



# **Recherche d'une méthode fiable de culture de protoplastes, d'hybridation somatique et de régénération chez Medicago**

Evelyne Téoulé, Yvette Dattée

## **► To cite this version:**

Evelyne Téoulé, Yvette Dattée. Recherche d'une méthode fiable de culture de protoplastes, d'hybridation somatique et de régénération chez Medicago. *Agronomie*, 1987, 7 (8), pp.575-584. <hal-00885029>

**HAL Id: hal-00885029**

**<https://hal.science/hal-00885029v1>**

Submitted on 11 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

# Recherche d'une méthode fiable de culture de protoplastes, d'hybridation somatique et de régénération chez *Medicago*

Evelyne TÉOULÉ, Yvette DATTÉE

Laboratoire d'Amélioration des Plantes, Université Paris XI, 91405 Orsay Cedex

## RÉSUMÉ

La maîtrise des techniques de culture de protoplastes et d'hybridation somatique dans le genre *Medicago* présente un grand intérêt tant au plan agronomique, pour être intégrée dans les schémas d'amélioration, qu'au plan fondamental pour une meilleure connaissance du genre.

Cet article présente les recherches effectuées pour la mise au point d'une méthode de culture des protoplastes et d'une technique d'hybridation somatique, compatibles avec la régénération de plantes et non spécifiques d'un génotype particulier. Les espèces étudiées sont *Medicago sativa* et *Medicago falcata*. Les facteurs conditionnant la régénération sont décrits : culture des plantes, techniques d'isolement, conditions de culture des protoplastes puis des cals et des embryons. La technique de fusion est détaillée : nature de l'agent de fusion, modalités de la fusion.

**Mots clés additionnels :** *Fusion somatique*, *Medicago sativa*, *Medicago falcata*.

## SUMMARY

*Development of a reliable method for protoplast culture, somatic hybridization and plant regeneration in the genus Medicago.*

The mastery of protoplast culture and somatic hybridization techniques in the genus *Medicago* would be of great interest for agronomic purposes (integration into breeding strategies) and also for fundamental knowledge of the genus. This paper presents research on protoplast culture and somatic hybridization aimed at developing methods compatible with regeneration but independent of genotype. The studied species were *Medicago sativa* and *Medicago falcata*. Protoplast source plants had to be pretreated with a short photoperiod for at least 15 days before protoplast isolation. Protoplasts were isolated from young leaves, by slow incubation in a modification of the enzyme solution of KAO & MICHAYLUK (1980). The best culture medium was derived from that of KAO & MICHAYLUK (1980), modified for glucose concentration. Culture density was around 50.000 protoplasts/ml. The best temperature was 28 °C. The method used to sustain division is described in detail because this seems to be a very important factor. By this technique we obtained calli and embryos and were able to regenerate plants. Concerning somatic hybridization, two fusing agents were tested : polyethylene glycol (PEG) and calcium chloride. The fusion rate was about 20 % with PEG but almost all the protoplasts died after this treatment. With calcium chloride, the fusion rate was lower (10 %), but the viability of the treated protoplasts was good. In addition, this process allowed us to regenerate plants, and even somatic hybrid plants. This is the reason why somatic hybridization is now considered to be usable in *Medicago* breeding.

**Additional key words :** *Somatic fusion*, *Medicago sativa*, *Medicago falcata*.

## I. INTRODUCTION

La famille des Légumineuses est réputée poser beaucoup de problèmes en culture *in vitro*. La régénération de plantes entières à partir de cals issus d'explants somatiques n'a été réussie que chez quelques espèces : *Medicago sativa* L. (SAUNDERS & BINGHAM, 1972, 1975 ; MAC COY & BINGHAM, 1977 ; KAO & MICHAYLUK, 1981), *Trifolium repens* L. (PELLETIER G. & PELLETIER A., 1971 ; OSWALD *et al.*, 1977), *Trifolium pra-*

*tense* L. (PHILLIPS & COLLINS, 1978 ; BEACH & SMITH, 1979), *Trifolium alexandrinum* L. (MOKHTARZADEH & CONSTANTIN, 1978), *Pisum sativum* L. (MALMBERG, 1979 ; JACOBSEN & KYSELY, 1984), *Glycine canescens* F. J. HERM (KAMEYA & WILDHOLM, 1981), *Vicia faba* L. (GALZY & HAMOUI, 1981), *Stylosanthes humilis* H. B. K. (MEIJER, 1982), *Onobrychis vicifolia* Scop. L. (ARCIONI & MARIOTTI, 1983), *Lotus corniculatus* L. (MARIOTTI *et al.*, 1984).

*Medicago sativa*, l'un des matériels les mieux con-

nus, a fait l'objet de nombreux travaux sur la régénération (BINGHAM *et al.*, 1975 ; REISCH & BINGHAM, 1980 ; WALKER & SATO, 1978, 1979, 1981 ; LUPOTTO, 1983 ; HARTMAN *et al.*, 1984 ; STUART *et al.*, 1984 ; MITTEN *et al.*, 1984 ; BROWN & ATANASSOV, 1985).

En ce qui concerne la culture de protoplastes, des régénérations de plantes ont été obtenues sur *Medicago sativa* (KAO & MICHAYLUK, 1980 ; DOS SANTOS *et al.*, 1980 ; JOHNSON *et al.*, LU *et al.*, 1982 ; XU *et al.*, 1981 ; PEZZOTTI *et al.*, 1984), *Medicago coerulea* GRASSH et *M. glutinosa* MARSCHALL VON BIEBERSTEIN (ARCIONI *et al.*, 1982), *Medicago arborea* L. (MARIOTTI *et al.*, 1984), *Trifolium repens* (GRESSHOFF, 1980), *Trigonella corniculata* L. (LU *et al.*, 1982), *Lotus corniculatus* (AHUYA *et al.*, 1983 ; MARIOTTI *et al.*, 1984), *Trifolium rubens* L. (GROSSER & COLLINS, 1984).

Le plus souvent les techniques mises au point sont spécifiques de certains génotypes ce qui limite leur utilisation dans les programmes d'amélioration génétique. De plus, les résultats relatifs à la régénération de plantes après une opération de fusion sont encore très rares chez les Légumineuses puisque ce n'est que récemment qu'il a été fait état d'un hybride somatique entre 2 espèces du genre *Medicago* (TÉOULÉ, 1983a-b).

