

***In vitro* micropropagation of local alfalfa *Medicago sativa* L. Gabsi.**

Micropropagation *in vitro* de la luzerne locale *Medicago sativa* L. Gabsi.

R. LAAMARI^{1,3}, M. MARS¹, M.P.S. FEVEREIRO², A. FERCHICH³

¹ Aridoculture and oases cropping laboratory , arid area institute (IRA) Medenine Tunisia.

² Institute of chemical and biological technology (ITQB), 2780 Oeiras, Portugal.

³ National Agronomic Institute of Tunisia (INAT) 43, Av. Charles Nicole, 1082 Tunis, Tunisia.

*Corresponding author: ramroumam@yahoo.fr

Abstract - In order to find an appropriate media enabling the *in vitro* regeneration of a whole plant of *M. sativa* L. Gabsi through micropropagation using leaf explants (cotyledon), we tested three different shoots developing media with three cytokinins: zeatin (Z), BA and TDZ on two different provenances of local *M. sativa* L. Gabsi 2 and 19. Secondly two different roots developing media, MS and MS / 2, were tested on the newly formed shoots. The medium Z, although it doesn't always gave the best response rate, he gave the well developed shoots (up to 10 mm for *M. sativa* L. 19) with the lower vitrification rate (53, 12% for *M. sativa* L. 19). The MS medium doesn't enable root formation on shoots grown on media Z, BA and TDZ while the medium MS / 2 allowed the formation of roots on shoots grown on the Z medium. The best combination of media allowing shoots and roots developing for both provenances of *M. sativa* L. Gabsi is that of Z medium with the MS / 2 medium.

Keywords: Luzerne, *in vitro*, micropropagation, Zeatin, TDZ, BA.

Résumé - Cet article est un essai de régénération *in vitro* de luzerne locale *Medicago sativa* L. Gabsi par la voie de micropropagation. Le but à partir de ce travail est de trouver une combinaison adéquate de milieux de formation de pousses et de racines permettant la régénération *in vitro* d'une plante entière à partir d'un explant de feuilles (cotylédons). Deux provenances de luzerne locale *M. sativa* L. Gabsi, 2 et 19, sur lesquelles on a testé trois milieux différents de formation de pousses avec trois cytokinines : la zeatine (Z), la BA et le TDZ. En deuxième partie deux différents milieux de formation de racines, MS et MS/2, ont été appliqués aux pousses néoformées. Le milieu Z, bien qu'il n'a pas toujours donné la meilleure réponse des explants, il a donné les pousses les plus développées avec le pourcentage de vitrification le plus faible. Le milieu d'enracinement MS n'a permis la formation de racines sur aucunes des pousses cultivés sur les milieux Z, BA et TDZ. Le milieu MS/2 a permis la formation de racines sur les pousses cultivées sur le milieu Z. La meilleure combinaison de milieux assurant la meilleure formation des pousses et des racines pour les deux provenances est celle du milieu Z avec le milieu MS/2.

Mots clés: luzerne, *in vitro*, micropropagation, Zeatine, BA, TDZ.

1. Introduction

La famille des *Fabaceae* (*Leguminosae*), comportant 800 genres et 20.000 espèces (Lewis et al., 2005) est la troisième plus grande famille des plantes à fleurs après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae*. C'est une famille extrêmement diversifiée avec une large distribution mondiale, englobant plusieurs formes de vie, en partant d'herbes alpines et arctiques, arbustes vivaces tempérés jusqu'aux arbres. Le genre *Medicago* L. est composé de 60 espèces (Quiros et Bauchan, 1988) dont la majorité sont annuelles, mais environ un tiers est composé de plantes vivaces, dont la luzerne, quatorze espèces cultivées appartiennent au genre *Medicago*, la luzerne ou *Medicago sativa* L. étant la plus connue. Le complexe *Medicago sativa* se compose des trois sous-espèces *M. sativa* ssp. *Sativa* ; *M. sativa* ssp. *Falcata* ; et *M.*



sativa ssp. glutinosa (Quiros et Bauchan, 1988). La sous-espèce *Sativa* du complexe est caractérisée par des fleurs violettes ou bleues, une racine pivotante, un port dressé, et des gousses en spirale (Whyte et al. 1953). Elle est peu dormante et a une résistance variable au froid. La luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.), est l'une des cultures fourragères les plus importantes dans le monde, cultivée sur plus de 80 millions d'hectares (Michaud et al., 1988 ; Russelle et al. 2001).

