

# Embryogenèse somatique et organogenèse *in vitro* chez la luzerne : évaluation des potentialités de divers génotypes

Sylvie BIANCHI, Pascal FLAMENT (\*) & Yvette DATTÉE (\*\*)

A.D.A.R.

(\*) Boursier M.R.E.S.

(\*\*) I.N.R.A., Laboratoire d'Amélioration des Plantes, U.A. 115, Université Paris XI Bâtiment 360, F 91405 Orsay Cedex

## RÉSUMÉ

Vingt individus issus de populations ou cultivars tétraploïdes et diploïdes de *Medicago sativa* L. et de l'espèce *Medicago falcata* L. ont été évalués pour leur aptitude à la régénération à partir de cals. Les différences inter- et intra-populations ou cultivars sont très importantes. Les cals issus de 6 génotypes ont permis la régénération de plantes soit par organogenèse (2 génotypes) soit par embryogenèse somatique (4 génotypes).

La qualité et le rendement des embryons somatiques ont été améliorés par l'utilisation d'une nouvelle séquence de milieux (UM-UMo).

Deux génotypes de *M. sativa* tétraploïdes, l'un issu de la population chinoise « Mestnaya », l'autre du cultivar « Europe » ont un potentiel embryogène et de régénération très élevé, nettement supérieur à Regen S utilisé comme témoin.

**Mots clés additionnels :** *Medicago*, culture de tissus

## SUMMARY

*Somatic embryogenesis and organogenesis in alfalfa ; genotypic variation in regeneration ability.*

Twenty genotypes of tetraploid and diploid *Medicago sativa* L. populations or cultivars and of *Medicago falcata* L. were screened for their ability to produce callus and somatic embryos. A high degree of variation was observed between and within populations and cultivars. Regeneration of plants was obtained in 6 genotypes, 2 through organogenesis and 4 through somatic embryogenesis. Quality and yield of somatic embryos were improved by using a new sequence of media (UM-UMo). Two genotypes of tetraploid *M. sativa*, one from a Chinese population (Mestnaya) and the other from cv. « Europe » had a much higher regeneration potential than the Regen S population used as control.

**Additional key words :** *Medicago*, tissue culture.

## I. INTRODUCTION

La luzerne (*Medicago sativa* L.) est, parmi les légumineuses, celle qui a été la plus étudiée en culture *in vitro*. Dès 1964, CLEMENT réussit à régénérer des plantes à partir de cals. En 1972, SAUNDERS & BINGHAM mettent au point une séquence de 2 milieux permettant la néoformation de bourgeons et l'obtention de plantes. Puis BINGHAM *et al.* (1975) obtiennent après 2 cycles de sélection récurrente, une population (Regen S) ayant un taux élevé de plantes aptes à la régénération (67 p. 100). Par la suite, divers auteurs ont décrit l'embryogenèse somatique de plusieurs cultivars de *M. sativa* (LUPOTTO, 1983, NOVAK &

KONECNA, 1982). Il est aussi possible de régénérer des plantes de luzerne à partir de suspensions cellulaires (Mc COY & BINGHAM, 1977) et de protoplastes (KAO & MICHAYLUK, 1980 ; DOS SANTOS *et al.*, 1980). Des hybrides somatiques entre *M. sativa* et *Medicago falcata* L. ont été obtenus par TEOULE (1983).

Le fait le plus marquant rapporté par tous les auteurs est la grande différence d'aptitude à la régénération intra-populations et inter-populations. MITTEN *et al.* (1984) et BROWN & ATANASSOV (1985) ont observé une variabilité génotypique importante parmi un grand nombre de populations américaines et canadiennes testées pour leur aptitude à régénérer *in vitro*. La luzerne *M. sativa*, autotétraploïde et allogame, est hétérozygote et, de ce fait, présente une forte hétéro-

généité génétique inter- et intra-population (ou cultivar).

