE DES HORMONES SUR LA FORMATION DES CALS PAR LES FRAGMENTS
D'ORGANES DE LUZERNE CULTIVES SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE (25 ± 1°C ; LUMIERE)

Organe mis en culture	Substances de croissance	Nombre de cultures	Nombre d'explantats ayant formé un cal (%)	Observations après 20 j. de culture
<u>Racines</u>				
	2,4-D (1)	12	100	cals jaunâtres, mous
	ANA (1)	12	33,33	cals jaunâtres, mous, racines
	ANA (5)	12	41,66	cals jaunâtres, mous, racines
	K (1)	12	0,00	pas de cals, nécrose des explantats
	BAP (1)	12	0,00	pas de cals, nécrose des explantats
	2,4-D (1) + K (1)	12	58,33	cals jaunâtres, mous
	2,4-D (1) + BAP (1)	12	100	cals verdâtres, mous
	ANA (1) + K (1)	12	80,33	cals chlorophylliens, mous
	ANA (1) + 2,4-D (1)	12	41,66	cals jaunâtres, mous
	K (1) + ANA (1) + 2,4-D (1)	12	75,25	cals verdâtres, mous
	BAP(1)			
<u>Tiges</u>				
	2,4-D (1)	12	33,33	cals jaunâtres, mous
	ANA (1)	12	41,66	cals jaunâtres, mous
	2,4-D (1) + K (1)	12	58,33	cals jaunâtres, mous
	2,4-D (1) + BAP (1)	12	66,66	cals verdâtres, mous
	ANA (1) + BAP (1)	12	50	cals verdâtres, mous
	ANA (1) + 2,4-D (1)	12	58,33	cals verdâtres, mous
	BAP (1)			
<u>Feuilles</u>				
	2,4-D (1)	12	0,00	pas de cals, nécrose des explantats
	ANA (1)	12	0,00	pas de cals, nécrose des explantats
	2,4-D (1) + BAP (0,2)	12	41,66	cals verdâtres, durs
	ANA (1) + BAP (0,2)	12	83,33	cals verdâtres, durs
	ANA (0,2) + BAP (0,2)	12	25	cals verdâtres, durs, développement lent
	ANA (0,1) + BAP (0,2)	12	12,50	cals verdâtres, développement lent

Concentrations en mg/l signalées entre parenthèses
Résultats observés après 20 jours de culture.



Au bout de 30 jours environ, la quasi-totalité des noeuds ont produit des colonies tissulaires (tableau IV) qui portent des bourgeons néoformés. La culture ultérieure de ces colonies a permis l'isolement d'une souche "bourgeonnante".

Dans quelques cas, les bourgeons axillaires se développent, forment des racines et reconstituent des plantes entières.

Libérés de la dominance apicale, les bourgeons axillaires se développent environ une semaine après la mise en culture. Dès lors, ils présentent un gonflement à leur base, et au bout de la quatrième semaine, les cals sont visibles avec déjà la présence de bourgeons néoformés.

TABLEAU IV

FORMATION DE CALS PAR LES NOEUDS CULTIVES SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE ($25 \pm 1^\circ\text{C}$; LUMIERE).

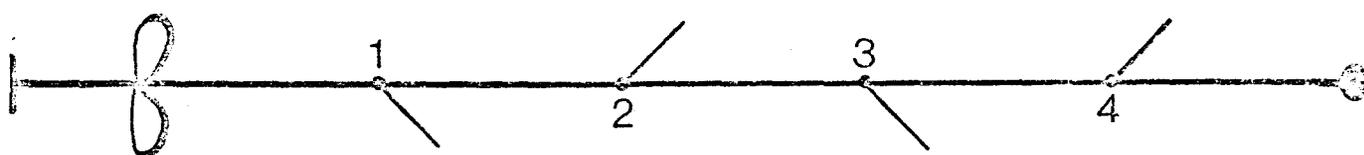
% cal avec bourgeons	% plantes régénérées	% noeuds nécrosés
80,33	16,66	3,01

Résultats observés sur 12 noeuds après 30 jours.

1) Influence du lieu de prélèvement des explantats sur l'aptitude à produire un cal organogène

Les noeuds ont été mis en culture sans tenir compte de leur position sur la tige. Les réponses observées nous ont incité à rechercher l'influence éventuelle du lieu de leur prélèvement sur l'aptitude à bourgeonner.

Nous avons récolté sur soixante tiges de luzerne des noeuds à quatre niveaux différents selon le schéma ci-dessous :



Après 30 jours de culture, les noeuds ont fourni les réponses résumées dans le tableau V.

La valeur statistique des résultats est recherchée par le test du F.

Le F calculé est égal à 2,11. Dans la table de F, on lit :

$$F_{0,05} (3;232) = 3,04$$

La probabilité P attachée à la valeur du F calculé est telle que :

$$P (F < 3,04) < 0,05$$

Aussi, les variances ne sont-elles pas significativement différentes au seuil de 5 %.

La position, plus ou moins éloignée du pôle racinaire ou de l'apex végétatif, n'influe pas sur le devenir du noeud.

2) Action conjuguée du 2,4-D et de K sur la formation de cals par les noeuds

Nous ajoutons simultanément au milieu de base du 2,4-D ($2 \cdot 10^{-7}$ et $2 \cdot 10^{-6}$ M) et de la K (10^{-5} , $2 \cdot 10^{-5}$ et $4 \cdot 10^{-5}$ M).

Les résultats (tableau VI) confirment le pouvoir de prolifération des noeuds. Toutes les combinaisons éprouvées ont induit la formation des cals, mais seulement quelques-uns ont formé des bourgeons.

C - FORMATION DE CALS PAR LES FRAGMENTS DE TIGES, DE FEUILLES ET DE RACINES CULTIVÉS SUR MILIEU DE BLAYDES RENFERMANT AIB ; 2,4-D ET GA₃

Après avoir étudié la formation de cals par les fragments de tiges, de feuilles et de racines cultivés sur milieu de base renfermant divers facteurs de croissance, nous avons éprouvé leurs réactions sur un milieu favorable à la néoformation de bourgeons.

Après 30 jours de culture, les résultats (tableau VII) font apparaître une plus faible aptitude à proliférer sur ce milieu. Les cals de racines et de tiges ont produit des racines. Les explantats de feuilles n'ont pas proliféré.

TABLEAU V
 INFLUENCE DU LIEU DE PRELEVEMENT DES EXPLANTATS SUR
 L'APTITUDE A PRODUIRE UN CAL ORGANOGENE

Tige	Niveau du prélèvement				Tige	Niveau du prélèvement			
	1	2	3	4		1	2	3	4
1	0	0	1	2	31	0	0	0	2
2	2	1	0	0	32	1	1	2	0
3	0	0	0	0	33	0	0	0	0
4	0	1	2	2	34	1	1	0	1
5	0	0	1	1	35	1	0	0	0
6	0	2	0	1	36	2	0	0	2
7	1	0	0	0	37	0	2	2	0
8	0	1	1	1	38	1	0	0	1
9	1	0	1	0	39	0	0	1	2
10	2	0	2	0	40	0	1	0	0
11	0	0	0	2	41	1	0	0	0
12	1	1	2	0	42	0	0	1	0
13	0	0	0	0	43	2	1	0	2
14	1	1	0	1	44	1	2	1	0
15	1	0	0	0	45	1	0	2	1
16	2	0	0	2	46	0	0	0	2
17	0	2	2	0	47	0	1	0	0
18	1	0	0	1	48	1	1	0	1
19	0	0	1	2	49	2	0	0	1
20	0	1	0	0	50	0	0	0	1
21	0	0	1	2	51	1	0	1	1
22	2	1	0	0	52	0	0	2	0
23	0	0	0	0	53	2	1	0	0
24	0	1	1	2	54	0	2	0	1
25	0	0	1	1	55	1	1	0	2
26	0	2	0	1	56	1	0	2	0
27	1	0	0	0	57	0	0	0	1
28	1	0	1	1	58	2	2	0	0
29	1	0	1	0	59	2	0	1	1
30	2	0	2	0	60	0	1	0	0

pas de cal : 0

cal organogène : 1

plante régénérée : 2

Noeuds cultivés sur milieu de BLAYDES modifié renfermant AIB, 2,4-D et GA₃ (25 ± 1°C ; lumière).

Résultats observés après 30 jours.



TABLEAU VI

INFLUENCE DU 2,4-D ET DE LA K SUR LA FORMATION DE CALS,
PAR LES NOEUDS CULTIVES SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE ($25 \pm 1^\circ\text{C}$; LUMIERE)

2,4-D/K (M/l)	Nombre de cals (%)	Nombre de cals avec bourgeons (%)	Nombre moyen de bourgeons/cal
$\frac{2 \cdot 10^{-7}}{10^{-5}}$	33,33	25	1,25
$\frac{2 \cdot 10^{-7}}{2 \cdot 10^{-5}}$	25	12,5	2,42
$\frac{2 \cdot 10^{-7}}{4 \cdot 10^{-5}}$	16,66	0,0	0,00
$\frac{2 \cdot 10^{-6}}{10^{-5}}$	66,66	16,66	0,96
$\frac{2 \cdot 10^{-6}}{2 \cdot 10^{-5}}$	41,66	8,33	1,25
$\frac{2 \cdot 10^{-6}}{4 \cdot 10^{-5}}$	25	0,00	0,00

Résultats observés sur 12 noeuds par condition après 30 jours.



Aucun cal n'a formé de bourgeons, malgré les fortes teneurs en K.

TABLEAU VII

FORMATION DE CALS PAR LES FRAGMENTS D'ORGANES DE
LUZERNE CULTIVÉS SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIÉ RENFERMANT
AIB ; 2,4-D ET GA₃ (25 ± 1°C ; LUMIÈRE)

	Nombre de cals (%)	Nombre de cals avec racines (%)	Nombre de cals avec bourgeons (%)
Feuilles	0,0	0,0	0,0
Tiges	33,33	16,66	0,0
Racines	8,33	8,33	0,0

Résultats observés sur 12 explantats après 30 jours.

II - ÉTUDE DE LA NÉOFORMATION D'ORGANES PAR LES TISSUS DE LUZERNE

Les colonies tissulaires de luzerne peuvent se ranger en deux groupes : le premier comprend les colonies provenant de feuilles, de tiges et de racines qui forment des racines mais pas de bourgeons. Le second groupe est constitué par les colonies tissulaires provenant de noeuds qui sont capables de néoformer des bourgeons.

L'étude de la néoformation d'organes a consisté, par conséquent, à rechercher les conditions de milieu susceptibles d'induire la néoformation de bourgeons par les colonies tissulaires du premier groupe (essentiellement les colonies provenant de racines), puis à trouver les moyens de stimuler la néoformation de bourgeons par celles qui proviennent de noeuds.

A - NEOFORMATION D'ORGANES PAR LES COLONIES TISSULAIRES PROVENANT DE RACINES

1) Action des substances auxiniques

Nous avons cultivé les cals de racines sur milieu de base renfermant une substance auxinique (AIA, AIB, ANA ou 2,4-D) aux concentrations de 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} M.

A l'exception du 2,4-D, les substances auxiniques ont permis la néoformation de racines aux fortes concentrations (10^{-5} et 10^{-4} M).

Aucune néoformation de bourgeons n'a été observée sur ces colonies (tableau VIII).

2) Action des cytokinines

La K et la BAP ont été utilisées aux concentrations de 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} M.

Quelle que soit la concentration éprouvée, aucune néoformation d'organes n'a été décelée (tableau VIII).

3) Action conjuguée de l'auxine et de la cytokinine

Nous avons incorporé au milieu de base simultanément de l'AIA ($4,5 \cdot 10^{-6}$ M) et de la BAP ($6,1 \cdot 10^{-5}$ M).

Après deux mois de culture, la majorité des cals n'ont formé que des racines (en effet, seulement deux cals sur douze mis en culture portent racines et bourgeons) (tableau IX).

TABLEAU IX

ACTION CONJUGUEE DE L'AIA ET DE LA BAP SUR LA NEOFORMATION
DE RACINES ET DE BOURGEONS PAR LES COLONIES TISSULAIRES PROVENANT DE
RACINES CULTIVEES SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; LUMIERE)

	Nombre de cultures	Nombre de colonies avec racines (%)	Nombre de colonies avec racines et bourgeons (%)
Témoin	12	0,00	0,00
Témoin + AIA ($4,5 \cdot 10^{-6}$ M) BAP ($6,1 \cdot 10^{-5}$ M)	12	66,66	16,66

Résultats observés après 2 mois de culture.

B - NEOFORMATION D'ORGANES PAR LES COLONIES TISSULAIRES PROVENANT DE NOEUDS

- 1) Maintien du pouvoir caulogène des colonies tissulaires provenant de noeuds cultivées sur milieu renfermant AIB ; 2,4-D et GA_3

Dès leur isolement, les colonies tissulaires de noeuds ont formé des bourgeons *de novo*. Au cours de 3 repiquages consécutifs, nous avons constaté que leur capacité caulogène se maintient comme l'indiquent les résultats du tableau X.

Les bourgeons apparaissent sur toute la surface des colonies. Maintenus sur le milieu de base, les colonies tissulaires continuent à former des bourgeons qui restent, le plus souvent, à l'état de préfeuilles unifoliées.

TABLEAU X

NEOFORMATION DE BOURGEONS PAR LES COLONIES TISSULAIRES
 PROVENANT DE NOEUDS CULTIVEES SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE
 RENFERMANT AIB ; 2,4-D ET GA₃ (25 ± 1°C ; LUMIERE)

		Nombre moyen de bourgeons néoformés/colonie
	1	4,83
après passage n°	2	5,12
	3	5,55

Résultats moyens calculés sur 12 colonies après 30 jours

Les coupes pratiquées dans les colonies montrent :

- une zone parenchymateuse sans différenciation nette dans laquelle on aperçoit, par endroits, quelques nodules méristématiques ;
- des zones méristématiques périphériques avec présence de nombreux dômes bordés d'une couche de cellules externes qui entourent des cellules internes plus petites aux noyaux bien visibles, et qui forment un ensemble compact très coloré par le Brachet, ce qui témoigne d'une intense activité mitotique.