A la base, le genre devait être diploïde et les espèces tétraploïdes auraient dérivé d'une non-réduction des gamètes, donnant des plantes très vigoureuses et hétérozygotes capables de s'adapter et de coloniser de nouveaux habitats, permettant ainsi d'accroître l'aire géographique du genre *Medicago* (Quiros et Bauchan, 1988). Le genre *Medicago* est bien représenté en Tunisie, où il constitue un patrimoine génétique extrêmement riche et diversifié. On estime à 50% en moyenne et selon les régions la fréquence des espèces annuelles de *Medicago* dans la végétation spontanée (Seklani, 1991), et à 40% leur fréquence parmi les légumineuses en Tunisie septentrionale (Hassen et al., 1994).

L'amélioration de la qualité, la résistance aux maladies, la productivité et la résistance aux stress abiotiques figurent parmi les principaux objectifs de l'amélioration de la luzerne (*M. sativa* L.). La plupart des réalisations dans le passé ont été obtenues par des méthodes de sélection traditionnelles plutôt que les techniques de génie génétique (Volenc et al., 2002). Plusieurs travaux de régénération de *M. sativa* ont été publiés, la plupart par embryogénèse somatique indirecte, c'est-à-dire en passant par une phase intermédiaire de cal (Barbulova et al., 2002 ; Bingham et al., 1988). Aujourd'hui quelques progrès ont été enregistrés via organogénèse directe ou indirecte, ainsi que par embryogénèse somatique à partir de différents explants de luzerne (Barbulova et al., 2002 ; Gilnmur et al., 1987 ; Liang et al., 2003 ; Tian et al., 2002 ; Zagorska et al., 1997). La plupart de ces travaux restent basés sur un nombre restreint de tissus très adaptés à la culture in vitro, ce qui n'a pas permis de surmonter le problème de la forte dépendance du génotype, commun à un grand nombre de légumineuses . En outre, par rapport aux protocoles de régénération directe, les plantes régénérées à partir de tissus ou d'organes avec formation intermédiaire de cals, ont plus de risque d'avoir subi une variation somaclonale (Loureiro et al., 2007 ; Neves et al., 2001). Plusieurs travaux de régénération directe ont été réalisés, dont ceux de Neves et al.(2001) et Li et al. (2009).

L'objectif, à partir de ce travail, est de réussir la régénération in vitro de *M. sativa* L. Gabsi par la voie de micropropagation.

2. Matériel et Méthodes

Les travaux ont été effectués dans l'Unité de Culture in Vitro du Laboratoire d'Aridocultures et Cultures Oasiennes de l'Institut des Régions Arides (IRA) de Médénine. Les semences de *Medicago sativa* L. Gabsi ont été collectées chez les agriculteurs dans le sud Tunisien. Deux différentes provenances de *Medicago sativa* L. Gabsi ont été choisies pour faire cette étude, à savoir Essayah Benguerdane (provenance 2) et Gannouch (provenance 19).

2.1. Germination des graines et culture des explants

2.1.1. Stérilisation des graines

Le traitement des graines comporte 3 étapes différentes, d'une durée de 5 min chacune, en traitant le matériel successivement avec l'acide sulfurique (H₂SO₄, 96%), puis l'eau de javel (NaOCl) à 50% du produit commercial et enfin l'éthanol à 70% (v/v) ; après chaque étape, le matériel a été rincé cinq fois à l'eau distillée stérile. Toutes ces étapes de désinfection ont eu lieu sous hotte à flux laminaire (*Clean Bench Zticheng*).

L'eau distillée utilisée pour la préparation des solutions désinfectantes et de rinçage, le milieu de culture, ainsi que tout le matériel utilisé (verrerie et les pinces) sont stérilisés à l'autoclave (*pbi international*) à une température de 120 ° C pendant 20 minutes.

2.1.2. Obtention de plantules mères et prélèvement des explants de départ

Le milieu de culture utilisé lors de cette étude est le milieu de base de Murashige & Skoog (1962), codé MS, fréquemment utilisé dans la culture in vitro de plusieurs espèces. Ce milieu est composé de Macroéléments MS, Microéléments MS, Vitamines MS, 30g/l saccharose et 8g/l agar, et le pH du milieu est ajusté à 5,8 avant autoclavage avec une solution de KOH 1N.