L'objectif est ici de présenter les premières étapes d'une recherche visant à intégrer l'hybridation somatique interspécifique dans le schéma d'amélioration de la luzerne cultivée : l'adaptation de la technique de régénération après culture de protoplastes à une gamme diversifiée de génotypes de *M. sativa* et de *M. falcata*, et la mise au point d'une méthode d'hybridation somatique compatible avec la régénération.

## II. PRINCIPAUX FACTEURS CONDITIONNANT LA RÉGÉNÉRATION

### A. Conditionnement des plantes

Chez *M. sativa*, tétraploïde, ont été utilisés 2 cultivars : Europe et Verneuil, 3 populations : la popula-

tion flamande, la population provence et une population chinoise, et 9 clones mâles stériles cytoplasmiques d'origines diverses. Chez *M. falcata* tétraploïde, 2 populations ont été étudiées.

Les boutures sont cultivées en vermiculite et arrosées à l'eau désionisée. Une solution nutritive est apportée 2 fois par semaine. Plusieurs conditions de température et de photopériode ont été expérimentées (tabl. 1). Mis à part les génotypes issus de la population chinoise qui produisent toujours de très bons rendements et une bonne efficacité d'étalement, le comportement de l'ensemble des autres génotypes dépend beaucoup des conditions photopériodiques. Les meilleurs résultats sont obtenus avec une photopériode alternative 16 h/9 h : les plantes croissent initialement en 16 h de jour puis sont transférées en 9 h, 15 jours au minimum avant le prélèvement des feuilles.

### B. Isolement des protoplastes

Les feuilles sont prélevées à un stade jeune mais lorsqu'elles sont déjà bien dépliées. Elles sont rincées au teepol et stérilisées à l'hypochlorite de calcium à 7 % pendant 20 mn puis rincées 3 fois à l'eau distillée stérile.

L'épiderme inférieur est ôté et la face pelée est déposée à la surface d'une solution enzymatique. L'incubation a toujours lieu à l'obscurité et à 26 °C environ. Deux durées d'incubation, chacune associée à une solution particulière ont été testées (tabl. 2).

Pour l'ensemble des génotypes, l'incubation lente dans la solution E<sub>1</sub> est apparue préférable. Elle conduit à un meilleur rendement : 15.10<sup>6</sup> protoplastes par gramme de poids frais contre 6.10<sup>6</sup> après l'incubation rapide. De plus, les protoplastes sont moins fragiles et ont une efficacité d'étalement 2 fois plus élevée qu'après l'incubation rapide.

TABLEAU 1

*Influence des conditions de culture des plantes mères (température et photopériode), sur le rendement (R) et la division des protoplastes. Résultats qualitatifs relatifs à l'ensemble des génotypes de M. sativa et de M. falcata.*  
*Influence of culture conditions of the protoplast source plants (temperature and photoperiod) on the yield (R) and the plating efficiency of protoplasts. Qualitative results relating to all the genotypes of M. sativa and M. falcata.*

Photopériode \ Température	18 °C	22 °C	24 °C jour/17 °C nuit	< 25 °C Serre non régulée
16 h	R < 0,5.10 <sup>6</sup> /g débris : nombreux pas de divisions	5.10 <sup>6</sup> /g < R < 10 <sup>7</sup> /g débris : peu E.E. < 10 %	5.10 <sup>6</sup> /g < R < 10 <sup>7</sup> /g débris : peu E.E. < 10 %	10 <sup>6</sup> /g < R < 2.10 <sup>6</sup> /g débris : peu pas de divisions
9 h	R < 0,5.10 <sup>6</sup> /g débris : nombreux pas de divisions	R > 10 <sup>7</sup> /g débris : peu 10 % < E.E. < 20 %		5.10 <sup>6</sup> /g < R < 10 <sup>7</sup> /g 10 % < E.E. < 20 %
*alternatif 16 h/9 h		R > 10 <sup>7</sup> /g débris : peu	E.E. > 25 %	

E.E. = efficacité d'étalement.

\* Les températures 22 °C et (24 °C/17 °C) correspondent respectivement aux superserres du phytotron en 9 h et 16 h d'éclairement. Le traitement alternatif 16 h/9 h concerne uniquement ces conditions de température.

TABLEAU 2

Mode d'incubation et composition des solutions enzymatiques testées pour l'obtention des protoplastes de feuilles de luzerne.

Incubation method and composition of enzyme solutions tested to obtain mesophyll protoplasts of alfalfa.

Composants \ Mode d'incubation	Incubation lente (16 h) Solution E1 %	Incubation rapide (6 h) Solution E2 %
Cellulase R-10	1	5
Macerozyme	0,5	1,25
Rhozyme	1	—
Mannitol	5,5	11
Sorbitol	5,5	—
Tampon M.E.S.	0,058	—
Sels minéraux	—	Sels de Frearson (FREARSON <i>et al.</i> 1973)
pH et mode d'ajustement	5,6/NaOH	5,6/NaOH
pt de stérilisation	Solution stérilisée par filtration	Solution stérilisée par filtration
Dilution avec milieu de culture	Proportions 1 : 1	Aucune

Les pourcentages sont exprimés en poids/volume.

La composition des solutions enzymatiques est inspirée de celle de KAO & MICHAYLUK (1980) et de celle de DOS SANTOS *et al.* (1980).

Percentages expressed in weight/volume.

Composition of enzyme solutions derived from those of KAO & MICHAYLUK (1980) and DOS SANTOS *et al.*, (1980).

### C. Composition du milieu

Trois milieux ont été testés (tabl. 3a, 3b). Excepté des différences sur le taux de bourgeonnement (souvent associé à un faible taux de division), les protoplastes des différents génotypes se comportent sensiblement de la même façon sur un même milieu. Toutefois, ce n'est que sur le milieu K<sub>77</sub> que des divisions suivies de formation de cals ou d'embryons ont été obtenues.

### 1. Nature et concentration des sucres

Les protoplastes de mésophylle de feuilles de luzerne sont assez tolérants et survivent au moins 48 h lorsque la pression osmotique est comprise entre 550 m Os et 800 m Os.

Les effets de la nature du sucre ont été recherchés avec, comme milieu de base, le milieu K<sub>77</sub>. Le saccharose employé seul ou avec du mannitol induit rapidement la mort des protoplastes. Par contre, associé ou non au mannitol, le glucose est bien toléré. Les divisions se poursuivent toutefois plus régulièrement lorsque le glucose est employé seul.