2) Influence des hormones sur la croissance des colonies tissulaires provenant de noeuds

Les colonies tissulaires provenant de noeuds ont été isolées sur milieu de base comportant à la fois AIB, 2,4-D et GA₃. Il nous a paru intéressant de rechercher l'influence spécifique de chaque élément hormonal de ce milieu.

Nous avons donc cultivé les colonies tissulaires sur milieu de base renfermant GA₃ ; AIB ; 2,4-D ; GA₃ + AIB ; GA₃ + 2,4-D ou AIB + 2,4-D.

Les résultats obtenus au cours de trois repiquages consécutifs (tableau XI) indiquent une baisse sensible de la néoformation de bourgeons

par les colonies tissulaires provenant de noeuds, à l'exception du milieu renfermant $GA_3 + 2,4-D$, sur lequel il y a maintien et même légère stimulation de la néoformation de bourgeons.

TABLEAU XI

INFLUENCE DES HORMONES SUR LA NEOFORMATION DE BOURGEONS
PAR LES COLONIES TISSULAIRES PROVENANT DE NOEUDS CULTIVEES
SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE ($25 \pm 1^\circ C$; LUMIERE)

		Milieu de base +					
		GA_3 ($10^{-7}M$)	2,4-D ($10^{-7}M$)	AIB ($10^{-6}M$)	$GA_3 +$ AIB	$GA_3 +$ 2,4-D	AIB + 2,4-D
après passage n°	1	2,83	0,83	0,66	3,16	5,91	1,58
	2	1,05	0,5	0,56	2,08	6,08	0,41
	3	0,83	0,58	0,41	1,41	6,16	0,25

Moyennes calculées sur 12 colonies après 30 jours

Les bourgeons néoformés, quoique nombreux, restent encore à l'état de préfeuilles petites et plus ou moins verdâtres. Bien souvent, elles se nécrosent après trente jours. Il nous fallait, par conséquent, trouver les moyens de favoriser la croissance des bourgeons.

3) Influence du 2,4-D ($10^{-7} M$) et d'une forte teneur en GA_3 ($5 \cdot 10^{-6} M$) sur la néoformation et la croissance des bourgeons

Les colonies sont cultivées pendant trois passages consécutifs sur milieu de base renfermant 2,4-D ($10^{-7} M$) et GA_3 ($5 \cdot 10^{-6} M$). Au cours des trois repiquages, les colonies conservent leur capacité caulogène. De plus, les bourgeons néoformés atteignent une taille variant entre 5 et 10 mm (tableau XII).

TABLEAU XII
 INFLUENCE CONJUGUEE DU 2,4-D (10^{-7} M) ET DE GA_3 ($5 \cdot 10^{-6}$ M)
 SUR LA NEOFORMATION ET LA CROISSANCE DES BOURGEONS CULTIVES
 SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE ($25 \pm 1^\circ C$; LUMIERE)

		Nombre moyen de bourgeons/colonie	Taille moyenne (mm) \pm erreur standard
	1	5,25	5,1 \pm 0,2
après passage n°	2	6,02	7,5 \pm 1,2
	3	6,14	10,2 \pm 2,5

Moyennes obtenues sur 12 colonies après 30 jours.

Les bourgeons néoformés présentent encore des nécroses, brunissent et finissent par perdre leur chlorophylle. Nous avons songé à remplacer le 2,4-D par l'ANA.

4) Effet de l'ANA et de GA_3 sur la néoformation de bourgeons par les colonies tissulaires provenant de noeuds

L'ANA est utilisé à trois concentrations (10^{-7} , $5 \cdot 10^{-7}$ et 10^{-6} M) en présence de GA_3 ($5 \cdot 10^{-6}$ M).

Avec les concentrations de $5 \cdot 10^{-7}$ et 10^{-6} M, l'ANA permet de façon satisfaisante le maintien des capacités néoformatrices de bourgeons des colonies (tableau XIII). Les bourgeons manifestent une plus grande vigueur et ont un aspect chlorophyllien marqué. En plus des préfeuilles unifoliées, les colonies portent aussi des feuilles bi et trifoliées.

En baissant la teneur en saccharose à 1 %, les préfeuilles évoluent en feuilles normales. Quelques bourgeons prennent l'ascendant sur les autres dont la croissance reste plus limitée. Les bourgeons présentent l'aspect de jeunes plantules. Certaines d'entre-elles forment des systèmes racinaires, reconstituant alors des plantes entières.

TABLEAU XIII

INFLUENCE DE L'ANA ET DE GA₃ SUR LA NEOFORMATION DE BOURGEONS
PAR LES COLONIES TISSULAIRES PROVENANT DE NOEUDS CULTIVEES SUR
MILIEU DE BLAYDES MODIFIE (25 ± 1°C ; LUMIERE)

	ANA (M)	GA ₃ (5.10 ⁻⁶ M)
1	10 ⁻⁷	1,25
	5.10 ⁻⁷	5,5
	10 ⁻⁶	6,66
après passage n° 2	10 ⁻⁷	1,08
	5.10 ⁻⁷	5,35
	10 ⁻⁶	5,75
3	10 ⁻⁷	1,5
	5.10 ⁻⁷	5,83
	10 ⁻⁶	6,16

Moyennes obtenues sur 12 colonies après 30 jours.

En présence donc d'ANA et de GA₃, avec une teneur en saccharose de 1 %, nous avons amené les bourgeons néoformés à l'état de jeunes plantules. Il nous restait à trouver les conditions pour que ces plantules puissent former des racines.

5) Problème de l'enracinement des plantules régénérées *in vitro*

A part quelques systèmes racinaires apparus sur le milieu favorable au bourgeonnement, dans tous les cas, nous avons dû stimuler la néoformation de racines par les plantules.

a - action des substances auxiniques

Les substances auxiniques (AIA, AIB et ANA) sont éprouvées sur milieu de base liquide ou gélosé.

TABLEAU XIV

INFLUENCE DES SUBSTANCES AUXINIQUES SUR LA NEOFORMATION DE
RACINES PAR LES PLANTULES DE LUZERNE CULTIVEES
SUR MILIEU BLAYDES MODIFIE ($25 \pm 1^\circ\text{C}$; LUMIERE)

		Pourcentage de plantules enracinées	
		Milieu liquide	Milieu gélosé
		<u>AIA (M)</u>	
Après	10^{-7}	0,00	0,00
	$5 \cdot 10^{-7}$	25	0,00
	10^{-6}	8,33	0,00
		<u>AIB (M)</u>	
30	10^{-7}	0,00	0,00
	$5 \cdot 10^{-7}$	8,33	0,00
	10^{-6}	16,66	0,00
		<u>ANA (M)</u>	
	10^{-7}	0,00	0,00
	$5 \cdot 10^{-7}$	8,33	0,00
	10^{-6}	16,66	0,00
		<u>AIA (M)</u>	
Après	10^{-7}	0,00	0,00
	$5 \cdot 10^{-7}$	33,33	0,00
	10^{-6}	16,66	0,00
		<u>AIB (M)</u>	
45	10^{-7}	0,00	0,00
	$5 \cdot 10^{-7}$	50	0,00
	10^{-6}	25	0,00
		<u>ANA (M)</u>	
jours	10^{-7}	0,00	0,00
	$5 \cdot 10^{-7}$	66,66	16,66
	10^{-6}	33,33	0,00

Pourcentages calculés sur 12 plantules.



L'examen des résultats (tableau XIV) après 30 et 45 jours de culture montre que l'enracinement des plantules sur milieu gélosé est quasi nul, quelle que soit la concentration en substance auxinique utilisée.

Sur milieu liquide par contre, les substances auxiniques ont induit la néoformation de racines, avec un effet plus marqué de l'ANA. Les concentrations de 5.10^{-7} et 10^{-6} M se sont montrées les plus favorables à la rhizogenèse.

Le rôle stimulateur du saccharose sur la néoformation de racines par les fragments de tige de pois a été mis en évidence par LEROUX (1973). Afin d'améliorer le taux d'enracinement des plantules de luzerne, nous avons utilisé plusieurs concentrations de saccharose.

b - influence de la concentration en saccharose sur la néoformation de racines par les plantules de luzerne régénérées in vitro

Les plantules sont cultivées sur milieu de base liquide additionné de 5.10^{-7} M d'ANA et de différentes concentrations de saccharose.

C'est à la concentration de 2 % que la néoformation de racines est la plus importante, les teneurs plus élevées (3 à 6 %) se montrant très peu favorables ou totalement défavorables (tableau XV).

TABLEAU XV

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SACCHAROSE SUR LA NEOFORMATION DE RACINES PAR LES PLANTULES DE LUZERNE CULTIVEES SUR MILIEU DE BLAYDES MODIFIE EN PRESENCE D'ANA ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; LUMIERE)

Saccharose (%)	ANA ₇ (5.10^{-7} M)
1	33,33
2	75
3	8,33
4	0,00
5	0,00
6	0,00

Pourcentages d'enracinement calculés sur 12 plantules après 30 jours.

II

NODULATION DES PLANTES DE LUZERNE APRES
INFECTION PAR RHIZOBIUM MELILOTI

I - NODULATION DES PLANTES ISSUES DE GRAINES

Nous n'avons pas envisagé tous les aspects de la symbiose, mais nous avons porté notre attention sur certains d'entre-eux, notamment l'influence sur la nodulation du support cultural, de quelques agents oxydants ($KMnO_4$ et Acide citrique), de la présence ou non de l'extrémité racinaire et enfin de la partie feuillée.

A - INFLUENCE DU SUPPORT CULTURAL SUR LA NODULATION DES PLANTES DE
LUZERNE INOCULEES AVEC RHIZOBIUM MELILOTI

Après germination, les plantes âgées de quatre jours (racines de 1 à 2 cm de longueur) sont repiquées aseptiquement sur milieu de STREET modifié ne renfermant ni azote, ni sucre, mais du chlorure de calcium (440 mg/l) dont le rôle favorable sur la nodulation a été mentionné antérieurement. Les plantes sont inoculées avec 0,5 ml de suspension bactérienne (soit $4 \cdot 10^7$ bactéries).

Les plantes inoculées sont cultivées sur trois types de support : vermiculite, gélose et papier filtre plié en accordéon (RACCA, 1980).

Les résultats après 45 jours de culture (tableau XVI) mettent en évidence l'aptitude des plantes à noduler sur tous les supports éprouvés.

L'inconvénient du support vermiculite réside dans le fait qu'il ne permet pas l'observation directe de l'évolution de la nodulation, notamment l'apparition dans le temps des racines secondaires et des nodules.

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressé davantage aux supports gélosé et papier filtre.

Sur le support papier filtre, les plantes présentent les premiers nodules 7 à 10 jours après l'inoculation sur la racine principale. C'est après le dixième jour que les racines secondaires portent leurs premiers nodules. L'examen à la loupe binoculaire des racines en croissance montre que celles-ci possèdent de nombreux poils absorbants.

Sur support gélosé, le moment d'apparition des premiers nodules est le même que précédemment. Seulement, tous les nodules apparaissent essentiellement sur les portions de racines se trouvant hors de la gélose. Les racines qui se trouvent dans la gélose ne portant aucun nodule. Elles sont également dépourvues de poils absorbants.

TABLEAU XVI

INFLUENCE DU SUPPORT CULTURAL SUR LA NODULATION DES PLANTES DE LUZERNE

	1	2	3	4	5	6
support vermiculite	18,25	35,85	31,25	12,5	32,25	$1,21 \cdot 10^{-3}$
support gélose	12,45	22,25	23,15	4,5	20,75	$2,67 \cdot 10^{-4}$
support papier filtre	15,12	26,1	27,5	8,75	23,2	$0,94 \cdot 10^{-3}$

1 : allongement moyen (cm) de la tige

2 : allongement moyen (cm) de la racine principale

3 : nombre moyen de racines néoformées

4 : nombre moyen de nodules

5 : poids moyen (mg) de matière sèche (M.S.)

6 : ΔQ (quantité d'éthylène produite en 7 h) en $\mu\text{moles/mg M.S.}$

Moyennes calculées sur 8 plantes après 45 jours.

B - EFFET DU KMnO_4 ET DE L'ACIDE CITRIQUE SUR LA NODULATION DES PLANTES DE LUZERNE CULTIVEES SUR SUPPORT GELOSE

Nous avons tenté de corriger l'effet défavorable de la gélose sur la nodulation en utilisant deux substances susceptibles d'oxygéner davantage le milieu gélosé.

Les plantes de luzerne sont cultivées sur milieu de STREET modifié par différentes concentrations de KMnO_4 et d'acide citrique.

Les plantes âgées de quatre jours sont inoculées avec 0,5 ml de suspension bactérienne.

Le tableau XVII résume les résultats obtenus après 45 jours de culture. Ceux-ci font apparaître une légère stimulation de la nodulation. Toutefois, ces chiffres restent inférieurs à ceux observés avec le support papier filtre (tableau XVI). Cependant, nous constatons la présence de nodules sur les racines se développant dans la gélose lorsque le milieu renferme du KMnO_4 ou de l'acide citrique, tandis que les plantes témoins ne portent de nodules que sur les portions de racines restées hors du milieu gélosé.

C - INFLUENCE DU KMnO_4 ET DE L'ACIDE CITRIQUE SUR LA NODULATION DES PLANTES DE LUZERNE CULTIVEES SUR SUPPORT PAPIER FILTRE

Les résultats du tableau XVII nous ont incité à éprouver le KMnO_4 et l'acide citrique sur la nodulation des plantes cultivées sur support papier filtre.

La culture des plantes en présence du KMnO_4 et de l'acide citrique a donné les réponses consignées dans le tableau XVIII.

Les résultats obtenus n'ont pas révélé d'influence nette des substances utilisées. Aussi n'ont-elles pas été retenues pour la suite de nos expériences qui ont été réalisées sur support papier filtre.