Après stérilisation, les graines sont germées dans des boîtes à Pétri contenant 15 ml de milieu MS, maintenues à l'obscurité, à une température de 25 °C. Après 6 à 8 jours les plantules montrant déjà le

développement des cotylédons sont prêtes pour commencer l'expérience. Une fois séparé, chaque cotylédon est coupé pour récupérer la partie basale comprenant le méristème axillaire. Des cotylédons prélevés sur des plantules plus âgées n'ont pas permis la régénération de pousses.

Le protocole de régénération suivi au cours de cette expérience était celui de Neves et al. (2001) avec quelques modifications. Trois régulateurs de croissance sont utilisés : la zéatine (Z, $C_{10}H_{13}N_5O$) à 0.1 mg/l, la benzyladenine (BA, $C_{12}H_{11}N^5$) à 5 mg/l et le thidiazuron (TDZ, $C_9H_8N_4OS$) à 2 mg/l. Les régulateurs de croissance sont ajoutés au milieu de culture MS après autoclavage. Les milieux sont coulés dans les boîtes de Petri sous hotte à flux laminaire vertical (Clean Bench Zticheng) à raison de 15ml / boîte.

Les explants sont ensuite cultivés horizontalement à raison de 10 explants/boîte et 10 boîtes de Petri pour chaque régulateur de croissance et pour chaque provenance (un total de 100 explants par traitement). Les boîtes de Pétri sont scellées avec du Parafilm puis placées pour une durée de 15 à 21 jours dans une chambre de culture sous une photopériode de 16 h ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ appliqué sous forme de lumière blanche fluorescente), à une température de $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, durant toutes les phases de culture.

2.2. croissance et enracinement des pousses

Après 15 à 21 jours sur le milieu initial, des pousses apparaissent. Ces pousses sont diséquées du reste de l'explant puis transférées sur un milieu MS avec 30g/l saccharose et 8g/l agar pendant une semaine pour assurer leur croissance.

Après une semaine sur le milieu de croissance, les pousses sont transférées sur deux milieux différents pour leur enracinement, le milieu MS et MS/2 qui est composé de sels minéraux et vitamines MS dilués de moitié. Les deux sont additionnés de 30 g/l de saccharose et 8g/l d'agar. Les cultures sont maintenues dans la même chambre de culture pendant 15 jours.

Les micro-plantules enracinées sont acclimatées progressivement aux conditions ex vitro. D'abord, la gélose est éliminée de la base des plantules par un lavage avec le milieu de culture liquide MS. Les pousses enracinées sont ensuite transférées dans des gobelets contenant soit de la tourbe soit la tourbe mélangée à de la perlite préalablement stérilisée ($120 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 2 heures). Les parties aériennes des plantes sont abritées par un cache en verre transparent pour essayer de les maintenir dans un environnement qui avoisine 100 % d'humidité relative.

2.3. Analyse des données

La réponse à la régénération des explants testés a été évaluée à la fin de la période expérimentale, en déterminant le nombre de pousses sur chaque milieu et pour chaque provenance, les pourcentages d'explants régénérés, la taille et le nombre de pousses par explant, ainsi que le nombre moyen de pousses ayant donné des plantes entières.

Une analyse de variance (ANOVA), par le logiciel *Infostat* (2016), a été réalisée dans le but de voir l'effet du génotype, du milieu de formation de pousses et celui de racines sur le pourcentage d'explants régénérés.

3. Résultats et discussions

3.1. Formation de pousses

L'analyse de variance, ANOVA, appliquée aux pourcentages de formation de pousses a montré qu'il n'y a pas d'effet du génotype et de milieu sur la formation de pousses (la différence entre les moyennes n'étant pas significative au seuil $\alpha = 0.05$).

3.1.1. Cas de la provenance 19

La taille des pousses de *M. sativa* 19 était la plus importante (figure 1), sachant que la zéatine a toujours favorisé le développement de pousses de taille supérieure à celle des autres cytokinines utilisées.

Le milieu Z, est le plus favorable au développement des pousses, ces dernières étaient bien développées, multiples et avec une longueur moyenne de l'ordre de 10 mm (figure 2).