L'objectif est ici d'évaluer l'aptitude à la régénération de plusieurs génotypes toujours individualisés, provenant de populations ou cultivars tétraploïdes et diploïdes de *M. sativa* et de l'espèce *M. falcata*.

Cette évaluation a pour but d'obtenir un système efficace de régénération et de trouver, notamment parmi les cultivars intéressants du point de vue agronomique, les génotypes les plus performants en culture *in vitro*.

Elle a eu pour préliminaire le choix d'un témoin sélectionné dans la population Regen S. L'aptitude à la régénération de 18 génotypes a alors été testée, par rapport à ce témoin, sur la séquence de milieux définie par BINGHAM *et al.* (1975).

Puis, une autre séquence de milieux a été utilisée et les potentiels embryogènes des 3 meilleurs génotypes ont été comparés.

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les diverses espèces ou origines sont présentées au tableau 1. Les plantes utilisées ont été cultivées en

serre à partir, soit de graines, soit de boutures. Pendant les jours courts la photo-période est maintenue artificiellement à 16 h, par éclairage d'appoint.

Les pétioles sont prélevés sur les dernières et avant-dernières feuilles dépliées avant l'apex, stérilisés à l'hypochlorite de calcium à 7 p. 100 pendant 10 mn et rincés 2 fois à l'eau stérile. Ils sont alors coupés en morceaux d'environ 2 mm et mis en culture dans des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture gélosé. Les cultures sont maintenues à 28 °C, avec une photo-période de 16 h et une intensité lumineuse d'environ 14 W/m<sup>2</sup>.

Les 2 premières séries d'expériences utilisent la séquence décrite par SAUNDERS & BINGHAM (1972) qui comprend un premier milieu d'induction des cals (BII) contenant 2 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D et 2 mg.l<sup>-1</sup> de kinétine puis un milieu de régénération (BOI2Y) sans régulateurs de croissance. Par la suite, les cals sont repiqués sur le milieu BOI2Y tous les mois.

La séquence comprenant le milieu décrit pour le tabac par UCHIMIYA & MURASHIGE (1974) avec 2 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4 D et 0,25 mg.l<sup>-1</sup> de kinétine (UM) suivi du même milieu sans régulateurs de croissance (UMo) a été utilisée par la suite.

Pour les comparaisons du nombre d'embryons sur la séquence de milieux UM-UMo, seuls les cals de

TABLEAU I

*Espèces et provenances utilisées pour les expérimentations.*

*Species, cultivars and populations used for the experiments.*

Espèces et niveaux de ploïdie	Populations ou cultivars	Notation utilisée dans le texte
	Cultivar Europe (b)	E
	Cultivar Regen S (USA) (e)	RS
	Cultivar Verneuil (b)	VN
	Population de Tabriz (Iran) (c)	Tab
<i>M. sativa</i> 2 n = 4 x = 32	Croisement (Ormelong × Orchésienne) × Tuna (c)	11 × 8 4b 11 × 8 3
	Croisement (Ormelong × Orchésienne) (c)	♀ 11 × 10 4
	Croisement (Tuna × Ormelong) (c)	8 × 9
	Population d'Azerbaïdjan (URSS) (a)	124
	Population de Gabès-Souk (Tunisie) (d)	128
	Population de Mestnaya (Chine) (a)	125
<i>M. sativa</i> ssp. <i>coerulea</i> 2 n = 2 x = 16	Population de Transcaucasie (URSS) (c)	D 12
		D 5 × D 15 60
		D 15 × D 53 26 D 17 × D 15 14
<i>M. falcata</i> 2 n = 4 x = 32	Population de Gödollo (Hongrie) (a)	318.2

### Provenances :

(a) SAPF I.N.R.A., Lusignan, France.

(b) Verneuil, obtention UNCAC, France. Europe, obtention Ets DESPREZ, France.

(c) Dr DATTÉE (boutures), France.

(d) Dr DATTÉE (graines), France.