TABLEAU XVII

INFLUENCE DU KMnO_4 ET DE L'ACIDE CITRIQUE SUR LA NODULATION
DES PLANTES DE LUZERNE CULTIVEES SUR SUPPORT GELOSE

	1	2	3	4		5
				a	b	
Témoïn	10,45	21,55	24,62	4,08	0,0	21,35
KMnO_4						
10^{-6} M	11,5	20,54	25,6	2,8	4,1	22,6
10^{-5} M	10,6	21,4	25,4	4,5	3,8	23,1
10^{-4} M	12,03	19,5	18,5	3,5	2,63	20,4
A.C.						
10^{-6} M	10,25	24	26,2	4,5	1,75	21,02
10^{-5} M	11,6	21,2	20,25	5,04	2,15	23,35
10^{-4} M	12,15	24,3	26,18	4,75	3,0	22,3

- 1 : allongement moyen (cm) de la tige
 2 : allongement moyen (cm) de la racine principale
 3 : nombre moyen de racines néoformées
 4 : nombre moyen de nodules
 a : nodules apparus sur les portions de
 racines se développant hors du milieu
 gélosé
 b : nodules apparus sur les portions de
 racines se développant dans le milieu
 gélosé
 5 : poids moyen (mg) de matière sèche (M.S.)
 Moyennes calculées sur 8 plantes après 45 jours.

TABLEAU XVIII

INFLUENCE DU KMnO_4 ET DE L'ACIDE CITRIQUE SUR LA NODULATION
DES PLANTES DE LUZERNE CULTIVEES SUR SUPPORT PAPIER FILTRE

	1	2	3	4	5
Témoin	14,87	25,76	25,38	7,15	24,01
KMnO_4					
10^{-6} M	14,27	26,1	25,8	8,25	24,28
10^{-5} M	15,3	24,5	26,7	9,1	23,45
10^{-4} M	12,87	22,5	24,25	7,35	21,4
A.C.					
10^{-6} M	14,54	21,2	23,2	8,32	20,76
10^{-5} M	14,85	24,7	22,4	7,75	23,9
10^{-4} M	15,7	23,5	20,14	7,6	21,8

- 1 : allongement moyen (cm) de la tige
 2 : allongement moyen (cm) de la racine principale
 3 : nombre moyen de racines néoformées
 4 : nombre moyen de nodules
 5 : poids moyen (mg) de matière sèche (M.S.)

Moyennes calculées sur 8 plantes après 45 jours.



D - INFLUENCE DE L'ABLATION DE L'EXTREMITÉ RACINAIRE SUR LA NODULATION
DES PLANTES DE LUZERNE CULTIVEES SUR SUPPORT PAPIER FILTRE

L'apex assure la croissance de la racine ; nous avons recherché son influence sur la nodulation des plantes.

Nous réalisons deux lots expérimentaux comportant l'un des plantes avec apex et l'autre des plantes sans apex (nous sectionnons les racines à 1 cm au-dessus de l'apex). Les plantes sont inoculées avec 0,5 ml de suspension bactérienne. L'expérience a été répétée quatre fois.

Les résultats, après 45 jours de culture, montrent que la suppression de l'extrémité racinaire n'empêche pas la formation des nodules (tableau XIX).

Pour les plantes du premier lot, toutes les racines (primaires et secondaires) portent des nodules. Dans le deuxième lot, ce sont les premières racines secondaires, apparues au niveau des cicatrices cinq à dix jours environ après ablation, qui prennent le relais des racines principales et qui portent les premiers nodules.

TABLEAU XIX

INFLUENCE DE L'ABLATION DE L'EXTREMITÉ RACINAIRE SUR
LA NODULATION DES PLANTES DE LUZERNE CULTIVEES SUR SUPPORT PAPIER FILTRE

	+ Apex			- Apex		
	1	2	3	1	2	3
série n°1	23,8	8,25	22,5	25,2	9,04	24,05
série n°2	21,7	7,65	20,6	24,8	8,15	22,16
série n°3	24,5	8,34	23,08	25,18	8,28	23,24
série n°4	23,1	8,0	22,12	24,9	7,95	23,26

1 : nombre moyen de racines néoformées

2 : nombre moyen de nodules

3 : poids moyen (mg) de matière sèche (M.S.)

Moyennes calculées sur 8 plantes/lot/série
après 45 jours.

Les résultats du tableau XIX montrent également que l'ablation de l'apex n'entraîne pas de variation quantitative du nombre de nodules. La croissance des plantes reste dans les deux cas identique.

E - NODULATION DES RACINES ISOLEES DE LUZERNE CULTIVEES SUR SUPPORT PAPIER FILTRE

Après avoir évoqué le rôle de l'apex dans la nodulation, nous nous sommes interrogé sur l'influence de la partie feuillée.

Nous avons cultivé des racines isolées sur support papier filtre plongeant dans du milieu de STREET modifié. Les racines sont réparties en deux lots dont l'un comporte du saccharose (2 %). L'inoculation est faite avec 0,5 ml de suspension bactérienne. L'expérience a été répétée quatre fois.

Les résultats après 45 jours (tableau XX) montrent que la nodulation des racines isolées est très faible. Comparés aux résultats antérieurs (tableau XVI), nous constatons que la partie feuillée a un effet prépondérant sur la croissance des racines et le nombre de nodules formés.

Sur le lot cultivé en présence de saccharose, nous observons une stimulation de la néoformation de racines, mais celle-ci ne s'accompagne pas d'une augmentation du nombre de nodules.

TABLEAU XX

NODULATION DES RACINES ISOLEES CULTIVEES SUR SUPPORT PAPIER FILTRE

	milieu sans saccharose		milieu avec saccharose (2 %)	
	1	2	1	2
série n°1	6,75	2,02	14,25	2,38
série n°2	5,88	1,97	13,86	2,15
série n°3	6,0	2,14	15,2	2,51
série n°4	6,35	2,25	14,1	2,27

1 : nombre moyen de racines néoformées

2 : nombre moyen de nodules

Moyennes calculées sur 8 plantes/lot/série après 45 jours.

L'étude préliminaire de la nodulation des plantes issues de graines nous a permis de montrer que la technique du support papier filtre plié en accordéon donne des résultats satisfaisants, en même temps qu'elle permet de suivre l'évolution de la nodulation dans le temps.

L'influence du KMnO_4 et de l'acide citrique a été si faible que nous n'avons pas jugé utile d'incorporer ces substances au milieu de culture pour les expériences ultérieures. L'ablation de l'apex racinaire n'apporte pas de différence essentielle dans le nombre de nodules et la croissance des plantes. Aussi n'avons-nous pas retenu ce procédé dans la suite de nos expériences.

Les racines forment davantage de nodules quand elles sont attachées à la partie feuillée.

Après l'étude de ces quelques paramètres de la nodulation, il nous restait à effectuer celle des plantes régénérées *in vitro* après inoculation avec *Rhizobium meliloti*.

II - ÉTUDE COMPARÉE DE LA NODULATION DES PLANTES DE LUZERNE ISSUES DE GRAINES ET RÉGÉNÉRÉES IN VITRO

A - INOCULATION DES PLANTES AVEC RHIZOBIUM MELILOTI

Nous avons réalisé sur milieu de STREET modifié ne comportant ni sucre, ni azote, mais du chlorure de calcium (440 mg/l), deux lots d'inoculations avec *Rhizobium meliloti* portant, l'un sur des plantes issues de graines et l'autre sur des plantes régénérées *in vitro*. L'expérience a été répétée quinze fois.

Les plantes régénérées *in vitro* sont transférées sur milieu de STREET modifié dès que les racines atteignent 1 à 2 cm de longueur. Les cultures sont réalisées sur support papier filtre plié en accordéon. Les plantes sont inoculées avec 0,5 ml de suspension bactérienne. Les plantes issues de graines sont inoculées dans les mêmes conditions.

Après 45 jours de culture, les résultats (tableau XXI) font apparaître une aptitude à noduler chez les plantes régénérées *in vitro*, et confirment celles des plantes issues de graines.

Comme nous l'avions observé précédemment, les plantes issues de graines présentent leurs premiers nodules sept à dix jours après l'inoculation.

Dans le cas des plantes régénérées, les premiers nodules sont visibles douze à quinze jours après l'inoculation. Ceux-ci apparaissent sur les portions jeunes de la racine principale. En effet, après l'inoculation, la racine s'allonge de cinq à dix centimètres environ et la présence de nodules est postérieure à cet allongement.

L'observation à la loupe binoculaire de cette zone en croissance montre qu'elle est pourvue de très nombreux poils absorbants, ce qui explique qu'elle soit le lieu d'apparition des premiers nodules.

Les racines secondaires ne forment des nodules que plus tardivement (environ 20 jours après l'inoculation).

L'infection des plantes issues de graines a été générale. Par contre, 15 des 120 plantes régénérées inoculées n'ont pas présenté de nodules. Chez ces plantes, nous avons observé, quelques jours après l'inoculation, une perte de chlorophylle suivie du dépérissement des plantes.

La valeur statistique des résultats est recherchée par le test du F pour la comparaison des variances et par le test t de STUDENT pour celle des moyennes. Nous avons recherché s'il existait une différence significative, pour les critères choisis, dans les lots de plantes mis en culture :

- Nombre moyen de racines néoformées : le F calculé est égal à 1,16. Dans la table de F, on lit $F_{0,05} = 2,53$ pour un degré de liberté égal à 14. La probabilité P attachée à la valeur du F calculée est telle que $P (F < 2,53) < 0,05$. Il n'y a pas de différence significative, dans le nombre moyen de racines néoformées, entre les plantes issues de graines et les plantes régénérées *in vitro*.
- Nombre moyen de nodules : le F calculé est égal à 2,28. Comparé au F théorique qui est égal à 2,53, nous constatons que le F calculé lui est inférieur. La différence entre les plantes des deux groupes n'est pas significative.

- Poids moyen de matière sèche (M.S.) : le F calculé qui est égal à 3,1 est supérieur au F théorique (2,53). La différence, entre les plantes issues de graines et les plantes régénérées, est significative.
- Production d'éthylène : le F calculé est égal à 1,82. Il est inférieur au F théorique (2,53). Il n'existe pas de différence significative entre les plantes des deux types.

L'existence d'une différence significative, dans le poids moyen de M.S., entre les deux lots de plantes, nous a conduit à faire une comparaison de moyennes. Le t théorique au seuil de 5 % est égal à 2,04. En reprenant les critères de croissance ci-dessus, les différents t calculés sont : 0,059 (pour le nombre moyen de racines néoformées) ; 0,039 (pour le nombre moyen de nodules) ; 0,60 (pour le poids moyen de M.S.) et 0,12 (pour la production d'éthylène).

Dans les quatre cas, le t théorique au seuil de 5 % est supérieur. Aussi les moyennes ne sont-elles pas significativement différentes entre les plantes issues de graines et les plantes régénérées *in vitro*.

Au vu des résultats qui ont été analysés, nous pouvons retenir les faits suivants : d'une part les plantes régénérées *in vitro* sont capables de produire des nodules après infection par *Rhizobium meliloti*. Comparés aux résultats obtenus sur des plantes issues de graines, les résultats fournis par les plantes régénérées ne font pas ressortir de différence significative.

D'autre part l'analyse de la variance montre, qu'au sein des plantes régénérées, il existe des différences de croissance d'une plante à l'autre, mais que celles-ci se compensent dans l'ensemble de la population des plantes régénérées, car la comparaison des moyennes de poids de matière sèche ne fait pas apparaître de différence significative entre les plantes issues de graines et les plantes régénérées *in vitro*.

TABLEAU XXI

NODULATION DES PLANTES DE LUZERNE ISSUES DE GRAINES (G) ET
REGENEREES *IN VITRO* (R) APRES INFECTION PAR *RHIZOBIUM MELILOTI*

Série	Plantes	1		2		3		4	
		G	R	G	R	G	R	G	R
1		10,6	24,8	8,75	8,5	25,32	26,2	1,27	3,94
2		12,4	21,75	7,5	9,62	23,84	27,5	1,03	2,98
3		10,5	25	7,62	7	23,7	22,4	1,16	1,1
4		15,8	22,1	9	6,75	26,5	19,2	3,15	0,96
5		12,05	29,2	7,62	10,2	25,5	28	2,08	3,75
6		10,14	23,6	9,75	7,74	28,7	22,5	2,92	1,25
7		13,6	20,21	6,75	7,9	22	22,7	1,15	1,05
8		12,2	20	10	8,7	22,12	22,02	2,74	0,94
9		11,3	18,4	8,7	5,5	21,75	19,05	1,98	1,32
10		11	18,1	7,5	6,85	23,25	18,4	1,11	1,18
11		10,4	27,2	7,35	8,75	21,4	22,8	0,95	2,1
12		14	24,8	9,42	8	26,1	24,55	2,94	1,8
13		12	28,4	8,72	6,1	24,6	18,64	2,14	0,92
14		10	19	8,5	6,25	25,1	19,1	2,08	0,88
15		10,2	22,8	7,25	5,62	20,5	18,45	1,01	0,96

1 : nombre moyen de racines néoformées

2 : nombre moyen de nodules

3 : poids moyen (mg) de matière sèche (M.S.)

4 : ΔQ (quantité d'éthylène produite après 7 heures) en $\times 10^{-3}$
 $\mu\text{mole/mg M.S.}$

Moyennes calculées sur 8 plantes/lot/série après 45 jours.

B - CROISSANCE ULTERIEURE DES PLANTES

Nous avons analysé les résultats fournis par l'étude comparative des plantes de luzerne.



Bien que l'inoculation *in vitro* des plantes ne soit pas indispensable, il nous a néanmoins paru utile de suivre le devenir des plantes ayant déjà été cultivées *in vitro*.

Après inoculation et culture *in vitro*, les plantes sont transférées en pot où elles séjournent quatre semaines environ avant leur transfert en terre.

Deux semaines après le transfert, les plantes acquièrent une grande vigueur. Très rapidement, de nouvelles pousses apparaissent (entre 10 et 15 en moyenne) autour des tiges-mères.

La taille des tiges atteint et dépasse facilement 60 centimètres. Les fleurs, nombreuses, apparaissent dès la troisième semaine après le transfert en terre. Elles sont violettes et donnent des fruits normaux tant chez les plantes issues de graines que celles régénérées *in vitro*.