Le pourcentage de formation de pousses sur ce milieu est de 26.42% ($\pm 3,77$). Pour un nombre moyen de 11 explants par boîte de Pétri, ce milieu a donné un nombre moyen de pousses formées égal à 3. Le milieu BA, est moyen quant à la formation de pousses avec un pourcentage de développement de pousses égal à 22.22% favorisant ainsi le développement de 2 pousses sur une moyenne de 9 explants. Le milieu TDZ, n'a pas été favorable au développement de pousses.

3.1.2. Pour la provenance 2

Le milieu BA était le meilleur en favorisant un pourcentage de formation de pousses égal à 21,81% ($\pm 2,81$) (figure1) correspondant à la formation de 2 à 3 pousses sur un nombre total de 11 explants par boîte. Le milieu Z, était le moins convenable avec un pourcentage de formation de pousses égal à 9,77% ($\pm 1,08$) tandis que le milieu TDZ a été moyen avec un pourcentage de formation de pousses de 18,05% ($\pm 2,91$).

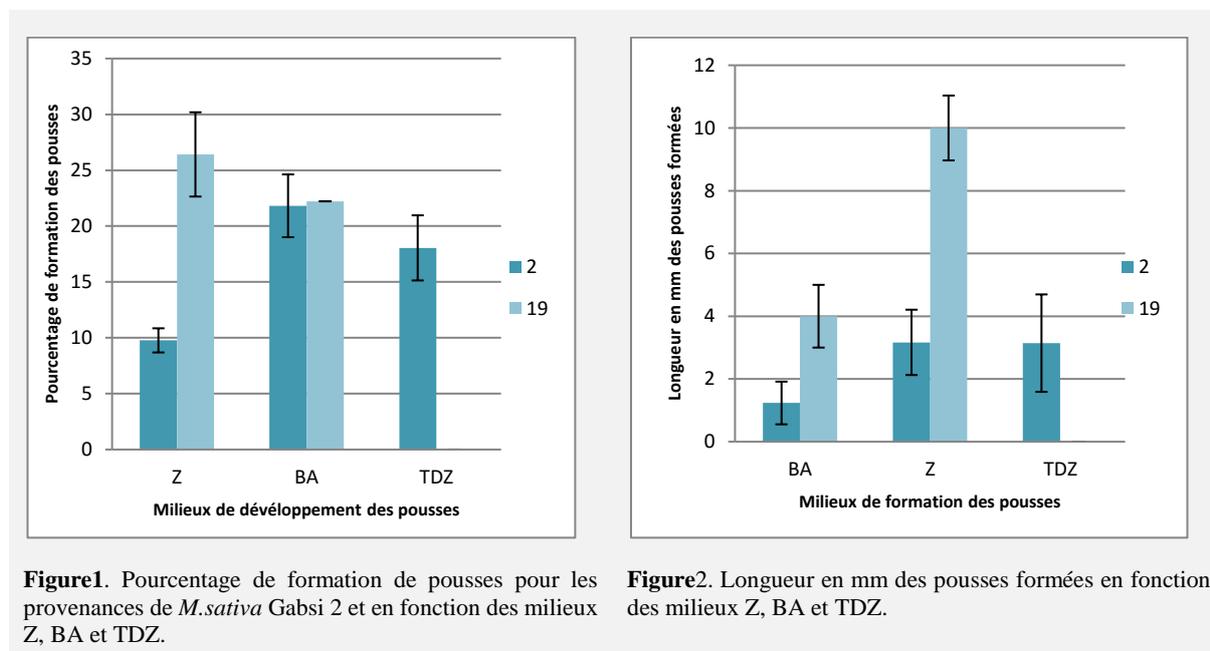


Figure1. Pourcentage de formation de pousses pour les provenances de *M.sativa* Gabsi 2 et en fonction des milieux Z, BA et TDZ.

Figure2. Longueur en mm des pousses formées en fonction des milieux Z, BA et TDZ.

3.2. Formation des racines et régénération

L'analyse de variance appliquée au pourcentage de régénération des explants a montré qu'au seuil $\alpha = 0.05$, la différence entre les moyennes est significative.

Les combinaisons des milieux de formation pousses à ceux de développement des racines ont des effets différents sur la régénération des explants.

3.2.1. Cas de la provenance 19

Pour la provenance de *M.sativa* 19, la meilleure combinaison favorisant la meilleure formation de pousses (vigoureuses et bien développées), et racines et permettant de produire une plante entière est celle du milieu Z avec un milieu MS/2 (figure 3). Cette combinaison de milieux a assuré un pourcentage de formation de racines de 53,12% ($\pm 8,61$). Les autres combinaisons, BA + MS/2 et TDZ+ MS/2, n'ont pas été favorables à l'enracinement. Egalement, le milieu d'enracinement MS n'a pas favorisé le développement des racines combiné avec aucun des trois milieux de régénération (Z, BA ou TDZ).