(e) Pr BINGHAM, Madison, USA.

même taille (environ 10 mm) sont repiqués après 1 mois.

Le nombre d'embryons par cal est déterminé sous la loupe binoculaire entre 2 semaines et 2 mois après le repiquage sur le milieu UMo.

Les embryons, détachés des cals, se développent et donnent des plantules qui sont repiquées en terre dans une serre. Pour les observations cytologiques les cals sont fixés dans l'alcool acétique (3/1), déshydratés par une série de bains dans l'alcool et le xylène, puis inclus dans la paraffine. Les coupes sont faites au microtome (10 µm), colorées avec du bleu alcian 8 GX (Labosi) à 1 p. 100 et de la safranine O (Labosi) à 1 p. 100 puis montées dans du baume du Canada. Les lames sont observées au microscope optique.

### III. RÉSULTATS

#### A. Choix d'un génotype témoin chez Regen S

Des différences très marquées ont été observées entre les 12 génotypes de Regen S testés. Elles portent sur la quantité de cals et sur l'aptitude à la régénération (tabl. 2).

Pour 3 génotypes (RS.11, RS.2 et RS.10), aucun signe de morphogenèse n'a jamais été observé, même après plusieurs mois de culture et de repiquages. Ces résultats ont toujours été confirmés lors d'expériences ultérieures.

TABLEAU 2

Aptitude à la régénération à partir de cals des génotypes Regen S.  
Regeneration ability from callus of Regen S genotypes.

Génotype	Callogenèse (1)	Indice de croissance des cals (1)	Morphogenèse (2)
RS-1	90	++++	62
RS-3	87	++++	74
RS-6	80	++++	71
RS-5	58	+++	31
RS-4	49	+++	33
RS-8	46	++	57
RS-11	40	++	0
RS-7	21	++	28
RS-2	19	+	0
RS-12	19	+	16
RS-9	13	+	23
RS-10	12	++	0

N.B. : Effectif entre 100 et 120 explants par génotype.  
100-120 explants for each genotype.

(1) Notations à 28 j sur le milieu BII.

Scored on BII medium after 28 days.

— Callogenèse : % d'explants donnant des cals.

— Callus formation : % of explants forming callus.

— Indice de croissance des cals : + : de 0 à 2,5 mm

— Growth index ++ : de 2,5 à 5 mm

+++ : de 5 à 10 mm

++++ : plus de 10 mm.

(2) Notations après 28 j sur le milieu BO12Y.

Morphogenèse : % des cals donnant des embryons ou des bourgeons.

Scored on BO12Y medium after 28 days.

Morphogenesis : % of callus forming embryos or buds.

Environ 70 p. 100 des cals issus des génotypes RS.1, RS.3 et RS.6 sont morphogènes et ont une vitesse de croissance élevée.

La taille des cals n'est pas liée à l'aptitude à régénérer : des cals de taille moyenne (RS.11, RS.10) ne produisent aucune néoformation alors que des cals de petite taille (RS.9, RS.12) peuvent donner des taux de différenciation de l'ordre de 20 p. 100.

La plante RS.3 a été choisie comme témoin dans la suite des expériences pour sa bonne aptitude à la morphogenèse.

#### B. Comparaison de divers génotypes : aptitudes à l'embryogenèse somatique et à l'organogenèse

Les résultats concernant l'aptitude à la régénération des 19 génotypes mis en comparaison sont donnés dans le tableau 3.

TABLEAU 3

Comportement en culture de tissus des différents génotypes.  
Callus production and regeneration efficiency of different genotypes.