L'examen des plantes montre des systèmes racinaires très développés, composés chaque fois d'une racine pivotante autour de laquelle s'articulent de très nombreuses racines latérales portant de nombreux nodules (> 100).



Ces observations témoignent d'une stabilité des caractères chez la variété Europe et démontrent que le passage par la culture *in vitro* n'a pas apporté de variabilité se traduisant par des modifications phénotypiquement observables.

Très souvent, le transfert en terre des plantes issues de la culture *in vitro* se heurte aux difficultés que crée le passage à l'atmosphère ambiante. Dans notre cas, nous avons noté un taux de reprise de cent pour cent.

DISCUSSION

La première partie de notre étude a consisté à la mise au point d'un schéma expérimental de régénération de la luzerne à partir de tissus cultivés *in vitro*.

Nous avons tout d'abord isolé des colonies tissulaires de luzerne à partir de fragments d'organes cultivés *in vitro*.

Nos résultats ont montré que les feuilles, les tiges et les racines de luzerne (var Europe) sont capables de proliférer sur milieux synthétiques pourvus de facteurs de croissance.

Les racines prolifèrent facilement en présence de substances auxiniques (ANA, mais surtout 2,4-D). En effet, après vingt jours de culture, la quasi-totalité des explantats ont formé des colonies tissulaires friables et à croissance rapide. Dès 1968, GRAHAM avait d'ailleurs déjà mentionné la grande aptitude à proliférer des racines de luzerne et de trèfle.

Les tiges prolifèrent moins activement ; nous avons obtenu des cals sur la moitié des explantats. Mis en culture, ceux-ci sont friables et croissent rapidement.

Dans nos conditions expérimentales, les feuilles ne prolifèrent que de façon très limitée, même en présence de fortes teneurs en substances auxiniques, généralement, les explantats perdent rapidement leur chlorophylle et se nécrosent. Les substances auxiniques, à elles seules, sont insuffisantes pour assurer une bonne prolifération. En leur associant une cytokinine, le taux d'explantats formant un cal varie entre 40 et 80 %.

Une action semblable a été observée avec les cotylédons de *Castanea sativa* par VIEITEZ et al. (1978). De même qu'en absence de cytokinines, les fortes teneurs en substances auxiniques empêchent l'initiation de cals sur les feuilles de *Crotalaria burhia* (RAJ BHANSALI et al., 1978).

La néoformation de colonies tissulaires ne nécessite pas toujours, chez la luzerne, l'apport de cytokinines exogènes qui est cependant nécessaire chez *Vicia faba* (MITCHELL et GILDOW, 1975 ; GUEUZIC et al., 1977). Toutefois, les cytokinines exogènes ont provoqué le verdissement des colonies.

Il est classique que les boutures de noeuds donnent naissance à de nouvelles plantes (NOZERAN et al. 1977 ; LETOUZE, 1978 ; etc...) lorsqu'elles sont cultivées *in vitro*.

Les boutures de noeuds de luzerne ont, dans leur majorité, formé des colonies tissulaires douées de morphogénèse, ce qui nous a permis d'isoler une souche "bourgeonnante".

Le comportement des noeuds suggère le rôle probable du bourgeon axillaire. Comment expliquer, en effet, que les tissus de tiges (entre-noeuds) et de racines ne soient pas doués de capacité caulogène, même cultivés dans des conditions identiques ? Le bourgeon axillaire pourrait être le siège de synthèse accrue de cytokinines qui induiraient à leur tour la néoformation de bourgeons. Ce qui expliquerait, peut-être aussi, que les substances auxiniques soient suffisantes à provoquer la formation de ces colonies tissulaires "bourgeonnantes".

La synthèse de cytokinines ferait donc défaut dans les tissus de tiges et de racines ; dans ce cas, les cytokinines exogènes devraient favoriser la néoformation de bourgeons par les tissus de tiges et de racines. Nous avons noté qu'il n'en est rien, les fortes teneurs en cytokinines n'entraînant qu'un verdissement des colonies tissulaires.

Les noeuds ont formé des colonies tissulaires douées de capacité caulogène sur un milieu de base renfermant de l'AIB, du 2,4-D et de la GA₃. Nous avons donc pensé que ce milieu pourrait avoir une influence sur l'aptitude à bourgeonner des tissus. Les résultats observés à la suite de la culture de feuilles, de tiges et de racines sur ce milieu ne permettent pas de retenir cette hypothèse.

Il faudrait, par conséquent, préciser le rôle éventuel du bourgeon axillaire dans les phénomènes d'organogénèse manifestés par les tissus de noeuds.

Nous pouvions penser, par ailleurs, que les cytokinines exogènes stimuleraient la néoformation de bourgeons par les tissus de noeuds. Nos résultats n'ont pas été concluants, ce qui nous amène à nous interroger sur le comportement des tissus de luzerne vis-à-vis des cytokinines exogènes.

Il a été, en effet, démontré que certains tissus sont capables de synthétiser des cytokinines, d'autres ne le pouvant pas (voir pour revue SZWEYKOWSKA,

1974). Les tissus de luzerne seraient autotrophes aux cytokinines.

D'autres résultats obtenus avec les noeuds nous ont permis de constater que l'aptitude des noeuds à former des colonies tissulaires organogènes n'est pas liée à leur position sur la tige. Autrement dit, nous ne pouvons pas retenir l'hypothèse d'un gradient apico-basal dans la tige de luzerne comme cela a été mis en évidence chez diverses espèces.

ITO (1962) a démontré l'existence d'un gradient apico-basal marqué dans le comportement des cellules isolées de prothalle cordiforme de *Pteris vittata*. En effet, plus les cellules sont à la base de ce prothalle, plus elles régénèrent vite.

Chez l'*Hevea brasiliensis* Müll. Arg., les bourgeons présentent des potentialités qualitatives diverses en fonction de la place qu'ils occupent dans les boutures (DU PLESSIX, 1968).

Au niveau tissulaire également, de tels comportements ont été signalés. STOUTMEYER et BRITT (1965) ont obtenu chez le lierre deux types de cultures de tissus selon que les explantats provenaient de rameaux grimpants ou dressés.

BOUZID (1977) a démontré que la structure des cultures de tissus de *Citrus* dépend du lieu de prélèvement des explantats.

De même, les bourgeons de tabac manifestent une propension à fleurir de plus en plus tardive selon qu'ils apparaissent sur des colonies tissulaires provenant de fragments de tiges florifères ou non-florifères ; ces dernières donnent, en effet, des tissus avec des bourgeons qui fleurissent peu et tardivement (AGHION-PRAT, 1965).

Il serait intéressant de préciser le comportement des noeuds récoltés sur des tiges florifères de luzerne. De même que nous nous proposons d'étendre nos investigations à d'autres organes tels que les ovaires et les anthères, avec le souci de rechercher l'expression des potentialités caulogènes.

Après l'isolement de colonies tissulaires, nous nous sommes intéressé à la néoformation d'organes par les tissus provenant de racines et de noeuds.

Nous avons montré que les tissus de racines sont doués de morphogenèse. Toutefois, celle-ci reste liée à la présence de facteurs de croissance exo-

gènes. En effet, nous n'avons observé aucune néoformation d'organes (racines ou bourgeons) en absence de facteurs de croissance.

Ces résultats diffèrent de ceux mentionnés par TORREY (1958) et PETERSON (1970) qui ont obtenu des bourgeons et des racines respectivement sur des racines isolées de *Convolvulus* et d'*Ophioglossum petiolatum* en absence de tout apport hormonal.

Dans notre cas, les tissus de racines n'ont manifesté qu'une activité rhizogène, même si, chez deux colonies, nous avons observé la présence de bourgeons, fait que nous ne pouvons considérer comme significatif d'autant plus que la capacité néoformatrice de bourgeons ne s'est pas maintenue lors des cultures ultérieures.

A l'exception du 2,4-D qui est défavorable à l'organogenèse, les substances auxiniques éprouvées ont agi en concentrations élevées.

Les cytokinines, quant à elles, n'ont provoqué aucune néoformation d'organes par les tissus de racines.

Ces substances ont cependant été utilisées avec succès sur des tissus de diverses espèces. NORTON et BOLL (1954) ont observé des bourgeons sur des tissus de racines de tomate. En cultivant les fragments de racines d'*Isatis tinctoria* en présence de K, DANCKWARDT-LILLIESTOM (1957) a rapporté la formation de bourgeons par les tissus produits par ces racines. L'influence favorable des cytokinines a été aussi mentionnée par BONNETT et TORREY (1963 et 1965) qui ont obtenu des bourgeons sur des tissus de racines de *Convolvulus arvensis*. Des bourgeons sont aussi observés sur des racines de *Linaria vulgaris* (CHARLTON, 1965). Les tissus de racines de *Striga senegalensis* forment des bourgeons en présence de cytokinines (OKONKWO, 1970). GOFORTH et TORREY (1977) signalent à leur tour des néoformations de bourgeons par les racines de *Comptonia peregrina*. En cultivant des racines de tabac, HANH (1978) a signalé des néoformations de bourgeons sur les racines néoformées. Des travaux sur l'endive ont montré que les tissus de racines sont capables de former des bourgeons *in vitro* (PAULET et NITSCH, 1964).

Nous avons évoqué antérieurement le caractère réfractaire de certains tissus de légumineuses à l'organogenèse. GAMBORG et al. (1975) ont remarqué que les colonies tissulaires dérivées de protoplastes de pois sont incapables de néoformer des bourgeons.

Par la culture de noeuds, nous avons isolé une souche "bourgeonnante" dont le pouvoir caulogène reste satisfaisant au cours des repiquages successifs.

Pour stimuler la croissance des bourgeons, nous avons essayé diverses combinaisons hormonales. Les résultats ont permis de noter que le 2,4-D et la GA_3 favorisent la néoformation de bourgeons, alors que seul, l'un et l'autre ne le permettent pas. Ces résultats semblent en accord avec l'hypothèse de DAVIES et OZBAY (1975) selon laquelle la GA_3 agirait sur le maintien des teneurs en composés auxiniques dans les zones en croissance.

A ce stade de culture, les bourgeons néoformés sont le plus souvent à l'état de préfeuilles unifoliées plus ou moins chlorophylliennes. Maintenus sur le milieu de base renfermant du 2,4-D et de la GA_3 , les bourgeons restent dans cet état.

Il nous fallait par conséquent trouver une combinaison hormonale susceptible de stimuler la formation et le développement des bourgeons.

En augmentant la teneur en GA_3 du milieu de culture, nous avons observé un meilleur développement des bourgeons, mais leur durée de vie reste faible. Assez rapidement, ils brunissent et dépérissent.

Le milieu de base qui comporte alors du 2,4-D et de la GA_3 , s'il permet le maintien des potentialités caulogènes, semble moins convenir au développement des bourgeons néoformés.

Nous avons remplacé le 2,4-D par l'ANA en conservant la concentration en GA_3 inchangée. Avec cette nouvelle formule du milieu de culture, nous sommes parvenu à une meilleure survie des bourgeons néoformés, sans que la capacité néoformatrice des tissus en soit diminuée.

Cet effet favorable de l'ANA devient plus sensible lorsque la teneur en saccharose du milieu de culture est ramenée de 2 à 1 %. En effet, les bourgeons atteignent le stade de jeunes plantules qu'il suffit alors d'enraciner.

Ainsi disposons-nous d'une souche "bourgeonnante" avec une capacité caulogène satisfaisante, capable de se développer sur un milieu relativement simple renfermant de l'ANA et de la GA_3 . Cette souche présente la particularité de ne pas dépendre de cytokinines exogènes. A cet égard, la luzerne cons-

titue un cas singulier au sein des légumineuses et de bien d'autres espèces.

Généralement, la néoformation de bourgeons par les tissus nécessite la présence de cytokinines exogènes.

On connaît quelques travaux rapportant des néoformations de bourgeons en présence de substances auxiniques utilisées seules (BIGOT, 1975) ou associées à la gibberelline (MARGARA, 1977).

Par contre, de très nombreux travaux mentionnent le rôle indispensable des cytokinines exogènes dans la néoformation de bourgeons. Les exigences en cytokinines varient avec les espèces et l'origine des tissus.

Les tissus de feuilles présentent souvent des exigences marquées en cytokinines (KUKULCZANKA et SUSSZYNSKA, 1972 ; BRANDAO et SALEMA, 1977 ; NEGRUTIU et al., 1977 ; THAKUR et GANAPATHY, 1977 ; MEYER et MILBRATH, 1977 ; CHI WON LEE et al., 1977 ; JOHNSON, 1978a et 1978b ; HENNY, 1978 ; KOEVARY et al., 1978 ; BILKEY et al., 1978 ; RAMAWAT et al., 1978 ; etc...).

Chez des tissus de tiges se manifestent également des exigences en cytokinines exogènes. La néoformation de bourgeons reste liée à leur présence (PILLAI et HILDEBRANDT, 1969 ; WINTON, 1970 ; RAO et al., 1973 ; PADMANABHAN et al., 1973 ; MASCARENHAS et al., 1976 ; PRIMO MILLO et HARADA, 1976 ; MATHEWS et NARAYANASWAMY, 1976 ; WELANDER, 1977 ; SHI-TAO YIE et LIAW, 1977 ; BROOME et ZIMMERMAN, 1978 ; RAMAWAT et al., 1978 ; RAJ BHANSALI et al., 1978 ; etc...).

Cette brève énumération témoigne néanmoins du rôle prépondérant des cytokinines dans le processus de caulogénèse.

Il nous restait maintenant à vérifier que les plantules de luzerne régénérées *in vitro* sont capables de former des racines, point constituant la dernière étape vers la reconstitution de plantes entières.

La néoformation de racines par les plantules s'obtient sur milieu renfermant une substance auxinique. Nous avons, en particulier, constaté que le milieu gélosé est défavorable à l'enracinement des plantules, quelle que soit l'hormone utilisée. Aux concentrations éprouvées, c'est l'ANA qui s'est montré le plus favorable. Ces résultats sont susceptibles d'être améliorés

en réalisant une étude plus approfondie de l'influence des substances auxiniques.