Le milieu retenu pour convenir à l'ensemble des génotypes est à 795 m Os, il comprend du glucose (110,4 g/l soit 0,61 M) et les 9 sucres, employés en faible quantité par KAO (1977). L'adjonction de ces 9 sucres améliore l'efficacité d'étalement et la rapidité d'apparition de la première division.

### 2. Nature et concentration des régulateurs de croissance

La composition hormonale du milieu de KAO (KAO, 1977) a été retenue. L'importance de la zéatine pour tous les génotypes de *M. sativa* et de *M. falcata* utilisés est à signaler : si on supprime cette cytokinine, l'efficacité d'étalement est voisine de 0.

### 3. Substances organiques

L'hydrolysate de caséine et les acides organiques (KAO, 1977), ont un effet bénéfique sur le taux de division. Par contre, et contrairement à KAO (1977), aucune amélioration n'est observée après apport de lait de coco.

### 4. pH et stérilisation du milieu

Un pH de 5,7 donne les meilleurs résultats, il est ajusté par NaOH. Le milieu est stérilisé par filtration sur membrane millipore 0,45 µ.

TABLEAU 3a

Premiers stades de l'évolution de la culture de protoplastes de feuilles de luzerne : résultats obtenus sur les milieux B<sub>5</sub> (a), KM<sub>8</sub>P (b) et K<sub>77</sub> (c).  
First stages of evolution of alfalfa mesophyll protoplast culture : results on medium B<sub>5</sub> (a), KM<sub>8</sub>P (b) and K<sub>77</sub> (c).

Génotypes \ Milieu	B <sub>5</sub>	KM <sub>8</sub> P	K <sub>77</sub>
<i>Medicago sativa</i> à l'exception de la population chinoise.	Reconstitution des parois. Pas de divisions.	Reconstitution des parois. Nombreux bourgeonnements. Quelques divisions.	Reconstitution des parois. Divisions continues. Formation de cals ou d'embryons.
<i>Medicago sativa</i> . Population chinoise.	Reconstitution des parois. Quelques divisions.	Reconstitution des parois. Nombreux bourgeonnements. Quelques divisions.	Reconstitution des parois. Nombreux bourgeonnements. Divisions continues et formation d'embryons.
<i>Medicago falcata</i> .	Non testé.	Reconstitution de quelques parois. Quelques divisions « étirées » s'arrêtant rapidement.	Reconstitution des parois. Pas de bourgeonnement. Divisions continues et formation d'embryons.

a) GAMBORG *et al.*, 1968.

b) KAO & MICHAYLUK, 1975.

c) KAO, 1977.

TABLEAU 3b  
Composition des milieux de culture.  
Composition of culture media.

mg/l	K <sub>77</sub>	K <sub>4</sub>	KM <sub>8</sub> P	K <sub>795</sub>	B <sub>5</sub>	A
<i>Macro-éléments</i>						
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	—	—	—	—	150,00	75,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	—	—	—	—	—	170,00
CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	600,00	600,00	600,00	600,00	150,00	295,00
KNO <sub>3</sub>	1 900,00	1 900,00	1 900,00	1 900,00	3 000,00	2 200,00
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	600,00	600,00	600,00	600,00	—	600,00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	—	—	—	—	134,00	67,00
MgSO <sub>4</sub>	300,00	300,00	300,00	300,00	500,00	310,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	170,00	170,00	170,00	—	—
KCl	300,00	300,00	300,00	300,00	—	—
<i>Micro-éléments</i>						
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
KI	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
CoCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
<i>Vitamines</i>						
Nicotinamide	1,00	1,00	1,00	1,00	—	—
Pyridoxine HCl	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Thiamine HCl	10,00	10,00	1,00	10,00	10,00	10,00
D-Ca pantothenate	0,5	0,5	1,00	0,5	—	—
Acide folique	0,2	0,2	0,4	0,2	—	—
Acide p-amino benzoïque	0,01	0,01	0,02	0,01	—	—
Biotine	0,005	0,005	0,01	0,005	—	—
Chlorhydrate de choline	0,5	0,5	1,00	0,50	—	—
Riboflavine	0,1	0,1	0,20	0,10	—	—
Acide ascorbique	1,0	1,0	2,00	1,00	—	—
Vitamine A	0,005	0,005	0,01	0,005	—	—
Vitamine D <sub>3</sub>	0,005	0,005	0,01	0,005	—	—
Vitamine B <sub>12</sub>	0,01	0,01	0,02	0,01	—	—
Acide nicotinique	—	—	—	—	1,00	1,00
<i>Poly ols</i>						
Inositol	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Sorbitol	125,00	125,00	250,00	125,00	—	—
Mannitol	125,00	125,00	250,00	125,00	—	—
<i>Oses</i>						
Glucose	68 400,00	10 000,00	68 400,00	110 400,00	—	5 000,00
Saccharose	125,00	20 000,00	250,00	125,00	20 000,00	25 000,00
Fructose	125,00	125,00	250,00	125,00	—	—
Ribose	125,00	125,00	250,00	125,00	—	—
Xylose	125,00	125,00	250,00	125,00	—	250,00
Mannose	125,00	125,00	250,00	125,00	—	—
Rhannose	125,00	125,00	250,00	125,00	—	—
Cellobiose	125,00	125,00	250,00	125,00	—	—
<i>Acides organiques</i>						
Pyruvate de sodium	5,00	5,00	20,00	5,00	—	5,00
Acide citrique	10,00	10,00	40,00	10,00	—	10,00
Acide malique	10,00	10,00	40,00	10,00	—	10,00
Acide fumarique	10,00	10,00	40,00	10,00	—	10,00
Sequestrène 330 Fe	28,00	—	28,00	—	28,00	28,00
Fer-EDTA, 10 <sup>-2</sup> M	—	10 ml	—	10 ml	—	—
N-Z amine	125,00	125,00	250,00	125,00	—	500,00
Lait de coco	10 ml	—	20 ml	—	—	—
<i>Régulateurs de croissance</i>						
2,4 D	0,2	0,1	0,2	0,2	2,0	0,5
Zéatine	0,5	0,2	0,5	0,5	—	—
Zéatine riboside	—	—	—	—	—	0,1
A.N.A.	1,0	1,0	1,0	1,0	—	—
pH	5,7/NaOH	5,7/NaOH	5,6/NaOH	5,7/NaOH	5,5/NaOH	5,6/NaOH

## 5. Conclusion

Le milieu définitivement retenu est le milieu K<sub>795</sub> (tabl. 3b).