Génotype	% d'explants donnant des cals	Indice de croissance des cals (a)	Régénération (a) (c)	
RS-3	84	+++	E, P	70
VN-1	56	++	B	0
VN-3	62	++	B	0
Tab 131	62	++		0
Tab 71	38	+	C	0
11 × 8 4b	67	++	B	0
11 × 8 3	65	++	B	0
♀ 11 × 10 4	54	++	B	0
8 × 9	39	+	C	0
124-4	31	+	C	0
124-9	48	+	C	0
128-1	53	+	C	0
125-1	91	+++	E, P	86
125-2	85	+++	E, P	72
D 12	13	0	C	0
D 5 × D 15 60	30	+	B, P	8
D 15 × D 53 26	18	0	C	0
D 17 × D 15 14	15	0	C	0
318-2	43	++	B, P	27

N.B. : Nombre d'explants = 400.

400 explants for each genotype.

(a) Indice de croissance des cals : + : de 2 à 5 mm

Callus growth index ++ : de 5 à 10 mm

+++ : plus de 10 mm.

(b) E : embryons, P : plantes ; B : bourgeons, C : cals.

(c) % de cals produisant des plantes après 2 mois sur le milieu BO12Y = potentiel de régénération.

% of callus-producing plants after 2 months on BO12Y medium = regeneration potential.

Les différences entre les génotypes portent sur la callogenèse et sur la régénération. Tous les cals sont compacts sauf ceux issus des génotypes 125.1, 125.2, RS.3 et 318.2 dont les cals sont friables et à croissance rapide. Ce type de cals favorise d'ailleurs, chez ces 4 génotypes tétraploïdes, la régénération de plantes. Chez les génotypes diploïdes testés, la callogenèse est

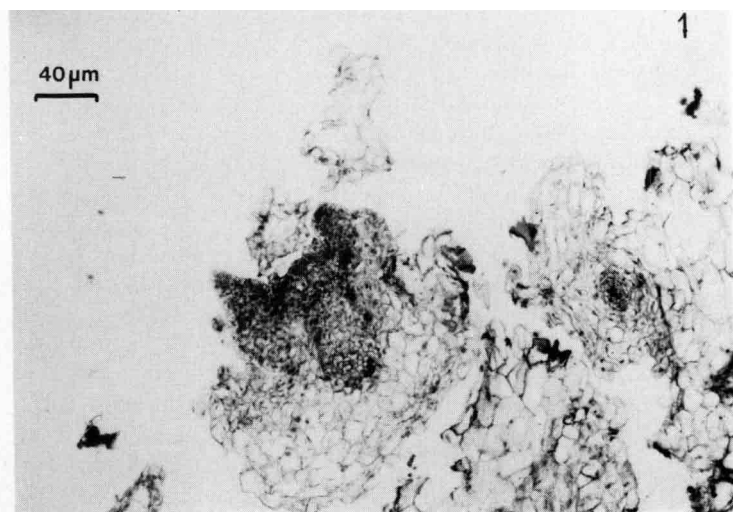


Figure 1  
Coupe histologique d'un cal organogène avec méristème caulinaire.  
Section of an organogenic callus with shoot primordia.