Les tissus de luzerne montrent ainsi leur aptitude à réaliser des programmes morphogénétiques distincts. Nous avons défini les conditions de néoformation de bourgeons, puis celles de racines par les jeunes plantules régénérées *in vitro*, en jouant uniquement sur la présence ou l'absence de la GA₃.

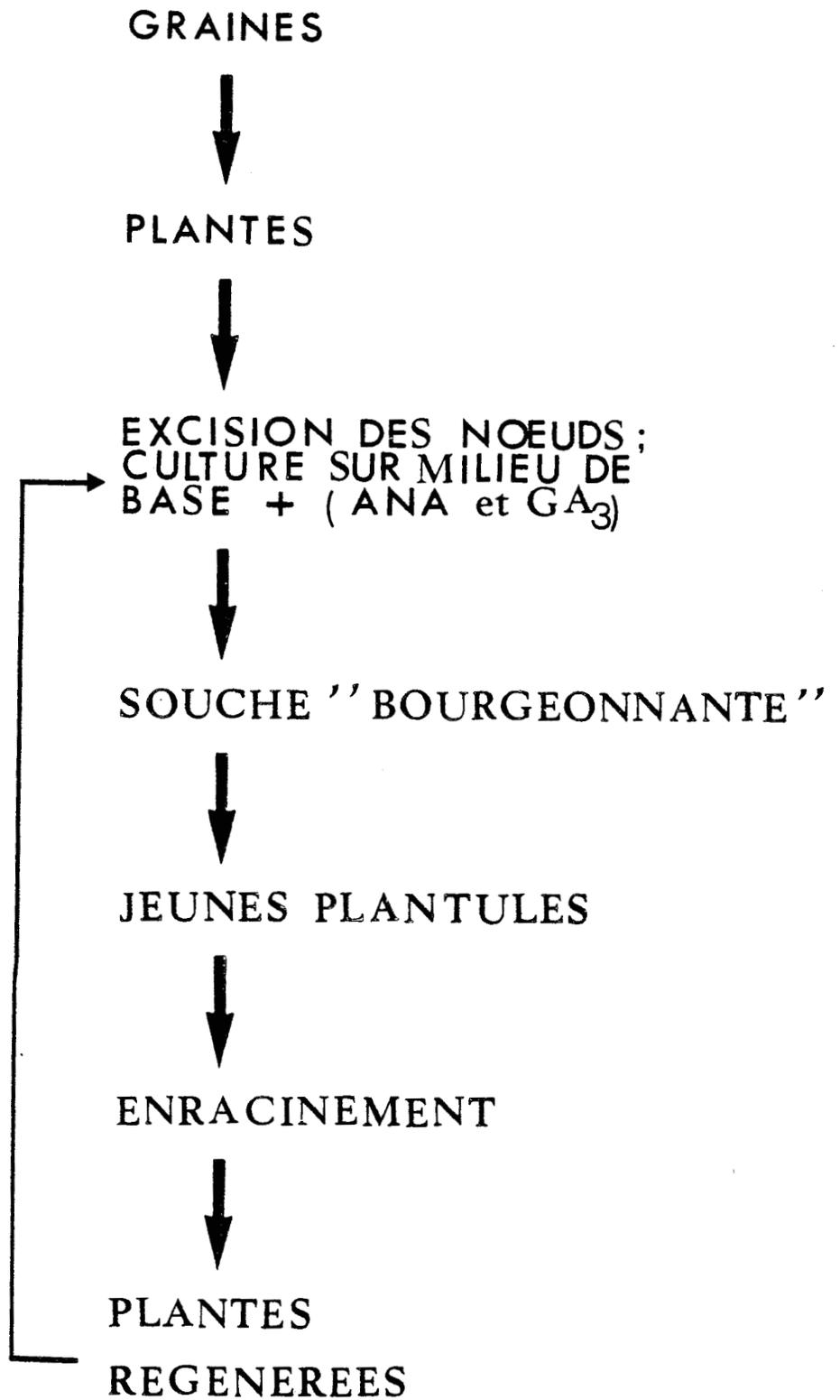
Nous avons remarqué que l'ANA agit aux concentrations utilisées pour la néoformation de bourgeons par les tissus provenant de noeuds. L'enracinement des jeunes plantules se fait donc avec des doses d'ANA relativement peu élevées ($5 \cdot 10^{-7}$ et 10^{-6} M). A ces doses, les fragments de tiges de *Vicia faba* ne forment des racines que de façon très limitée (AUBRY et al., 1975). Nous avons, en outre, observé un effet "toxique" des substances auxiniques aux doses supérieures à 10^{-6} M, bien que celles-ci soient couramment requises pour d'autres espèces (LAKSHMANAN et JANARDHANAN, 1977 ; JAMES et THURBON, 1979).

Un des objectifs de notre étude était la recherche d'un système expérimental de régénération de la luzerne qui nous permette à long terme d'étendre l'étude de la nodulation sur des plantes régénérées *in vitro*. L'étude de la morphogénèse des tissus de luzerne a permis la mise en évidence de capacités caulogènes des tissus de noeuds, ce qui nous permet de proposer le schéma expérimental, ci-après.

Après l'étude de la morphogénèse des tissus de luzerne, nous avons abordé quelques aspects de la nodulation des plantes après infection par *Rhizobium meliloti*.

Des travaux sur *Trifolium subterraneum* et *Glycine wightii* (PHILPOTTS, 1977) ont souligné l'importance de la technique d'inoculation et des conditions de culture sur la nodulation de ces plantes.

Nous avons éprouvé trois types de support sur lesquels les plantes sont capables de noduler. Les poils absorbants constituent souvent un facteur susceptible de limiter la nodulation *in vitro*. Des moyens de stimuler leur formation ont été recherchés (HERMINA et REPORTER, 1976).



SCHEMA EXPERIMENTAL DE REGENERATION DE LA
LUZERNE A PARTIR DE COLONIES TISSULAIRES DE NOEUDS

Dans notre cas, la technique du support papier filtre plongeant dans du milieu de culture s'est avérée intéressante pour deux raisons essentielles : elle favorise la formation des poils absorbants sur les racines ; ensuite elle permet une observation directe de l'évolution de la nodulation, avantage que ne présente pas le support vermiculite.

Le support gélosé permet également l'observation directe de la nodulation, mais il présente le désavantage d'inhiber la formation des poils absorbants. Nous avons, en particulier, observé que seules les portions de racines se développant hors de la gélose sont pourvues de poils absorbants et forment des nodules.

Nous avons tenté, grâce à l'emploi de deux agents oxydants (KMnO_4 et acide citrique), de corriger l'effet "asphyxiant" du support gélosé.

Certes, la présence des agents oxydants provoque une légère stimulation de la nodulation due au fait que dans ces conditions quelques nodules apparaissent dans le milieu gélosé. Mais ces résultats restent cependant inférieurs à ceux obtenus avec le support papier filtre. Nous avons donc été amené à ne pas retenir cette technique ultérieurement.

Nous n'avons pas noté, par ailleurs, d'influence nette des substances oxydantes lorsque les cultures sont réalisées sur support papier filtre. Aussi ne les avons-nous pas retenues.

Nous avons recherché l'influence, sur la nodulation, de l'ablation de l'extrémité racinaire. La nodulation n'est pas affectée par l'absence de l'extrémité racinaire. Cette observation n'est pas surprenante. En effet, la structure d'une racine est faite de plusieurs zones ; zone de croissance (apex) ; zone d'élongation et zone pilifère. La nodulation faisant intervenir cette dernière zone, on comprend que l'ablation de l'extrémité racinaire n'influence pas la nodulation. Ces résultats sont, cependant, intéressants à un autre point de vue, car ils montrent que l'ablation de l'extrémité racinaire (c'est-à-dire l'arrêt de la croissance) provoque l'apparition de racines secondaires qui prennent le relais des premières et forment des nodules.

Dans nos conditions expérimentales, les racines isolées se développent très faiblement et forment très peu de nodules. Des auteurs ont imaginé des techniques pour cultiver les racines isolées et leur faire produire davantage

de nodules. BUNTING et HORROCKS (1964) ont amélioré la croissance et la formation des nodules par les racines isolées de haricot. Plus récemment, RACCA (1980) a expérimenté la technique de la double alimentation pour les racines de soja.

Ces deux espèces offrent l'avantage d'avoir des racines vigoureuses qui se prêtent bien à de telles manipulations. La fragilité des racines de luzerne risque d'être un obstacle à l'utilisation de la technique de la double alimentation. Néanmoins, nous nous proposons de nous en inspirer ultérieurement.

L'étude comparée de la nodulation des plantes de luzerne issues de graines et régénérées *in vitro* a constitué le dernier point de notre étude.

Nos résultats ont montré que les plantes régénérées sont capables de réaliser la symbiose avec *Rhizobium meliloti*. En fonction des critères de croissance choisis, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les plantes régénérées et les plantes issues de graines.

Nos résultats nous autorisent, par conséquent, à considérer que les plantes régénérées *in vitro* héritent de tous les caractères spécifiques des plantes-mères, notamment celui, essentiel, d'établir des symbioses fonctionnelles avec l'agent infectieux qui leur est spécifique.

Les différences de croissance que nous avons constatées au sein des plantes régénérées peuvent s'expliquer, par exemple, par le fait qu'il est difficile d'avoir les mêmes stades de développement chez toutes les plantes. Nous avons, néanmoins, tenté de réduire ces différences en prenant le critère de l'allongement racinaire, en supposant que ce dernier traduit, avec un minimum d'erreur, l'état de croissance à un moment donné.

Ce sont probablement à ces différences qu'il faut attribuer les 12,5 % d'échecs constatés. Toutefois, ces échecs peuvent provenir d'une insuffisance photosynthétique. En effet, toute inoculation infructueuse a été généralement précédée d'un dépérissement des plantes par perte de chlorophylle.

La capacité photosynthétique dépend pour une large part de l'importance de la surface foliaire.

Des travaux récents ont démontré que c'est davantage la photosynthèse qui limite la croissance des légumineuses qu'une diminution de l'azote atmosphérique (STREETER, 1974 ; HARDY et HAVELKA, 1975 ; PHILLIPS et al., 1976 ; BETHLENFALVAY et PHILLIPS, 1977).

Inversement, on peut penser que la symbiose n'ayant pu se réaliser, les plantes se sont trouvées en situation de carence azotée, d'où leur dépérissement.

Il est très utile de rappeler que les plantes sont régénérées sur milieux complets et qu'après inoculation, elles sont placées sur milieux sans azote, ni sucre.

On peut imaginer que certaines plantes n'aient pas les ressources suffisantes pour survivre jusqu'à ce que la symbiose devienne efficace. Ce qui expliquerait peut-être aussi que les lots de plantes issues de graines soient relativement plus homogènes, compte-tenu des apports cotylédonaire.

Nos recherches futures porteront sur la vérification de toutes ces hypothèses par la mise au point de dispositifs permettant un contrôle plus précis des paramètres de la photosynthèse (indice foliaire, taux de CO₂, lumière, etc...).

Afin de nous assurer de la fiabilité de notre schéma expérimental de régénération, nous avons transféré en terre quelques plantes régénérées *in vitro*, en même temps que des plantes issues de graines. L'observation directe des plantes en croissance n'a pas révélé de différence entre ces plantes.

Nous pouvons, en conclusion, dire que le système expérimental de régénération qui a été décrit n'a pas introduit de variabilité telle que la capacité symbiotique des plantes en soit modifiée.

La variabilité chez les végétaux, notamment dans les cultures de tissus, est souvent mentionnée. Elle peut se traduire phénotypiquement par la formation d'organes ou de plantes aberrantes (THAKUR et al., 1976 ; SKIRVIN, 1977, voir pour revue), ou encore par des modifications légères portant sur la taille, le nombre des organes ou autres caractères (NOZERAN, 1978 ; CORNU, 1978 ; DESHAYES, 1978 ; WAKASA, 1979 ; etc...).

L'effet du clonage sur la réduction de la variabilité symbiotique chez la luzerne a été rapporté par LINDSAY et JORDAN (1976). Nos résultats tendent à confirmer cette stabilité des caractères chez la luzerne.

RESUME

Au cours de cette étude, nous avons été amené premièrement, à caractériser quelques aspects de croissance et de morphogenèse des tissus de luzerne (var Europe) cultivés *in vitro*. Ensuite nous avons porté notre attention sur la nodulation des plantes de luzerne après infection par *Rhizobium meliloti*.

La croissance et la morphogenèse ont été envisagées sous l'angle de la mise au point d'un *schéma expérimental* de régénération de la luzerne, qui soit fiable et qui permette, en permanence, de disposer de plantes de régénération en vue d'études de nodulation.

Cet objectif a été atteint. Les résultats obtenus nous permettent de tirer les conclusions suivantes : les tissus de luzerne sont capables de proliférer sur milieux synthétiques. Cette prolifération ne s'observe néanmoins qu'en présence de facteurs de croissance exogènes.

La croissance des tissus de luzerne ne semble pas dépendre strictement de la présence de cytokinines exogènes. Toutefois, ces substances favorisent le verdissement des tissus.

Dans nos conditions expérimentales, les tissus de feuilles, de tiges et de racines n'ont pas les mêmes potentialités que les tissus de noeuds. Ces derniers, en effet, cultivés sur milieu de base renfermant de l'ANA et de la GA₃ avec 1 % de saccharose, ont permis l'obtention d'une souche "bourgeonnante" et le développement des bourgeons néoformés en jeunes plantules.

Ces jeunes plantules sont capables de s'enraciner et de reconstituer des plantes entières. Pour cela, il suffit de les placer sur milieu renfermant de l'ANA.

Les plantes régénérées *in vitro* ne présentent pas de variabilité phénotypiquement observable, ce qui témoigne d'une stabilité des caractères chez la variété Europe.

Nous sommes arrivé ainsi à notre deuxième préoccupation qui était l'étude de quelques aspects de la nodulation des plantes de luzerne inoculées avec *Rhizobium meliloti*.

L'étude préliminaire sur des plantes issues de graines nous a permis de vérifier l'influence sur la nodulation des facteurs tels que le support cultural, les agents oxydants (KMnO₄ et acide citrique), l'ablation de l'extrémité racinaire et de la partie feuillée.