3.2.2. Cas de la provenance 2

La régénération entière dans le cas de la provenance de *M. Sativa* 2, a été seulement favorisée par la combinaison des milieux Z et MS/2 (figure 3). Bien que le milieu Z n'a pas été assez favorable à la formation de pousses, ces dernières étaient vigoureuses et, sur le milieu MS/2, 65,71 % ($\pm 8,85$) d'entre elles ont réussi à développer des racines et à donner des plantes viables. En revanche, les milieux BA et TDZ combinés avec le milieu MS/2 n'ont pas permis la récupération de plantes entières, tandis que le milieu M1 n'a pas été approprié à la formation des racines indépendamment du milieu sur lequel les pousses.

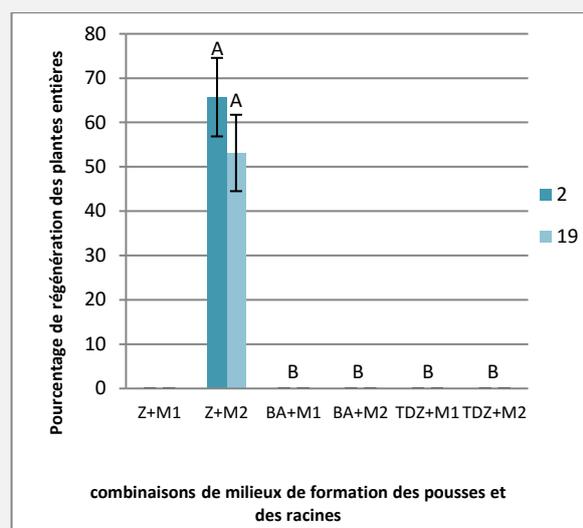


Figure3. Pourcentage de régénération (formation de pousses et racines) en fonction des combinaisons de milieux de formation de pousses et de développement de racines.

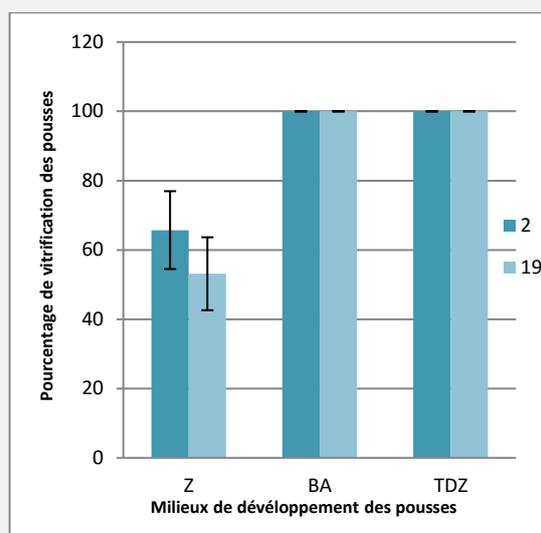


Figure4. Pourcentage de vitrification des pousses en fonction des milieux Z, BA et TDZ.

3.3. Taux de vitrification

Le phénomène de vitrification de pousses est observé chez les deux provenances et pour les différents milieux avec des niveaux variables (figure 4). Pour les deux milieux BA et TDZ, le taux de vitrification est important, il atteint jusqu'à 100% de pousses vitrifiées pour les deux provenances. Pour le milieu Z le taux de vitrification est moins important il est égal à 65,71% ($\pm 11,23$) pour la provenance de *M.sativa* 2 et 53,12% ($\pm 10,52$) pour la provenance 19.

En ce qui concerne l'influence des explants de départ, une étude préliminaire non incluse ici a montré que ce sont les cotylédons qui présentent les meilleures aptitudes à la caulogénèse, puisque les hypocotyles de ces mêmes provenances n'ont pas donné de bons résultats. Les bonnes potentialités caulogènes des cotylédons ont déjà été signalées chez *Medicago truncatula* (Neves et al., 2001). Cependant, des segments d'hypocotyles ont été utilisés avec succès pour induire la caulogénèse auparavant chez *Scorpiurus* (Hamdani, 2001 ; Saadi et Hamdani, 2007) et chez le pois (Malmberg, 1979).