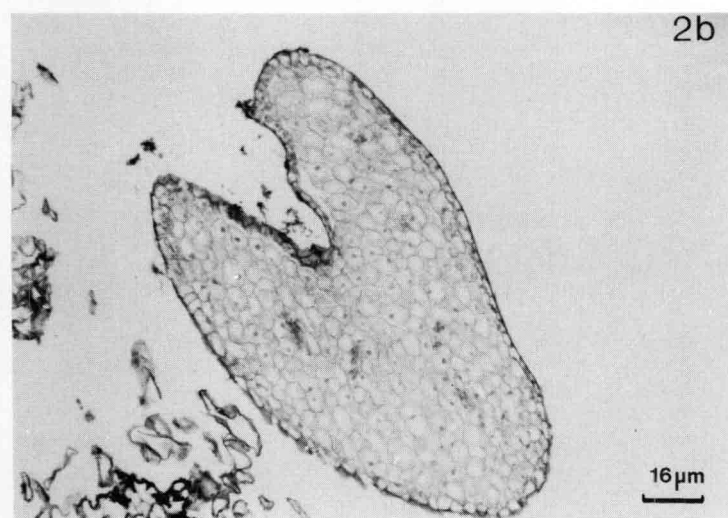
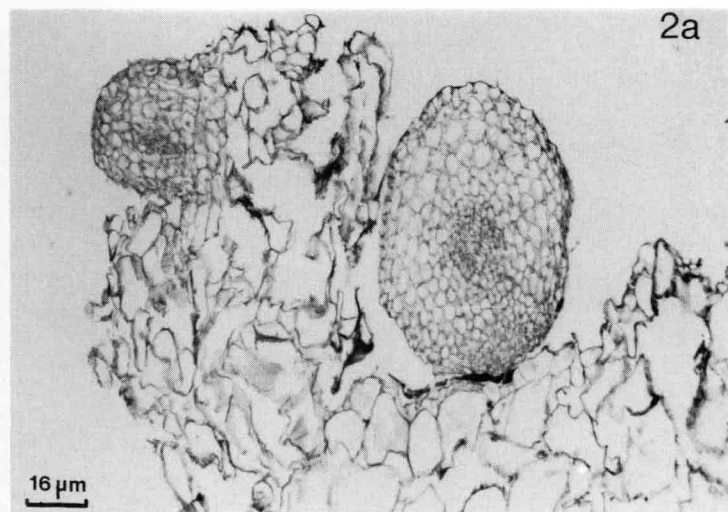


Figure 2  
Coupes histologiques de cals embryogènes :  
a. embryons globulaires,  
b. embryon au stade cœur.  
Sections of embryos from embryogenic calli :  
a. globular embryos,  
b. heart-shaped embryo.

très réduite. Il n'a été possible de régénérer des plantes qu'à partir des cals issus de la plante D 5 × D 15 60.

La régénération de plantes peut se faire selon 2 voies exclusives dans les conditions testées : l'organogénèse ou l'embryogénèse somatique. Lors du processus organogénétique — observé sur les génotypes 318.2 et D 5 × D 15 60 — des massifs cellulaires d'un vert intense apparaissent à la surface des cals. Ils marquent un début d'organisation des cellules du cal en méristèmes (fig. 1). L'apparition séquentielle de bourgeons puis de tiges est ensuite observée : les premières feuilles sont trifoliolées, les racines et les tiges sont séparées par une masse de cal. 246 plantes ont ainsi été obtenues à partir du génotype 318.2 et 28 plantes à partir du génotype D 5 × D 15 60.

Les cals issus de RS.3, 125.1 et 125.2 ont permis l'obtention de plantes par embryogénèse somatique. Des excroissances blanchâtres et globulaires apparaissent à la surface des cals. Elles deviennent, par la suite, denses et très vertes puis se détachent très facilement du cal : il s'agit d'embryons avec un pôle racinaire et un pôle caulinaire.

Les coupes histologiques de ces embryons somatiques montrent qu'ils ont une structure semblable à celle des embryons zygotiques (fig. 2a et 2b). Plusieurs centaines d'embryons peuvent ainsi être obtenues sur un seul cal. Parmi les plantes testées, le génotype 125.1 surpasse tous les autres pour l'aptitude à la régénération en présentant un taux de développement d'embryons somatiques nettement plus élevé que RS.3.

La séquence de milieu UM-UMo, testée après les 2 premières expériences, a permis d'améliorer la qualité et la quantité des cals et surtout le rendement en embryons somatiques. De plus, sur cette séquence, les cals produisent un plus grand nombre d'embryons en un temps plus court : environ 5 semaines alors qu'il faut plus de 2 mois lorsque l'on utilise la séquence BII-BOI2Y.

Ces embryons sont mieux conformés que ceux obtenus sur la séquence BII-BOI2Y : les embryons à plusieurs cotylédons ou présentant des excroissances nombreuses sont rares.

A partir de génotypes très performants, les embryons peuvent apparaître directement sur le milieu UM sans repiquage sur UMo.