Nous avons montré le double avantage du support papier filtre dans la nodulation. En effet, cette technique permet une nodulation satisfaisante et l'observation directe de son évolution.

Les agents oxydants que nous avons utilisés n'ont pas amélioré la nodulation de manière sensible pour que nous leur attribuons un rôle prépondérant. Toutefois, sur milieu gélosé, nous avons noté, en leur présence, la formation de nodules sur les portions de racines se développant dans la gélose.

L'ablation de l'extrémité racinaire n'empêche pas la nodulation. Par contre, les résultats obtenus avec les racines isolées ont montré une baisse très sensible de la nodulation, ce qui souligne le rôle important de la partie feuillée dans la nodulation.

Nous avons réalisé ensuite une étude comparée de la nodulation des plantes issues de graines et régénérées *in vitro*. Celle-ci a montré que les plantes régénérées sont capables de réaliser la symbiose avec *Rhizobium meliloti*. Les plantes régénérées *in vitro* ont la même croissance que les plantes issues de graines. C'est un argument supplémentaire en faveur de la stabilité des caractères chez la variété Europe.

Le comportement des plantes, après transfert en terre, a permis de mieux nous en rendre compte. Avec les plantes régénérées *in vitro*, nous avons entamé l'étude comparée de la nodulation chez la luzerne.

Ces premiers résultats nous incitent à approfondir ultérieurement certains aspects de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses. Nous avons déjà évoqué le rôle de la photosynthèse. Il y a également l'influence de l'azote combiné, sans oublier les facteurs liés aux *Rhizobium*, etc...

Le schéma expérimental, outre son rôle dans la production de plantes en vue de l'étude de la nodulation, peut offrir divers autres avantages.

Il est possible, en effet, d'intervenir sur chaque étape du cycle de régénération selon qu'on s'intéresse plus spécifiquement à l'un ou l'autre des aspects de morphogénèse (formation de bourgeons ou de racines).

Le caractère distinct de chacune de ces étapes peut permettre l'étude des événements biochimiques qui président aux manifestations d'organogénèse. Des travaux de ce type sont connus par exemple pour l'endive (VASSEUR, 1978).

Il serait, nous semble-t'il, intéressant de rechercher d'éventuelles différences au niveau biochimique entre les tissus non-caulogènes (tissus de racines, de tiges et de feuilles) et les tissus de noeuds qui le sont.

La réalisation d'une suspension cellulaire à partir de la souche "bourgeonnante" peut ouvrir une perspective vers l'étude de la symbiose entre cellules de luzerne et *Rhizobium meliloti*.

L'absence de variabilité phénotypiquement observable peut être bénéfique pour la réalisation de clonage à partir de plantes régénérées *in vitro*. On éliminerait ainsi la dépendance vis-à-vis des graines qui sont également sources de variabilité.

La luzerne est sujette à diverses maladies (MASSENOT, 1979) ; les plantes régénérées *in vitro* peuvent constituer un matériel de choix pour l'étude de la résistance à ces maladies.

PLANCHE I

CULTURE *IN VITRO* DE LA LUZERNE (*MEDICAGO SATIVA* L.)

Photo 1 : Plantule de luzerne après mise en culture en conditions aseptiques sur milieu de STREET modifié.

Photo 2 : Racine isolée de luzerne cultivée sur milieu de STREET modifié.

Photo 3 : Colonies tissulaires provenant de racines cultivées sur milieu de BLAYDES modifié en présence de 2,4-D (tube de droite) et de 2,4-D + BAP (tube de gauche).

Photo 4 : Colonie tissulaire rhizogène provenant de racines cultivées sur milieu de BLAYDES modifié en présence d'ANA.

Photo 5 : Colonies tissulaires provenant de racines après un an de culture sur milieu de BLAYDES modifié renfermant du 2,4-D.

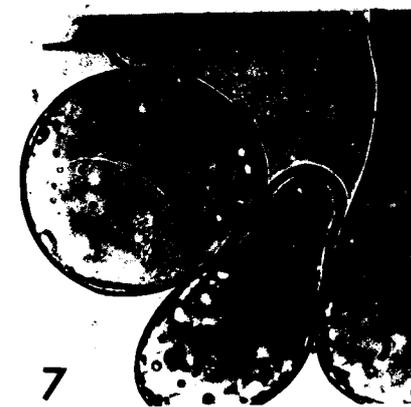
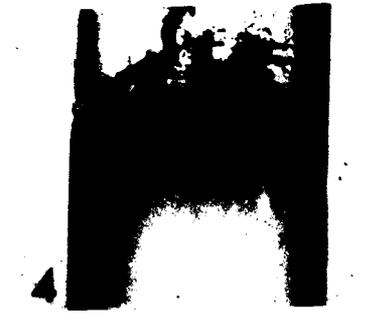
Photo 6 : Colonie tissulaire provenant de racines ayant formé des bourgeons et des racines sur milieu de BLAYDES modifié renfermant de l'AIA et de la BAP.

Photo 7 : Aspect de la suspension cellulaire (coloration : rouge neutre) provenant de colonies tissulaires de racines et cultivée sur milieu de BLAYDES modifié renfermant du 2,4-D et de la BAP.

Photo 8 : Pseudo-embryoïde produit par la suspension cellulaire provenant de colonies tissulaires de racines.

L'échelle portée sur la photo correspond à 5 mm.





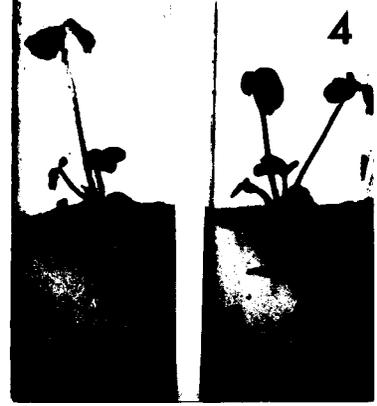
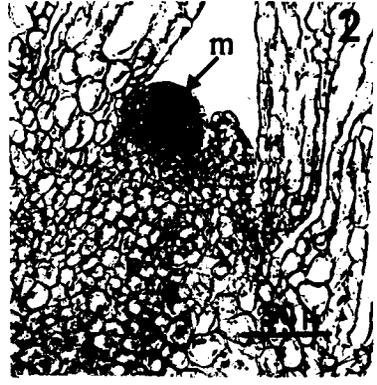
AMS
1961

PLANCHE II

SEQUENCES DE REGENERATION DE LA LUZERNE A PARTIR DE COLONIES
TISSULAIRES PROVENANT DE NOEUDS CULTIVEES *IN VITRO*

- Photo 1 : Colonies tissulaires caulogènes provenant de noeuds cultivés pendant 30 jours sur milieu de BLAYDES modifié renfermant de l'AIB, du 2,4-D et de la GA₃.
- Photo 2 : Coupe transversale dans une colonie tissulaire provenant de noeuds.
p : zone parenchymateuse, m : zone méristématique.
- Photo 3 : Colonies tissulaires caulogènes cultivées sur milieu de BLAYDES modifié renfermant de l'ANA, de la GA₃ et 2 % de saccharose (tube de droite) ou 1 % de saccharose (tube de gauche).
- Photo 4 : Jeunes plantules de luzerne ayant formé des racines sur milieu de BLAYDES modifié renfermant de l'ANA.
- Photo 5 : Plante de luzerne régénérée *in vitro* après infection par *Rhizobium meliloti* et cultivée sur support papier filtre plongeant dans du milieu de STREET modifié.
- Photo 6 : Aspect d'un nodule produit sur une plante régénérée. L'échelle portée sur la photo correspond à 3 mm.
- Photo 7 : Plantes de luzerne régénérées *in vitro* après transfert en pot.
- Photo 8 : Plantes de luzerne régénérées *in vitro* après transfert en terre (aspect des plantes 4 mois après la régénération).





THIS
SIDE

B I B L I O G R A P H I E

- AGHION-PRAT D., 1965. - Néof ormation de fleurs *in vitro* chez *Nicotiana tabacum* L. *Physiol. Vég.* 3 : 229-303.
- AHMED S. et H.J. EVANS, 1960. - Cobalt : a micronutrient element for the growth of soybean plants under symbiotic conditions. *Soil Sci.* 90 : 206-210.
- AHMED S. et H.J. EVANS, 1961. - The essentiality of cobalt for soybean plants grown under symbiotic conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 47 : 24-36.
- AUBRY A.M., P. DUTUIT, H. THIELLEMENT et A. BREVILLE, 1975. - Propagation végétative de la févêrole (*Vicia faba*) à partir de fragments de tiges. *Ann. Amélior. Plantes* 25 (2) : 225-229.
- BAUER W.D., 1977. - Lectins as determinants of specificity in legume *Rhizobium symbiosis*. In : HOLLANEDER A. - Genetic engineering for nitrogen fixation, Ed. Plenum Press, New-York, p. 283-297.
- BERINGER J.E., S.A. HOGGAN et A.W. JOHNSTON, 1978. - Linkage mapping in *Rhizobium leguminosarum* by means of R-plasmid mediated conjugaison. *J. Gen. Microbiol.* 104 : 201-208.
- BEVERSDORF W.D. et E.T. BINGHAM, 1977. - Degrees of differentiation obtained in tissue cultures of *Glycine* species. *Crop Sci.* 17 : 307-311.
- BETHLENFALVAY G.J. et D.A. PHILLIPS, 1977. - Ontogenetic interactions between photosynthesis and symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Plant. Physiol.* 60 : 419-421.
- BIGOT C., 1975. - Multiplication végétative de *Gloxinia hybrida* à partir d'organes cultivés *in vitro*. *Ann. Amélior. Plantes* 25 (3) : 337-351.
- BILKEY P.C., B.H. McCOWN et A.C. HILDEBRANDT, 1978. - Micropropagation of African violet from petiole cross-sections. *HortScience* 13 (1) : 37-38.
- BLAYDES D.F., 1966. - Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue. *Physiol. Plant.* 19 : 748-753.
- BLONDEAU R., 1977. - La symbiose *Rhizobium*-légumineuses et les problèmes d'infectivité, d'efficience et de spécificité d'hôte. *Ann. Biol.* XVI (11-12) : 482-515.
- BOHLOOL B.B. et E.L. SCHMIDT, 1974. - Lectins : a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume root nodule symbiose. *Science* 185 : 269-271.
- BONNETT H.T. et J.G. TORREY, 1963. - Comparative anatomy of the development of endogenous buds and roots from *Convolvulus arvensis* root cultured *in vitro*. *Amer. J. Bot.* 50 : 613.

- BONNETT H.T. et J.G. TORREY, 1965. - Chemical control of organ formation in root segments of *Convolvulus arvensis* cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* 40 : 1228-1236.
- BONNIER C., 1960. - Symbiose *Rhizobium*-légumineuses. Aspects particuliers aux régions tropicales. *Ann. Inst. Pasteur* 98 : 538-556.
- BOUZID S., 1977. - Polymorphisme persistant des cultures de tissus provenant de divers fragments de plusieurs espèces de *Citrus*. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 284, Série D, 2119-2121.
- BRANDAO I. et R. SALEMA, 1977. - Callus and plantlets development from cultured leaf explants of *Sedum telephium* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 85 : 1-8.
- BROOME O.C. et R.H. ZIMMERMAN, 1978. - *In vitro* propagation of blackberry. *HortScience* 13 (2) : 151-153.
- BUNTING A.H. et J. HORROCKS, 1964. - An improvement in the RAGGIO technique for obtaining nodules on excised roots of *Phaseolus vulgaris* L. in culture. *Annals of Botany, N.S.*, 28 (110) : 229-237.
- BURRIS R.H., 1965. - Nitrogen fixation. In : BONNER J. et J.E. VARNER. - *Plant Biochemistry*, p. 961-979, Ed. Academic Press, New-York.
- CHESNEAUX M.-Th., 1974. - La multiplication végétative chez la luzerne. *Ann. Amélior. Plantes* 24 : 83-91.
- CHARLTON W.A., 1965. - Bud initiation in excised roots of *Linaria vulgaris*. *Nature* 207 : 781-782.
- CHI WON LEE, R.M. SKIRVIN, A.I. SOLTERO et J. JANICK, 1977. - Tissue culture of *Salpiglossis sinuata* L. from leaf discs. *HortScience* 12 (6) : 547-549.
- CLEMENT W.M., 1962. - Stability of chromosome numbers in tissue cultures of Alfalfa *Medicago sativa* L. *Amer. J. Bot.* 15 : 670.
- CORNU A., 1978. - Variabilité résultant de l'instabilité de la structure de l'information héréditaire au cours de la multiplication végétative. *Physiol. Vég.* 16 (2) : 205-214.
- CLOOMAN M.J. et J.M. VINCENT, 1967. - The nodulation of annual summer legumes sown on the far north coast of New South Wales. *Aust. J. exper. animal* 7 : 181-189.
- CROCOMO O.J., J.E. PETERS et W.R. SHARP, 1976. - Interactions of growth and root morphogenesis in cultured *Phaseolus vulgaris* L. leaf explants. *Turrialba* 26 (3) : 232-236.