Le pH est de 5,7, ajusté par NaOH, puis le milieu est stérilisé par filtration.

Appelé K<sub>795</sub>, ce milieu est très proche de celui utilisé par KAO & MICHAYLUK (1980) pour la culture de protoplastes de *M. sativa*. Il est modifié par sa concentration en glucose, 110,4 g/l au lieu de 68,4 g/l et l'absence de lait de coco.

A l'exception de 2 clones mâles stériles la majorité des génotypes testés produisent au moins quelques divisions sur le milieu K<sub>795</sub>.

## D. Conduite de la culture des protoplastes

### 1. Environnement physique et mode de mise en culture

Trois modes de mise en culture ont été testés : le film liquide simple, le film liquide sur milieu solide, les gouttelettes (tabl. 4). Bien que la technique de film liquide sur milieu solide avec un papier filtre intermédiaire utilisée par DOS SANTOS *et al.* (1980) et ARCIONI *et al.* (1982) donne de bons résultats, la culture en film liquide simple, à une densité de 50 000 protoplastes par ml a été préférée. Elle permet, en effet, un bon suivi visuel des cultures.

La suspension de protoplastes est répartie à raison

de 3 ml par boîte de 5 cm de diamètre. Les boîtes sont scellées au parafilm.

### 2. Entretien de la culture

Pour initier la culture 3 températures : 22 °C, 25 °C et 28 °C ont été testées. La température de 28 °C a été retenue pour conduire à un meilleur taux de division.

Sous une lumière continue (1 500 lux) ou sous une photopériode de 16 h les divisions apparaissent dès le 3<sup>e</sup> jour mais leur rythme ralentit après 8 jours jusqu'à s'arrêter vers le 15<sup>e</sup> jour. Par contre, lorsque les cultures sont placées à l'obscurité totale les premières divisions n'apparaissent qu'à partir du 5<sup>e</sup> jour mais se poursuivent régulièrement à raison d'une division tous les 2 jours environ. L'obscurité totale est donc préférable pour les premières étapes de la culture.

KAO & MICHAYLUK (1980) ont montré qu'il était nécessaire d'apporter du milieu frais aux cultures tout en diminuant progressivement la pression osmotique. Cette opération est réalisée ici avec un mélange du milieu K<sub>795</sub> et d'un milieu de culture cellulaire (K<sub>4</sub> : KAO & MICHAYLUK, 1975) différant de K<sub>795</sub> par la concentration de glucose (10 g/l), de saccharose (20 g/l), de 2,4 D (0,1 mg/l) et de zéatine (0,2 mg/l).

La date et la composition du milieu de la première dilution sont particulièrement importantes (tabl. 5). Les cultures sont entretenues par la suite par apport d'un ml de milieu frais tous les 7 jours selon la séquence : K<sub>795</sub>, FM (3 vol. K<sub>795</sub>/1 vol. K<sub>4</sub>), FM, FM<sub>2</sub> (1 vol. K<sub>795</sub>/1 vol. K<sub>4</sub>), FM<sub>2</sub>, FM<sub>2</sub>. Dans le même temps, les cultures sont exposées graduellement à la lumière à partir du 10<sup>e</sup> jour jusqu'à ce que l'intensité atteigne 2 000 lux.

Après 28 jours de culture on observe 2 types de

TABLEAU 4

*Effets de la densité et du mode de mise en culture sur la division des protoplastes et l'évolution des cultures.*  
*Effects of density and culture method on protoplast division and culture development.*

Densité/ml <sup>1</sup>					
Mode de mise en culture		10 000 protoplastes	30 000	50 000	100 000
Film liquide simple		Les protoplastes survivent, certains reforment une paroi. Aucune division.	Reconstitution des parois. Quelques divisions initiales puis arrêt des divisions.	Divisions continues puis formation de cals et d'embryons (1).	Nombreuses divisions mais qui s'arrêtent très rapidement. Apparition d'un dépôt brun entraînant la mort des cellules en quelques jours (2).
Film liquide sur milieu solide	avec papier filtre	Reconstitution des parois. Très peu de divisions non continues.	Comportement identique	Comportement semblable à (1)	Comportement semblable à (2)
	sans papier filtre	Brunissement et mort des protoplastes avant la reconstitution des parois.		Comportement identique	
Gouttelettes posées ou en suspension.		Un peu d'agglutination. Quelques divisions mais mort rapide des cellules après 8 à 15 j de culture.	Beaucoup d'agglutination. Nécrose des cellules. Pas de divisions.	Les protoplastes se rassemblent au centre et meurent très rapidement.	Comportement identique

*N.B. : Ces résultats sont acquis sur l'ensemble des génotypes testés.*  
*Results obtained for all tested genotypes.*

TABLEAU 5

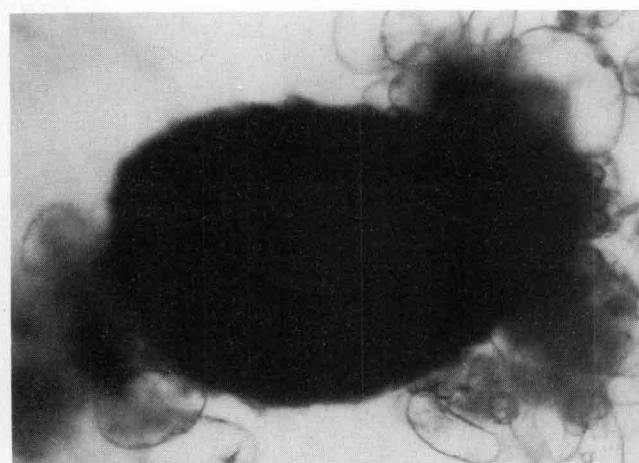
*Evolution des cultures de protoplastes de feuilles de luzerne selon la date et la nature de la première dilution.*  
*Development of alfalfa mesophyll protoplast cultures according to the date and nature of the first dilution.*