En comparant sur cette séquence de milieu plusieurs individus du cultivar « Europe » pour leur aptitude à l'embryogénèse somatique, une plante E1, a été sélectionnée. La comparaison des potentiels embryogènes des génotypes RS.3, 125.1 et E1 montre que E1 est meilleure que RS.3 et très proche de 125.1 (tabl. 4). Le nombre d'embryons par cal est variable chez les 3 génotypes. Certains cals issus de RS.3 ne produisent pas d'embryons. Les écarts types sont assez importants, les cultures de E1 seraient plus homogènes mais le nombre moyen d'embryons reste plus élevé chez 125.1.

#### IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

Les présents résultats sur la formation des cals et l'embryogénèse somatique sont comparables à ceux

TABLEAU 4  
 Comparaison des potentiels embryogènes  
 de trois géotypes de luzerne.  
 Comparison of the embryogenic potential  
 of 3 alfalfa genotypes.

Géno- type	Nombre de calcs observés	Nombre d'embryons par cal Minimum Maximum	Nombre total d'embryons	Nombre moyen d'embryons par cal ± écart type
RS 3	50	0 47	1 066	21 ± 15
125.1	49	3 118	3 517	72 ± 30
E1	49	7 93	2 802	57 ± 21

N.B. : Séquence de milieux UM-UMo.

Première observation 15 jours après repiquage sur UMo puis régulièrement pendant 2 mois.

Sequence of media UM-UMo.

First observation after 15 days on UMo, then regularly for 2 months.

publiés en culture de tissus de luzerne (BINGHAM *et al.*, 1975 ; LUPOTTO, 1983 ; MITTEN *et al.*, 1984 ; BROWN & ATANASSOV, 1985) : la structure des calcs et la fréquence de formation des embryons sont fortement influencées par le géotype de la plante. Les plantes étudiées ici sont d'origines diverses diploïdes et tétraploïdes de *M. sativa* et de *M. falcata*. Seuls 6 géotypes sur 19 ont permis la régénération de plantes à partir des calcs. La quantité de calcs n'a pas d'incidence sur la capacité à régénérer alors que la qualité des calcs a une grande importance : les calcs friables à croissance rapide sont les plus aptes à régénérer.

Des taux élevés d'embryogenèse somatique ont été obtenus sur les géotypes 125.1 d'une part et sur E1, issu du cultivar le plus cultivé en France (« Europe »), d'autre part.

Comme l'ont suggéré BINGHAM *et al.* (1975) et BROWN & ATANASSOV (1985), il semble possible de régénérer des plantes à partir de n'importe quelle population, sans sélection préalable, à condition de tester un nombre suffisant de plantes. Ainsi, BROWN & ATANASSOV (1985), à la suite d'essais extensifs sur des *Medicago* de toutes origines, observent 34 p. 100 de plantes aptes à produire des calcs qui régénèrent. Ils en concluent une supériorité en culture *in vitro* de plantes d'une même origine géographique himalayenne (Ladak-Tibet) et des types à racines fasciculées comme *M. falcata*. Leur meilleur cultivar, « Rangelander », est fortement introgressé de *M. falcata* et ses fleurs sont bigarrées.

Le géotype 125.1, détecté ici comme le plus performant, est une *M. sativa* pure à fleurs violettes, tiges dressées et racines pivotantes. Toutefois, la population 125 porte le nom de « Mestnaya » ; elle est, d'après SINSKAYA (1961), d'origine asiatique, et donc peut-être proche de l'origine Ladak-Tibet. La popula-

tion « Europe » n'est constituée que de *M. sativa* de type flamand, donc légèrement introgressée de *M. falcata*, tout comme la population Regen S, qui elle, a été sélectionnée par BINGHAM *et al.* (1975) pour l'aptitude à la régénération en culture *in vitro*.