- CROCOMO O.J., W.R. SHARP et J.E. PETERS, 1976. - Plantlet morphogenesis and the control of callus growth and root induction of *Phaseolus vulgaris* with addition of a bean seed extract. *Z. Pflanzenphysiol.* 78 : 456-460.
- CURRIER W.W. et G.A. STROBEL, 1976. - Chemotaxis of *Rhizobium* sp. to plant exudates. *Plant Physiol.* 57 (5) : 820-823.
- DANCKWARDT-LILLIESTROM C., 1957. - Kinetin induced shoot formation from isolated root of *Isatis tinctoria*. *Physiol. Plant.* 10 : 794-797.
- DAVIES E. et O. OZBAY, 1975. - Comparative effects of indoleacetic acid and gibberellic acid on growth of decapitated etiolated epicotyls of *Pisum sativum* cv. Alaska. *Ibid.* 35 (4) : 269-336.
- DAZZO F.B., C.A. NAPOLI et D.H. HUBELL, 1976. - Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the *Rhizobium*-clover symbiosis. *Appl. environm. Microbiol.* 32 : 166-171.
- DAZZO F.B. et W.J. BRILL, 1977. - Receptor site on clover and alfalfa roots for *Rhizobium*. *Ibid.* 33 : 132-136.
- DAZZO F.B., W.E. YANKE et W.J. BRILL, 1978. - Trifoliin : a *Rhizobium* recognition protein from white clover. *Bioch. biophys. Acta* 539 : 276-286.
- DELLAGI-LAKHOUA L., 1975. - Analyse de diverses possibilités de multiplication végétative en culture *in vitro* chez *Hedysarum coronarium* L. (Légumineuse, Papilionacée) ; ontogenèse et histogenèse des néoformations. *Thèse de 3ème Cycle, spécialité Amélioration des Plantes*, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, 71 p.
- DENARIE J. et G. TRUCHET, 1979. - La symbiose *Rhizobium*-Légumineuses : rôles respectifs des partenaires. *Physiol. Vég.* 17 (4) : 643-667.
- DESHAYES A., 1978. - Induction à l'aptitude à la variation somatique par multiplication végétative *in vitro* et modification de son expression *in vivo* selon l'état physiologique des cellules. *Ibid.* 16 (2) : 215-229.
- DULLAART J., 1970. - The bioproduction of indole - 3 acetic acid and related compounds in root nodules and roots of *Lupinus luteus* L. and by its rhizobial symbiont. *Acta Bot. Neerl.* 19 : 573-618.
- DUVIGNEAUD P. et L. VAN BOCKSTAL, 1970. - Monocotylédones-Dicotylédones. *Presses Universitaires de Bruxelles II* : 1-180. Université Libre de Bruxelles.

- EL-SHERBEENY M.H., L.R. MYTTON et D.A. LAWES, 1977. - Symbiotic variability in *Vicia faba* L. Genetic variability in the *Rhizobium leguminosarum* population. *Euphytica* 26 : 149-156.
- FOTIADIS N.A., 1977. - Rooting of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cuttings under mist. *Z. Acker- und Pflanzenbau* 145 : 1-7.
- GAMBORG O.L., 1966. - Aromatic metabolism in plants. II - Enzymes of shikimate pathway in suspension cultures of plant cells. *Can. J. Biochem.* 44 : 791-799.
- GAMBORG O.L., F. CONSTABEL et J.P. SHYLUK, 1974. - Organogenesis in callus from shoot apices of *Pisum sativum*. *Physiol. Plant.* 30 : 125-128.
- GAMBORG O.L., J. SHYLUK et K.K. KARTHA, 1975. - Factors affecting the isolation and callus formation in protoplasts from the shoot apices of *Pisum sativum* L. *Plant Science Letters* 4 : 285-292.
- GOFORTH P.L. et J.G. TORREY, 1977. - The development of isolated roots of *Comptonia peregrina* (Myricaceae) in culture. *Amer. J. Bot.* 64 (4) : 476-482.
- GRAHAM P.H., 1968. - Growth of *Medicago sativa* L. and *Trifolium subterraneum* L. in callus and suspension culture. *Phyton* 25 (2) : 159-162.
- GUEUZIC M.-N., J.-P. PARVAIS et R. GALZY, 1977. - Culture prolongée *in vitro* de tissus de *Vicia faba* minor. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 284, Série D, 911-914.
- HANH T.T., 1978. - Organogenèse induite *in vitro* sur des fragments de racine de *Nicotiana tabacum* L. *Can. J. Bot.* 56 (19) : 2370-2374.
- HA NGOC K.A. et M. TRAN THANH VAN, 1979. - Capacité caulogène de cellules de callus issues des couches cellulaires minces de type épidermique de ramifications florales de *Nicotiana tabacum* cv. Wisc. 38. *Physiol. Plant.* 46 (2) : 203-207.
- HADDON L. et D.H. NORTHCOTE, 1976. - The effect of growth conditions and origin of tissue on the ploidy and morphogenetic potential of tissue cultures of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. exp. Bot.* 27 (100) : 1031-1051.
- HARDY R.W.F. et U.D. HAVELKA, 1975. - Photosynthate as a major factor limiting N₂ fixation by field-grown legumes with emphasis on soybean. In : NUTMAN P.S. - Symbiotic nitrogen fixation in plants, Ed. Cambridge University Press, London.

- HAYWARD H.E., 1938. - The structure of economic plants. Ed. The Macmillan Company, New-York, p. 309-338.
- HENNY R.J., 1978. - *In vitro* propagation of *peperomia* "Red Ripple" from leaf discs. *HortScience* 13 (2) : 150.
- HENSON I.E. et C.T. WHELLER, 1976. - Hormones in plants bearing nitrogen-fixing root nodules : the distribution of cytokinins in *Vicia faba* L. *New Phytol.* 76 : 433-439.
- HESZKY L., 1975. - Production of sainfoin (*Onobrychis viciaefolia* Scop.) callus and plant regeneration from tissue culture. *Bot. Közlem.* 62 (2) : 85-88.
- HILDEBRANDT A.C., J.C. WILMAR, H. JOHNS et A.J. RIKER, 1963. - Growth of edible chlorophyllous plant tissues *in vitro*. *Amer. J. Bot.* 50 : 248-254.
- ITO M., 1962. - Studies on the differentiation of the fern gametophytes, I : Regeneration of single cells isolated from cordate gametophytes of *Pteris vittata*. *Bot. Mag.* 75 : 19-27.
- JAMES D.J. et I.J. THURBON, 1979. - Rapid *in vitro* rooting of the apple rootstock M.9. *J. hortic. Sci.* 54 (4) : 309-311.
- JENSEN H.L., 1942. - Nitrogen fixation in leguminous plants. I - General characters of root-nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. *Proc. Linn. Soc. N.S.W.* 67 : 98-108.
- JOHNSON B.B., 1978a. - *In vitro* propagation of *Gloxinia* from leaf explants. *HortScience* 13 (2) : 149.
- JOHNSON B.B., 1978b. - *In vitro* propagation of *Episcia cupreata*. *HortScience* 13 (2) : 596.
- JOHNSTON A.W.B. et J.E. BERINGER, 1977. - Chromosomal recombination between *Rhizobium* species. *Nature* 267 : 611.
- JOHNSTON A.W.B., S.M. SETCHELL et J.E. BERINGER, 1978. - Interspecific crosses between *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium meliloti*. Formation of haploid recombinants and of R.-primes. *J. Gen. Microbiol.* 104 : 209-218.
- JULLIOT J.S. et P. BOISTARD, 1979. - Use of RP4-Prime plasmids constructed *in vitro* to promote a polarized transfer of the chromosome in *Escherichia coli* and *Rhizobium meliloti*. *Molec. gen. Genet.* 173 : 289-298.

- KAO K.N. et M.R. MICHAYLUK, 1980. - Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. *Z. Pflanzenphysiol.* 96 : 135-141.
- KARTHA K.K., N.L. LEUNG et O.L. GAMBORG, 1979. - Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration. *Plant Science Letters* 15 : 7-15.
- KOCH B. et H.J. EVANS, 1966. - Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. *Plant Physiol.* 41 : 1748-1749.
- KOEVARY K., L. RAPPAPORT et L.L. MORRIS, 1978. - Tissue culture propagation of head lettuce. *HortScience* 13 (1) : 39-41.
- KONDOROSI A., G.B. KISS, T. FORRAI, E. VINCZE et Z. BANFALVI, 1977. - Circular linkage map of *Rhizobium meliloti* chromosome. *Nature* 268 : 525-527.
- KUKULCZANKA K. et G. SUSZYNSKA, 1972. - Regenerative properties of *Saintpaulia ionantha* Wendl. leaves cultured *in vitro*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 51 (4) : 503-510.
- LABANDERA C.A. et J.M. VINCENT, 1975. - Loss of symbiotic capacity in commercial strains of *Rhizobium trifolii*. *J. appl. Bact.* 39 : 209-211.
- LAKSHMANAN K.K., 1978. - Morphogenesis in the excised cotyledons of *Arachis hypogaea*. *Madras Univ. J. (Sec. B)* 41 (2) : 147-154.
- LAKSHMANAN K.K. et K. JANARDHANAN, 1977. - Morphogenesis in leaf culture of *Furcraea gigantea*. *Phytomorphology* 27 (1) : 85-87.
- LAMPORT D.T.A., 1964. - Cell suspension cultures of higher plants : isolation and growth energetics. *Exp. Cell. Res.* 33 : 195-206.
- LEROUX R., 1973. - Contribution à l'étude de la rhizogénèse de fragments de tiges de pois (*Pisum sativum* L.) cultivés *in vitro*. *Rev. Cytol. et Biol. vég.* 36 : 1-132.
- LETOUZE R., 1978. - Corrélation de croissance chez le bourgeon axillaire de *Salix babylonica* L. en culture *in vitro*. Rôle des feuilles et activité phénylalanine ammoniaclyase. *Plant Science Letters* 11 : 137-143.
- LIAU D.F. et W.G. BOLL, 1971. - Growth and patterns of growth and division of cell suspension cultures of bush beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Contender). *Can. J. Bot.* 49 : 1131-1139.
- LIBBENGA K.R. et R.J. BOGERS, 1974. - Root nodule morphogenesis. In : QUISPÉL A. - The biology of nitrogen fixation, Ed. North-Holland, Amsterdam, p. 430-472.

- LINDSAY C.R. et D.C. JORDAN, 1976. - Use of stem cuttings to reduce plants variation in *Rhizobium*-leguminous plant investigations. *Can. J. Soil Sci.* 56 : 495-497.
- LIPMAN J.C. et A.B. CONYBEARE, 1936. - *Bull. N. J. Agric. Exp. sta.*, 607.
- LONERAGAN J.F. et E.J. DOWLING, 1958. - The interaction of calcium and hydrogen ions in the nodulation of *Trifolium subterraneum* L. *Aust. J. Agric. Res.* 9 : 464-472.
- LOWE R.H., H.J. EVANS et S. AHMED, 1960. - The effect of cobalt on the growth of *Rhizobium japonicum*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 3 : 675-678.
- LOWTHER W.L. et J.F. LONERAGAN, 1968. - Calcium and nodulation in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Plant Physiol.* 43 (9) : 1362-1366.
- MAOUI K.R., 1980. - Etude du transfert génétique de l'efficacité chez *Rhizobium meliloti*. Thèse de 3ème Cycle, Université des Sciences et Techniques de Lille, 97 p.
- MALMBERG R.L., 1979. - Regeneration of whole plants from callus culture of diverse genetic lines of *Pisum sativum* L.. *Planta* 146 : 243-244.
- MARGARA J., 1977. - Effets d'auxines et d'antiauxines sur la néoformation de bourgeons *in vitro* chez le chou-fleur (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* C. R. Acad. Sci., Paris, 284, Série D, 1883-1885.
- MASCARENHAS A.F., R.R. HENDRE, A.L. NADGIR, D.D. GHUGALE, D.A. GODBOLE, R.A. PRABHU et V. JAGANNATHAN, 1976. - Development of plantlets from cultured tissues of *Dioscorea deltoidea* Wall. *Indian J. Exp. Biol.* 14 : 604-606.
- MASSENOT M., 1978. - Données utiles au sélectionneur pour améliorer la résistance des luzernes à l'égard des maladies et ravageurs. Etude n°64. Ed. S.E.I., C.N.R.A. - Versailles, 59 p.
- MATHEWS V.H. et S. NARAYANASWAMY, 1976. - Phytohormone control of regeneration in cultured tissues of flax. *Z. Pflanzenphysiol.* 80 : 436-442.
- MCCOY T.J. et E.T. BINGHAM, 1977. - Regeneration of diploid alfalfa plants from cells grown in suspension culture. *Plant Science Letters* 10 : 59-66.
- MEADE H.M. et E.R. SIGNER, 1977. - Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74 : 2076-2078.

- MEHTA A.R., G.G. HENSHAW et H.E. STREET, 1967. - Aspects of growth in suspension cultures of *Phaseolus vulgaris* L. and *Linum usitatissimum* L. *Indian J. Plant Physiol.* 10 : 44-53.
- MEYER Jr. M.M. et G.M. MILBRATH, 1977. - *In vitro* propagation of horseradish with leaf pieces. *HortScience* 12 (6) : 544-545.
- MITCHEL J.P. et F.E. GILDOW, 1975. - The initiation and maintenance of *Vicia faba* tissue cultures. *Physiol. Plant.* 34 : 250-253.
- MOREAU M. et A. MATHIEU, 1979. - Statistique appliquée à l'expérimentation : recherche de l'influence d'un facteur contrôlé. Ed. Eyrolles, Paris, p. 149-153.
- MUUNS D.N., 1965. - Soil acidity and growth of a legume. I - Interactions of lime with nitrogen and phosphate on growth of *Medicago sativa* L. and *Trifolium subterraneum* L.. *Aust. J. Agric. Res.* 16 : 733-741.
- MUNNS D.N., 1968. - Nodulation of *Medicago sativa* L. in solution culture. I - Acid sensitive steps. *Plant and soil* 28 : 129-146.
- MUNNS D.N., 1969. - Enzymatic breakdown of pectin and acid-inhibition of the infection of *Medicago* roots by *Rhizobium*. *Ibid.* 30 : 117-120.
- MUUNS D.N., 1970. - Nodulation of *Medicago sativa* L. in solution culture. V - Calcium and pH requirements during infection. *Ibid.* 32 : 90-102.
- NEDDENRIEP K.J., 1964. - Methoden der vegetativen Vermehrung bei kleeartigen Futterpflanzen. *Z. Acker- und Pflanzenbau* 119 : 323-346.
- NEGRUTIU I., M. JACOBS et D. CACHITA, 1978. - Some factors controlling *in vitro* morphogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Z. Pflanzenphysiol.* 86 : 113-124.
- NIIZEKI M. et W.F. GRANT, 1971. - Callus, plantlet formation, and polyploidy from cultured anthers of *Lotus* and *Nicotiana*. *Can. J. Bot.* 49 : 2041-2051.
- NORTON J.P. et W.G. BOLL, 1954. - Callus and shoot formation from tomato roots *in vitro*. *Science* 119 : 220-221.
- NOZERAN R., 1978. - Polymorphisme des individus issus de la multiplication végétative des végétaux supérieurs, avec conservation du potentiel génétique. *Physiol. Vég.* 16 (2) : 177-194.
- NOZERAN R., L. BANCILHON-ROSSIGNOL et S. GREANAN, 1977. - Nouvelles possibilités d'obtention et de multiplication rapide de clones sains de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 285, Série D, 37-40.