Nature du milieu apporté lors de la 1 <sup>re</sup> dilution	Date (t)		
	t < 5 jours	6 jours < t < 8 jours	t < 8 jours
K <sub>795</sub>	Bloquage des divisions puis mort des cellules.	Poursuite des divisions.	Mort des protoplastes.
FM	Brunissement et mort des cellules dans les 48 heures.	Poursuite des divisions mais ralentissement du rythme. Généralement blocage à 6-8 cellules.	Mort des protoplastes.

structures : des cals et des embryons (fig. 1). Le contenu de chaque boîte est alors subdivisé pour permettre le bon développement des cultures.



a)



b)

Figure 1

*Embryon (1a) et cal (1b) obtenus par culture de protoplastes de mésophylle foliaire chez la luzerne.*

*Embryo (1a) and callus (1b) obtained in protoplast culture derived from leaves of alfalfa.*

A partir du 40<sup>e</sup> jour, un milieu de culture de cellules (milieu A), moins riche et sans régulateurs de croissance est ajouté (KAO & MICHAYLUK, 1980). Comme l'a signalé KAO (1980) l'addition à ce milieu de 10 g/l d'amidon est très efficace pour tous les génotypes et favorise la croissance des embryons tout en évitant leur développement précoce en jeunes plantes.

Le milieu A enrichi d'amidon est donc ajouté à raison d'un ml tous les 7 jours jusqu'à ce que les embryons aient atteint la taille d'une graine mature et les cals 1 à 2 mm de diamètre. Le délai est au minimum d'un mois.

### 3. Régénération des plantes

#### a) Culture des embryons

Les embryons sont prélevés individuellement et placés dans des boîtes de Pétri sur un papier filtre stérile imbibé de milieu A sans amidon. Ils sont cultivés à 25 °C sous 3 000 lux. Dès que le système racinaire est suffisamment développé, les jeunes plantes sont repiquées dans un mélange (1/1) de terreau et de vermiculite (fig. 2).

#### b) Culture des cals

Deux séquences de milieu solide induisant la régénération à partir de cals issus d'explants somatiques de *M. sativa* ont été essayées :

— séquence sur milieux de BLAYDES (SAUNDERS & BINGHAM, 1972),

— séquence sur les milieux d'UCHIMIYA & MURASHIGE et de MURASHIGE & SKOOG. Les cals sont placés 28 jours sur le milieu UM d'UCHIMIYA & MURASHIGE (1974) puis transférés sur le milieu MSD<sub>4</sub> de MURASHIGE & SKOOG (1962).

La séquence sur les milieux de BLAYDES est inefficace sur les cals issus de protoplastes. Par contre sur la séquence de milieux UM et MSD<sub>4</sub> on obtient des bourgeons qui, transférés sur milieu de MURASHIGE & SKOOG sans régulateurs de croissance forment des racines. Les plantes ainsi obtenues sont ensuite traitées de la même façon que celles provenant d'embryons.

### III. HYBRIDATION SOMATIQUE

Deux méthodes ont été tentées : la fusion avec le polyéthylène glycol (P.E.G.) et la fusion avec les sels de calcium à pH élevé.



Figure 2  
Jeune plante issue de culture de protoplaste après transplantation.  
Plantlet derived from protoplast culture after transplantation.

### A. Résultats de la fusion avec le P.E.G.

La solution de fusion essayée sur des protoplastes de *M. sativa* et de *M. falcata* purs ou en mélange est composée de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  : 0,01 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 0,7 mM, de saccharose ou de glucose : 0,05 M et de P.E.G. 1540

ou 6000 dans des concentrations variant de 20 à 50 p. 100. Le temps d'incubation varie de 15 à 25 mn.

Les protoplastes supportent le contact avec la solution de P.E.G. mais la mortalité est souvent élevée (tabl. 6).

Le rinçage est effectué soit avec le milieu  $\text{K}_{795}$  soit avec une solution CPW 13 M/Ca comprenant les sels de FREARSON (FREARSON *et al.*, 1973), 0,71 M de mannitol, 0,05 M de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , le pH étant ajusté à 5,8 par NaOH.

L'effet du mode de rinçage apparaît au bout de 8 jours. Les protoplastes rincés avec la solution saline CPW 13 M/Ca brunissent et meurent avant la première division, seuls les protoplastes rincés avec le milieu  $\text{K}_{795}$  se divisent.

Par ailleurs, avec le P.E.G. 1540 les protoplastes s'agglutinent mais ne fusionnent pas ; avec le P.E.G. 6000 les protoplastes ne fusionnent que si la concentration en P.E.G. est supérieure à 20 p. 100. A partir de 30 p. 100 de P.E.G. 6000 la fusion se produit mais la mortalité est élevée (tabl. 6).

Le contrôle cytologique du taux de fusion après fixation (MAGNIEN, 1981) et coloration par la réaction de FEULGEN permet d'évaluer à 20 p. 100 le total des auto et des allofusions avec 30 p. 100 de P.E.G. 6000 pendant 15 ou 20 mn. Cependant l'évolution des cultures s'arrête au stade 6 à 8 cellules et aucune plante n'a pu être obtenue à la suite de ce mode de traitement. Des tentatives de fusion en tube, technique permettant de mieux éliminer le P.E.G. que la technique en gouttelettes (KAO & MICHAYLUK, 1974) précédemment utilisée, ainsi que des tests sur la nature du sucre dans la solution de fusion n'ont pas permis d'améliorer ce résultat.

Par ailleurs, il est à noter que l'effet néfaste du P.E.G. se manifeste plus rapidement sur les cultures de *M. sativa* que sur les cultures de *M. falcata*.

TABLEAU 6

Etat des protoplastes 24 h après la fusion selon le temps d'incubation et la concentration en P.E.G.  
State of protoplasts 24 h after fusion according to incubation time and polyethylene glycol.

Temps d'incubation	Concentration en PEG 1540	20 %	30 %	50 %	
	15 mn	Vivants	Vivants	Vivants mais en mauvais état. Chloroplastes regroupés autour du noyau.	
	20 mn	Vivants	Taux de mortalité : fort.	Quelques survivants en mauvais état.	
	25 mn	Taux de mortalité : fort.	Morts.	Morts.	
Temps d'incubation	Concentration en PEG 6000	20 %	30 %	35 %	50 %
	15 mn	Vivants.	Taux de mortalité : moyen.	Taux de mortalité : moyen.	Morts
	20 mn	Vivants.	Taux de mortalité : moyen. Survivants en mauvais état.	Taux de mortalité : fort.	Non testé.
	25 mn	Taux de mortalité : moyen.	Morts.	Morts.	Non testé.