Les résultats obtenus sur le seul géotype de *M. falcata* étudié ici (318.2) semblent montrer, qu'en effet, *M. falcata* est une espèce qui généralement se cultive bien *in vitro*. Toutefois, il faut souligner que ce géotype est tétraploïde et que, lors d'expériences préliminaires, aucun signe de régénération n'a été observé sur les calcs obtenus à partir de 2 géotypes de *M. falcata* diploïdes (*M. falcata* ssp. *quasifalcata* et *M. falcata* ssp. *romanica*).

L'efficacité de l'embryogenèse somatique est beaucoup plus grande que celle de l'organogenèse. On peut, en effet, obtenir un nombre très élevé d'embryons et de plantes, en un temps assez court (2 mois), issus d'un même géotype et ayant un âge physiologique proche de celui de plantules issues de graines. Le bouturage est une procédure assez aisée chez la luzerne mais ne fournit pas de matériel équivalent à de jeunes plantules.

Les études génétiques ou physiologiques des interactions entre un géotype hôte et un certain nombre de souches de pathogènes ou de *Rhizobium* peuvent, par exemple, être facilitées car les essais courants nécessitent l'inoculation et l'observation d'un grand nombre de plantules.

Cette technique permet également la multiplication rapide d'une plante intéressante, la conformité par rapport au clone initial restant toutefois à éprouver. La luzerne a d'ailleurs servi de plante modèle pour les études d'enrobages d'embryons somatiques en vue de la production de graines artificielles (K. WALKER, Y. DEMARLY, communications personnelles).

Cette étude a donc permis de trouver des géotypes ayant un très fort potentiel embryogène et de préciser les conditions d'obtention rapide d'embryons et de plantes. Ces géotypes sont actuellement utilisés dans des expériences d'hybridations somatiques avec d'autres espèces éloignées du genre *Medicago* et pour des expériences de transformation par *Agrobacterium rhizogenes* et *Agrobacterium tumefaciens*.

Reçu le 18 mars 1987.

Accepté le 28 octobre 1987.

#### REMERCIEMENTS

Nous exprimons nos remerciements à D. BERGEON et H. FRANÇOIS pour leur aide technique. Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'A.D.A.R. (\*) avec le soutien financier de l'A.C.V.F. (\*\*) et du Ministère de l'Agriculture.

(\*) A.D.A.R. : Association pour le Développement des Applications de la Recherche en amélioration des plantes.

(\*\*) A.C.V.F. : Association des Créateurs de Variétés Fourragères.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bingham E. T., Hurley L. V., Kaatz D. M., Saunders J. W.**, 1975. Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. *Crop. Sci.*, 12, 719-721.
- Brown D. C. W., Atanassov A.**, 1985. Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 4, 111-122.
- Clement W. M.**, 1964. Stability of chromosome numbers in tissue cultures of alfalfa *Medicago sativa*. *Amer. J. Bot.*, 51, 570.
- 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.
- Kao K. N., Michayluk M. R.**, 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. *Z. Pflanzenphysiol.*, 96, 135-141.
- Lupotto E.**, 1983. Propagation of an embryogenic culture of *Medicago sativa* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 111, 95-104.
- Mc Coy T. J., Bingham E. T.**, 1977. Regeneration of diploid alfalfa plants from cells grown in suspension culture. *Plant Sci. Lett.*, 10, 59-66.
- Mitten D. H., Sato S. J., Skokut T. A.**, 1984. *In vitro* regenerative potential of alfalfa germplasm sources. *Crop Sci.*, 24, 943-945.
- Novak F. J., Konecna D.**, 1982. Somatic embryogenesis in callus and cell suspension cultures of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Z. Pflanzenphysiol.*, 105, 279-284.
- Saunders J. W., Bingham E. T.**, 1972. Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Sci.*, 12, 804-808.
- Sinskaya E. N.**, 1961. *Medicago*. In « *Flora of cultivated plants of the USSR* ». Tome XIII : Perennial Leguminous Plants, 22-249, 326-343.
- Teoule E.**, 1983. Hybridation somatique entre *Medicago sativa* L. et *Medicago falcata*. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sér. 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.