- OBAME L.F., 1978. - Culture *in vitro* et morphogénèse des tissus de luzerne (*Medicago sativa* L.). Diplôme d'études approfondies de Biologie végétale "Amélioration des Productions végétales et Microbiennes". Université des Sciences et Techniques de Lille, 53 p.
- OKONKWO S.N.C., 1970. - Studies on *Striga senegalensis*. V - Origin and development of buds from roots of seedlings reared *in vitro*. *Phytomorphology* 20 : 144-150.
- OSWALD T.H., A.E. SMITH et D.V. PHILLIPS, 1977. - Callus plantlet regeneration from cell cultures of ladino clover and soybean. *Physiol. Plant.* 39 : 129-134.
- PADMANABHAN V., E.F. PADDOCK et W.R. SHARP, 1974. - Plantlet formation from *Lycopersicon esculentum* leaf callus. *Can. J. Bot.* 52 : 1429-1432.
- PAULET P. et J.P. NITSCH, 1974. - Néof ormation de fleurs *in vitro* sur des cultures de tissus de racines de *Cichorium intibus* L.. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 258 : 5952-5955.
- PELLETIER G. et A. PELLETIER, 1971. - Culture *in vitro* de tissus de trèfle blanc (*Trifolium repens*) ; variabilité des plantes régénérées. *Ann. Amélior. Plantes* 21 (2) : 221-233.
- PETERS J.E., O.J. CROCOMO et W.R. SHARP, 1976. - Effect of caffeine and nicotine on the callus growth and root morphogenesis of *Phaseolus vulgaris* tissue cultures. *Turrialba* 26 (4) : 337-341.
- PETERSON R.L., 1970. - Bud development at the root apex of *Ophioglossum petiolatum*. *Phytomorphology* 20 : 183-190.
- PHILLIPS D.A., K.D. NEWELL, S.A. HASSEL et C.E. FELLING, 1976. - The effect of CO₂ enrichment on root nodule development and symbiotic N₂ reduction in *Pisum sativum* L.. *Amer. J. Bot.* 63 (3) : 356-362.
- PHILLIPS D.A. et J.G. TORREY, 1970. - Cytokinin production by *Rhizobium japonicum*. *Physiol. Plant.* 23 (6) : 1057-1063.
- PHILLIPS D.A. et J.G. TORREY, 1972. - Studies on cytokinin production by *Rhizobium*. *Plant Physiol.* 49 : 11-15.
- PHILPOTTS H., 1977. - Effect of inoculation method on *Rhizobium* survival and plant nodulation under adverse conditions. *Austr. J. Exp. Agric. Anim. Hubs.* 17 : 308-315.

- PILLAI S.K. et A.C. HILDEBRANDT, 1969. - Induced differentiation of *Geranium* plants from undifferentiated callus *in vitro*. *Amer. J. Bot.* 56 (1) : 52-58.
- PLESSIX J. du, 1968. - Essais de mise en évidence de l'intérêt d'une étude de développement pour l'amélioration de l'hévéa (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg., Euphorbiacée-Crotonoïdée). *Rapport de recherche I.R.C.A., S.A.* 1/68, 56 p.
- PRIMO MILLO E. et H. HARADA, 1976. - Contrôle hormonal de la formation de cals, bourgeons et racines sur des entre-noeuds de Citrange Troyer (Hybride de *Citrus sinensis* var. Washington Navel x *Poncirus trifoliata*) cultivés *in vitro*. *An. INIA/Ser. : Prod. veg.* 6 : 9-26.
- PUPPO A. et J. RIGAUD, 1978. - Cytokinins and morphological aspects of french bean roots in the presence of *Rhizobium*. *Physiol. Plant.* 42 (2) : 202-206.
- PUPPO A., J. RIGAUD et P. BARTHE, 1974. - Sur la présence de cytokinines dans les nodules de *Phaseolus vulgaris* L.. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 279, Série D, 2039-2042.
- RACCA R.W., 1980. - Mise au point de nouvelles techniques de culture de racines isolées de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) par "double alimentation" en vue d'étudier la physiologie de la formation des nodosités. *Ibid.* 290 : 605-608.
- RACCA R.W., 1980. - Nouvelles techniques pour l'étude *in vitro* de la formation de nodosités chez le soja (*Glycine max* (L.) Merr.). Sous presse.
- RAO V.R., 1977a. - Effect of temperature on the infection processes and nodulation in *Lotus* and *Stylosanthes*. *J. Exp. Bot.* 28 (103) : 241-259.
- RAO V.R., 1977b. - Effect of temperature on the nitrogenase activity of intact and detached nodules in *Lotus* and *Stylosanthes*. *Ibid.* 28 (103) : 261-267.
- RAO P.S., W. HANDRO et H. HARADA, 1973. - Hormonal control of differentiation of shoots, roots and embryos in leaf and stem cultures of *Petunia inflata* and *Petunia hybrida*. *Physiol. Plant.* 28 : 458-463.
- RAMAWAT K.G., R. RAJ BHANSALI et H.C. ARYA, 1977. - Differentiation in *Crotalaria* callus cultures. *Phytomorphology* 27 (3) : 303-307.
- RAMAWAT K.G., R. RAJ BHANSALI et H.C. ARYA, 1978. - Shoot formation in *Catharanthus roseus* (L.) G. DON callus cultures. *Curr. Sci.* 47 (3) : 93-94.

- RAJ BHANSALI R., K.G. RAMAWAT, A. KUMAR et H.C. ARYA, 1978. - Callus initiation and organogenesis *in vitro* cultures of *Crotalaria burhia*. *Phytomorphology* 28 (1) : 98-102.
- RAKATOARISOA R.R., 1980. - Etude d'un mutant acido-résistant de *Rhizobium meliloti*. Thèse de 3ème Cycle, Université des Sciences et Techniques de Lille, 102 p.
- RIGAUD J., 1970. - La biosynthèse de l'acide indolyl-3-acétique en liaison avec le métabolisme du tryptophol et de l'indolyl-3-aldéhyde chez *Rhizobium*. *Physiol. Plant.* 23 (1) : 171-178.
- RIGAUD J. et J.C. TRINCHANT, 1973. - Isolement d'une alcool déshydrogénase chez *Rhizobium* et rôle dans le métabolisme indolique. *Ibid.* 28 (1) : 160-165.
- RICE W.A., 1975. - Effect of CaCO_3 and inoculum level on nodulation and growth of alfalfa in an acide soil. *Can. J. Soil Sci.* 55 : 245-250.
- RICE W.A., D.C. PENNY et M. NYBORG, 1977. - Effects of soil acidity on rhizobia numbers, nodulation and nitrogen fixation by alfalfa and red clover. *Ibid.* 57 : 197-203.
- ROBSON A.D. et J.F. LONERAGAN, 1970. - Nodulation and growth of *Medicago truncatula* on acid soils. II - Colonization of acid soils by *Rhizobium meliloti*. *Aust. J. Agric. Res.* 21 : 435-445.
- ROUGHLEY R.J., W.M. BLOWE et D.F. HERRIDGE, 1976. - Nodulation of *Trifolium subterraneum* by introduced *Rhizobia* in competition with naturalized strains. *Soil Biol. Biochem.* 8 : 403-407.
- SAUNDERS J.W. et E.T. BINGHAM, 1972. - Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Sci.* 12 : 804-808.
- SAUNDERS J.W. et E.T. BINGHAM, 1975. - Growth regulator effects on bud initiation in callus culture of *Medicago sativa* L.. *Amer. J. Bot.* 62 (8) : 850-855.
- SCOWCROFT W.R. et J.A. ADAMSON, 1976. - Organogenesis from callus cultures of the legume, *Stylosanthes hamata*. *Plant Science Letters* 7 : 39-42.
- SEN B. et S. GUPTA, 1979. - Differentiation in callus cultures of leaf of two species of *Trigonella*. *Physiol. Plant.* 45 : 425-428.

- SHI-TAO YIE et S.I. LIAW, 1977. - Plant regeneration from shoot tips and callus of papaya. *In VITRO* 13 (9) : 564-568.
- SIRONVAL C. et Ch. BONNIER, 1967. - La fixation de l'azote de l'air. Le cycle de l'azote. *In* : "Traité de Biochimie générale", III (1) : 341-351. Ed. Masson et Cie, Paris.
- SOLHEIM B. et J. RAA, 1973. - Characterization of the substances causing deformation of root hairs of *Trifolium repens* when inoculated with *Rhizobium trifolii*. *J. Gen. Microbiol.* 77 : 241-257.
- SKIRVIN R.M., 1978. - Natural and induced variation in tissue culture. *Euphytica* 27 : 241-266.
- STEWART F.C. et D.J. DURZAN, 1965. - Metabolism : Organic nutrition and nitrogen metabolism. *In* : STEWART F.C. - *Plant Physiology IV A* : 401-407. Ed. Academic Press, New-York.
- STREET H.E., 1957. - Excised root culture. *Biol. Rev.* 32 : 117-155.
- STREETER J.G., 1974. - Growth of two soybean shoots on a single root. *J. Exp. Bot.* 25 : 189-198.
- STOUTEMYER V.T. et O.K. BRITT, 1965. - The behaviour of tissue culture from english and algerian ivy in different growth phases. *Amer. J. Bot.* 52 : 805-810.
- SYONO K. et J.G. TORREY, 1976. - Identification of cytokinins of root nodules of the garden pea, *Pisum sativum* L.. *Plant Physiol.* 57 : 602-606.
- SZWEYKOWSKA I., 1974. - The role of cytokinins in the control of cell growth and differentiation in culture. *In* : STREET H.E. - *Tissue and Plant Science*, p. 461-475. Ed. Academic Press, London.
- THAKUR S., P.S. GANAPATHY et B.M. JOHRI, 1976. - Differentiation of abnormal plantlets in *Bacopa monnieri*. *Phytomorphology* 26 (4) : 422-424.
- THAKUR S. et P.S. GANAPATHY, 1977. - *In vitro* organ differentiation in *Begonia picta* Smith. *Indian J. Exp. Biol.* 15 (11) : 1066-1068.
- TORREY J.G., 1958. - Endogenous bud and root formation by isolated roots of *Convolvulus* grown *in vitro*. *Plant Physiol.* 33 : 258-263.
- TRUCHET G., 1978. - Sur l'état diploïde des cellules du méristème des nodules radiculaires des légumineuses. *Ann. Sci. nat., Bot. Biol. vég.* 19 : 3-38.

- TRUCHET G., M. MICHEL et J. DENARIE, 1979. - Sequential analysis of the organogenesis of lucerne (*Medicago sativa* L.) root nodules using symbiotically-defective mutants of *Rhizobium meliloti*. Differentiation. Sous presse.
- TRUCHET G. et J. DENARIE, 1979. - La symbiose *Rhizobium*-légumineuses : rôles respectifs des partenaires. *Physiol. Vég.* 17 (4) : 643-667.
- TU J.C., 1974. - Relationships between the membrane envelopes of rhizobial bacteroids and the plasma of the host cell as demonstrated by histochemical localisation of adenyl cyclase. *J. Bacteriol.* 119 : 986-989.
- TU J.C., 1974. - Structural similarity of the membrane envelopes of rhizobial bacteroids and the host plasma membrane as revealed by freeze fracturing. *Ibid.* 122 : 691-694.
- VASSEUR J., 1978. - Etude du bourgeonnement de fragments de feuilles étiolées d'Endive (*Cichorium intybus*) en fonction de critères physiologiques et biochimiques. *Thèse de Doctorat d'Etat*, Université des Sciences et Techniques de Lille, 240 p.
- VELIKY I.A. et S.M. MARTIN, 1971. - A fermentor for plant cell suspension cultures. *Can. J. Microbiol.* 16 : 223-226.
- VERMA D.P.S., V. ZOGBI et A.K. BAL, 1978. - A cooperative action of plant and *Rhizobium* to dissolve the host cell wall during development of root nodule symbiosis. *Plant Science Letters* 13 : 137-142.
- VINCENT J.M., 1974. - Root-nodule symbiosis with *Rhizobium*. In : QUISPÉL A. - The biology of nitrogen fixation. Ed. North-Holland, Amsterdam, p. 265-341.
- VIEITEZ A.M., M.L. GONZALES et E. VIEITEZ, 1978. - *In vitro* culture of cotyledon tissue of *Castanea sativa* Mill. *Sciencitia horticulturae* 8 : 243-247.
- VIRTANEN A.I. et J.K. MIETTINEN, 1963. - Biological nitrogen fixation. In : STEWARD F.C. - *Plant Physiology III* : 539-645. Ed. Academic Press, New-York.
- WAKASA K., 1979. - Variation in the plants differentiated from the tissue culture of pineapple. *J. Breed.* 29 (1) : 13-22.
- WALKER K.A., P.C. YU, S.J. SATO et E.G. JAWORSKI, 1978. - The hormonal control of organ formation in callus of *Medicago sativa* L. cultured *in vitro*. *Amer. J. Bot.* 65 (6) : 654-659.
- WELANDER T., 1977. - *In vitro* organogenesis in explants from different cultivars of *Begonia x hiemalis*. *Physiol. Plant.* 41 : 142-145.

WHITE W.J., 1946. - An improved method of rooting alfalfa cuttings. *Sci. Agric.* 26 : 194-197.

WILSON M.H.M., B.A. HUMPHREY et J.M. VINCENT, 1975. - Loss of agglutinating specificity in stock cultures of *Rhizobium meliloti*. *Arch. Microbiol.* 103 : 151-154.

WINTON L.L., 1970. - Shoot and tree production from aspen tissue cultures. *Amer. J. Bot.* 57 (8) : 904-909.