PEG 1540 : polyéthylène glycol de poids moléculaire 1540.  
PEG 6000 : polyéthylène glycol de poids moléculaire 6000.



## B. Résultat de la fusion utilisant le chlorure de calcium à pH élevé

La méthode utilisant les sels de calcium à pH élevé mise au point par KELLER & MELCHERS (1973) est rarement employée car elle conduit à des taux de fusion généralement faibles.

Chez *Medicago* la fusion au chlorure de calcium a été pratiquée en tubes. Les protoplastes sont concentrés dans le milieu  $K_{795}$  à 500 000 protoplastes par ml puis répartis dans les tubes à raison de 1 ml par tube et de 2 ml de solution de fusion (0,112 M de  $CaCl_2$ , 2  $H_2O$ , 0,5 M de mannitol dissous dans du tampon glycine 0,05 M à pH = 10,4 ; d'après KELLER & MELCHERS, 1973). Les tubes sont placés à 32 °C ou 37 °C pendant 10 à 20 mn. Les préparations sont ensuite centrifugées à 60 g pendant 5 mn, le surnageant est ôté et les protoplastes sont rincés 2 fois avec le milieu  $K_{795}$  ou la solution CPW 13 M/Ca. Ils sont ensuite mis en culture dans le milieu  $K_{795}$ . Pour les génotypes de *M. sativa* et *M. falcata*, ce traitement n'entraîne pas un taux de mortalité plus élevé que dans les cultures sans fusion. Par contre, le taux de fusion est assez faible, 5 à 10 p. 100 et aucune augmentation n'a pu être obtenue par la modification de divers facteurs (température, durée d'incubation, concentration en calcium de la solution de fusion). La solution initiale a donc été conservée et la durée d'incubation fixée à 15 mn à 32 °C. Les protoplastes ainsi obtenus sont en bon état et aptes à se diviser.

Le choix de la solution de rinçage est important car il permet de limiter l'agglutination des protoplastes après la fusion. Un premier rinçage avec la solution saline CPW 13 M/Ca et un deuxième avec le milieu de culture  $K_{795}$  constituent le traitement le plus approprié.

Une conséquence de ce mode de fusion est un retard à la première division : dans les cultures ayant subi le traitement de fusion au calcium, les divisions n'apparaissent qu'au 7<sup>e</sup> ou 8<sup>e</sup> jour, ce qui représente 2 à 3 jours de retard par rapport à une évolution normale de la culture.

Par contre et contrairement au traitement avec le P.E.G., il est possible d'obtenir des plantes entières à partir des populations de protoplastes ayant subi une opération de fusion au calcium à pH élevé, et conduites ensuite selon le mode de culture exposé précédemment. Il a été montré que certaines d'entre elles résultaient de la fusion entre les 2 génotypes parentaux (TÉOULÉ, 1983a, 1983b) (fig. 3).

## IV. DISCUSSION

Plusieurs points peuvent être dégagés. Ils concernent la diversification des génotypes susceptibles de régénérer des plantes après culture de protoplastes de *M. sativa*, l'obtention de régénérations à partir de protoplastes de *M. falcata* et la mise au point d'une méthode d'hybridation somatique entre 2 espèces du genre *Medicago*.

La méthode de culture de protoplastes sans opération de fusion présentée ici dérive assez directement de celle décrite par KAO & MICHAYLUK (1980). La différence essentielle porte sur le prétraitement des plantes : le passage en photopériode courte avant l'isolement

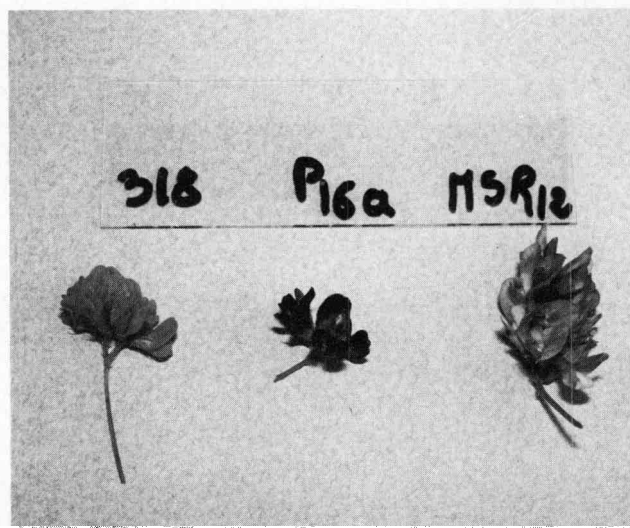


Figure 3

Inflorescence des 2 génotypes parentaux et d'un hybride somatique régénéré après l'opération de fusion au  $CaCl_2$ .

318 : Génotype parental *Medicago falcata*.

MSR 12 : Génotype parental *Medicago sativa*.

P 16a : Hybride somatique issu de la fusion entre 318 et MSR 12.

Inflorescences of the 2 parents and one somatic hybrid derived from fusion experiment with  $CaCl_2$ .

318 : *Medicago falcata* parental genotype.

MSR 12 : *Medicago sativa* parental genotype.

P 16a : Somatic hybrid between 318 et MSR 12.

des protoplastes est très bénéfique, même sur des plantes adultes dans la mesure où l'on prélève les jeunes feuilles. Elle présente l'avantage d'être adaptée à diverses origines génétiques de *M. sativa* puisque des plantes ont pu être obtenues à partir de génotypes des cultivars Europe et Verneuil et de la population chinoise.

Ces résultats qui s'ajoutent à ceux précédemment décrits dans la littérature (KAO & MICHAYLUK, 1980 ; JOHNSON *et al.*, 1981 ; DOS SANTOS *et al.*, 1980 ; ARCIONI *et al.*, 1982 ; ATANOSSOV & BROWN, 1983), montrent que *M. sativa* est certainement parmi les Légumineuses l'espèce chez laquelle la culture de protoplastes est actuellement la mieux maîtrisée. En effet, compte tenu de la forte variabilité génétique intraspécifique et même intra-cultivar, il est évident que l'ensemble des régénérations décrites porte sur des génotypes très divers. Cet aspect est d'ores et déjà essentiel pour un objectif d'application en sélection.

Cependant, d'importantes différences de réponses en culture subsistent : certains clones mâles stériles cytoplasmiques ont produit des protoplastes qui ne se sont pas divisés, d'autres clones ou populations ont produit des cals non morphogènes. Les travaux de KAO & MICHAYLUK (1980) aboutissent à la même conclusion : au sein d'un même cultivar et entre 8 plantes l'efficacité d'étalement varie de 0 à 70 p. 100 et la formation d'embryons de 0 à plus de 50 p. 100. Les différences individuelles dans une même population sont d'amplitude variable. Ainsi elles sont presque nulles au sein de la population chinoise qui donne toujours de bons résultats, mais très marquées dans les populations Provence et Flamande où, selon les individus, le taux de division des protoplastes varie de 0 à 40 p. 100. Toutefois, aucune raison ne permet de penser que la

base génétique des 2 dernières populations soit plus large que celle de la population chinoise.

Dans l'état actuel des objectifs d'utilisation en sélection, la spécificité génétique n'est pas un facteur limitant puisqu'il a été montré que des origines très différentes étaient susceptibles de conduire à des régénérations. Si toutefois l'utilisation de génotypes particuliers et pour lesquels la technique serait inadaptée s'avérait indispensable, il serait nécessaire de procéder à des ajustements plus spécifiques.

Par ailleurs, des régénérations ont aussi été obtenues avec la même méthode à partir de culture de protoplastes de *Medicago falcata*. Ce résultat, qui n'avait pas encore été établi est, lui aussi, important pour l'introduction des cultures de protoplastes dans les schémas de sélection.

Cependant la seule régénération de plantes après culture de protoplastes ne constitue pas en soi une étape suffisante pour une application pratique. Il est en effet nécessaire de maîtriser également la technique de fusion. C'est pourquoi le résultat le plus important de l'expérimentation est certainement l'obtention de plantes viables après l'opération de fusion somatique par le chlorure de calcium. Une quarantaine de plantes ont été obtenues après la confrontation des protoplastes d'un clone mâle stérile cytoplasmique de *M. sativa* et d'un clone de *M. falcata*. Pour certaines d'entre elles la preuve d'une hybridation totale, au moins au niveau nucléaire a été apportée. D'autres plantes résultent de fusions partielles. Une plante issue d'autofusion de *M. falcata* a aussi été régénérée (TÉOULÉ, 1983a, 1983b). L'ensemble des plantes fait actuellement l'objet d'analyses génétiques.

## V. CONCLUSION

D'après les présents résultats, ceux de KAO & MICHAYLUK (1980), DOS SANTOS *et al.* (1980), JOHNSON *et al.* (1981), LU *et al.* (1982), ARCIONI *et al.* (1982), 4 espèces du genre *Medicago* : *M. sativa*, *M. falcata*, *M. coerulea* et *M. glutinosa* peuvent être utilisées en culture de protoplastes et régénérer des plantes. De plus, chez *Medicago sativa*, les origines génétiques peuvent être diversifiées.

Par ailleurs, la mise au point d'une technique de fusion de protoplastes ouvre la possibilité d'obtenir des hybrides somatiques interspécifiques.

Pour la sélection de la luzerne, qui s'est effectuée jusqu'à maintenant essentiellement par la voie intraspécifique, l'hybridation somatique constitue une possibilité nouvelle et intéressante au plan agronomique. Le genre *Medicago* comprend en effet de très nombreuses espèces de caractéristiques agronomiques et physiologiques très variées. L'objectif est donc d'étendre les expérimentations d'hybridation somatique à d'autres espèces et en particulier à des formes diploïdes spontanées pour restituer l'état tétraploïde dans les produits de fusion.

Reçu le 4 août 1986.

Accepté le 14 mai 1987.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Ministère de l'Agriculture, l'A.C.V.F. et l'A.D.A.R. pour le soutien de cette recherche.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahuja P. S., Hadiuzzaman S., Davey M. R., Cocking E. C., 1983. Prolific plant regeneration from protoplast-derived tissues of *Lotus corniculatus* L. (Birdsfoot Trefoil). *Plant Cell Reports*, **2**, 101-104.
- Arcioni S., Mariotti D., 1983. Tissue culture and plant regeneration in *Onobrychis viciaefolia* Scop. *Z. Pflanzenzüchtg.*, **90**, 3, 192-197.
- Arcioni S., Davey M. R., Dos Santos A. V. P., Cocking E. C., 1982. Somatic embryogenesis in tissues from mesophyll and cell suspension protoplasts of *Medicago coerulea* and *Medicago glutinosa*. *Z. Pflanzenphysiol.*, **106**, 105-110.
- Atanassov A. I., Brown D. C. W., 1983. Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of alfalfa. In I. Potrykus *et al.* *Protoplasts 83*, Poster proceedings, 6th International Protoplast Symposium, Bâle, 12-16 août 1983, Birkhäuser Verlag.
- Beach K. H., Smith R. R., 1979. Plant regeneration from callus of red and crimson clover. *Plant Science Letters*, **16**, 231-237.
- Bingham E. T., Hursley L. V., Kaatz D. M., Saunders J. W., 1975. Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. *Crop Sci.*, **15**, 719-720.
- Brown D. C. W., Atanassov A., 1985. Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell Tissue and Organ culture*, **4**, 2, 111.
- Frearson E. M., Power J. B., Cocking E. C., 1973. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev. Biol.*, **33**, 130-137.
- Galzy R., Hamoui M., 1980. Induction de l'organogenèse sur des cals de *Vicia faba* minor provenant d'apex. *Can. J. Bot.*, **59**, 203-206.
- Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.*, **50**, 151-158.
- Gresshoff P. M., 1980. *In vitro* culture of white clover : callus, suspension, protoplast culture and plant regeneration. *Bot. Gaz.*, **141** (2), 157-164.
- Grosser J. W., Collins G. B., 1984. Isolation and culture of *Trifolium rubens* protoplasts with whole plant regeneration. *Plant Science Letters*, **37**, 165-170.
- Hartman C. L., Mc Coy T. J., Knous T. R., 1984. Selection of alfalfa (*Medicago sativa*) cell lines and regeneration of plants resistant to the toxin(s) produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*. *Plant Science Letters*, **34**, 183-194.
- Jacobsen H. J., Kisely W., 1984. Induction of somatic embryos in pea, *Pisum sativum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **3** (4), 319-324.
- Johnson L. B., Stuteville D. L., Higgins R. K., Skinner D. Z., 1981. Regeneration of alfalfa plants from protoplast selected Regen. S clones. *Plant Science Letters*, **20**, 297-304.
- Kameya T., Widholm J., 1981. Plant regeneration from hypocotyl sections of *Glycine* species. *Plant Science Letters*, **21**, 289-294.
- Kao K. N., 1977. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean *Nicotiana glauca*. *Molec. gen. Genet.*, **150**, 225-230.
- Kao K. N., Michayluk M. R., 1974. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, **115**, 355-367.
- Kao K. N., Michayluk M. R., 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta*, **126**, 105-110.
- Kao K. N., Michayluk M. R., 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. *Z. Pflanzenphysiol.*, **96**, 135-141.
- Kao K. N., Michayluk M. R., 1981. Embryoid formation in alfalfa cell suspension cultures from different plants. *In vitro*, **17** (7), 645-648.

- Keller W. A., Melchers G.**, 1973. Effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. *Z. Naturforsch.*, **28c**, 737-741.
- Lu D. Y., Davey M. R., Pental D., Cocking E. C.**, 1982. Somatic embryogenesis from protoplasts of seedling cotyledons and roots of *Medicago sativa*. In : A. Fujiwara : *Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. Tokyo, juillet 1982.
- Lu D. Y., Davey M. R., Cocking E. C.**, 1982. Somatic embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Trigonella corniculata* (Leguminosae). *Plant Cell Reports*, **1**, 278-280.
- Lupotto E.**, 1983. Propagation of an embryogenic culture of *Medicago sativa* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, **111**, 95-104.
- Magnien E.**, 1981. *Sensibilité des protoplastes de Nicotiana sp. aux rayonnements ionisants*. Thèse de Doc. Ing., Univ. Paris-Sud, 190 p., 2 pl.
- Malmberg R. L.**, 1979. Regeneration of whole plants from callus culture of diverse genetic lines of *Pisum sativum* L. *Planta*, **146**, 243-244.
- Mariotti O., Pezzotti M., Falistocco E., Arcioni S.**, 1984. Plant regeneration from leaf-derived callus of *Lotus corniculatus* L. cv. Franco. *Genet. Agr.*, **38**, 219-232.
- Mariotti D., Arcioni S., Pezzotti M.**, 1984. Regeneration of *Medicago arborea* L. plants from tissue and protoplast cultures of different organ origin. *Plant Science Letters*, **37**, 149-156.
- MacCoy T. J., Bingham E. T.**, 1977. Regeneration of diploid alfalfa plants from cells grown in suspension culture. *Plant Science Letters*, **10**, 59-66.
- Meijer E. G. M.**, 1982. High frequency plant regeneration from hypocotyl and leaf-derived tissue cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis*. *Physiol. Plant.*, **56**, 381-385.
- Mitten D. H., Sato S. J., Skokut T. A.**, 1984. *In vitro* regenerative potential of alfalfa germplasm sources. *Crop Sci.*, **24**, 943-945.
- Mokhtarzadeh A., Constantin M. J.**, 1978. Plant regeneration from hypocotyl and anther-derived callus of Berseem clover. *Crop Sci.*, **18**, 567-572.
- Murashige T., Skoog F.**, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- Oswald T. H., Smith A. E., Phillips P. V.**, 1977. Callus and plantlet regeneration from cell cultures of ladino clover and soybean. *Physiol. Plant.*, **39**, 129-133.
- Pelletier G., Pelletier A.**, 1971. Culture *in vitro* de tissus de trèfle blanc (*Trifolium repens*) ; variabilité des plantes régénérées. *Ann. Amélior. Plantes*, **21** (2), 221-233.
- Pezzotti M., Arcioni S., Mariotti D.**, 1984. Plant regeneration from mesophyll, root and cell suspension protoplasts of *Medicago sativa* cv. Adriana. *Genet. Agr.*, **38**, 195-208.
- Phillips G. C., Collins G. B.**, 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Sci.*, **19**, 59-64.
- Reisch B., Bingham E. T.**, 1980. The genetic control of bud formation from callus cultures of diploid alfalfa. *Plant Science Letters*, **20**, 71-77.
- Dos Santos A. V. P., Outka D. E., Cocking E. C., Davey M. R.**, 1980. Organogenesis and somatic embryogenesis in tissues derived from leaf protoplasts and leaf explants of *Medicago sativa*. *Z. Pflanzenphysiol.*, **99**, 261-270.
- Saunders J. W., Bingham E. T.**, 1972. Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Sci.*, **12**, 804-808.
- Saunders J. W., Bingham E. T.**, 1975. Growth regulator effects on but initiation in callus cultures of *Medicago sativa*. *Am. J. Bot.*, **62**, 850-855.
- Stuart D. A., Strickland S. G.**, 1984. Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. I. The role of amino acid conditions to the regeneration medium. II. The interaction of amino acids with ammonium. *Plant. Sci. Lett.*, **34**, 165-174, 175-181.
- Téoulé E.**, 1983a. *Hybridation somatique dans le genre Medicago. Mise au point de la technique. Caractéristiques des premières plantes régénérées*. Thèse Docteur-Ingénieur, Université de Paris-Sud, Orsay, 119 p.
- Téoulé E.**, 1983b. Hybridation somatique entre *Medicago sativa* L. et *Medicago falcata*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, Ser. III, **297**, 13-16.
- Uchimiya H., Murashige T.**, 1974. Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells. *Plant Physiol.*, **54**, 936-944.
- Walker K. A., Sato S. J.**, 1981. Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa* : the role of ammonium ion in somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **1**, 109-121.
- Walker K. A., Yu P. C., Sato S. J., Jaworski E. G.**, 1978. The hormonal control of organ formation in callus of *Medicago sativa* L. cultured *in vitro*. *Amer J. Bot.*, **65**, 654-659.
- Walker K. A., Wendeln M. L., Jaworski E. G.**, 1979. Organogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*. The temporal separation of induction processes from differentiation processes. *Plant Science Letters*, **16**, 23-30.
- Xu Z. H., Davey M. R., Cocking E. C.**, 1981. Isolation and sustained division of *Phaseolus aureus* (mung bean) root protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.*, **104**, 289-298.