Dans notre étude, nous avons utilisé des cotylédons prélevés sur des embryons matures, ces derniers n'ont pas montré une bonne aptitude à la régénération en donnant avec le milieu Z, 2 explants régénérés sur un total de 9 explants par boîte pour la provenance 19 et 2 pousses régénérés sur 11 pour la provenance 2. Ces cotylédons prélevés d'embryons zygotiques matures se révèlent plus efficaces pour d'autres légumineuses comme le pois (Antassov & Mehandjier, 1979). Il serait judicieux de reprendre l'expérience en utilisant les cotylédons d'embryons zygotiques immatures qui pourraient mieux répondre et apporter des résultats plus probants. D'autres études faites sur le pois (Nadolska et al., 1994), le soja (Tetu, 1989) et trèfles (Keyton & Wayne, 1993) ont prouvé que des embryons zygotiques immatures entiers (ou des parties d'embryons) ont donné de bons résultats.

La composition hormonale du milieu, elle aussi, est un facteur qui a influencé fortement la caulogénèse et la régénération d'une façon générale. Dans notre étude les trois cytokinines appliquées ont des influences à la fois sur le nombre de pousses néoformées et leur qualité. Le nombre de pousses par cotylédon obtenu avec la zeatine bien qu'il n'était pas toujours le plus important ces dernières étaient d'une vigueur importante.

Le TDZ, lui, a une réponse différente. Avec la provenance 19 ce régulateur n'a pas donné de résultats, au contraire avec la provenance 02, ce régulateur était celui qui a donné le plus grand nombre de pousses. Les pousses obtenues sont généralement petites ($< 0,6$ mm), non multiples, vitrifiées et incapables de se reconvertir en plantes.

Le TDZ, qui est une urée de phényle sous-substitué, est déjà connue pour avoir une forte activité cytokinique dans la multiplication des pousses de légumineuses comme l'arachide (Kanyand et al., 1994), le soja (Kaneda et al. 1997), *Vicia narbonensis* (Tegeger et al., 1996), ou le pois d'Angole (Eapens et al. 1998). Dans notre étude, les pousses produites avec le TDZ étaient très petites de telle façon qu'on n'arrive même pas à les isoler à partir de cotylédons en raison de leur hyperhydricité. Les mêmes observations ont été faites chez *M. truncatula* par (Neves et al., 2001).

Un problème récurrent lors des études de régénération *in vitro* de pousses est celui de l'hyperhydricité (anciennement appelée vitrification), et les légumineuses en général sont très susceptibles à ce phénomène qui est fréquemment observé dans la littérature sur les espèces de cette famille (Ochatt et al. 2002). C'est pour cette raison que, indépendamment des résultats de régénération de pousses seuls, il est important d'évaluer aussi la fréquence des phénomènes d'hyperhydricité dans les régénérants puisque ces pousses hyperhydriques (vitrifiées) se sont souvent montrées incapables de développer des racines et de se convertir en plantes par la suite. L'observation du pourcentage de vitrification a montré que 100% des pousses cultivées sur les milieux BA et TDZ étaient vitrifiées, tandis que sur le milieu Z, le pourcentage de vitrification des pousses était en une moyenne de 60%.

Li et al. (2009) ont montré que le changement des méthodes de culture ainsi que la réduction des concentrations de TDZ de 0,05 à 0,025 mg dm⁻³, pourrait considérablement réduire le pourcentage de pousses vitreuses. Kataeva et al. (1991) ont proposé que l'excès de cytokinine peut agir comme des signaux induisant une production excessive d'éthylène, qui, suite à une certaine série de réactions biochimiques conduit à la vitrification. Cependant, Li et al. (2009) ont découvert que l'ajout de 3,0 mg dm⁻³ d'AgNO₃, un puissant inhibiteur de l'action de l'éthylène (Chong et al., 1997), dans le milieu avec les mêmes concentration de TDZ précédemment utilisées, n'avait rien donné quant à la réduction de la vitrification.

Sur cette base, c'est le milieu Z qui s'est révélé le meilleur pour la régénération des deux provenances de *M. sativa* L. Gabsi étudiées.

L'enracinement des pousses est obtenu sur un milieu (MS/2) dont l'efficacité a déjà été signalée par (Tegeger et al., 1996) chez *Medicago sativa*. Notre étude montre que les racines formées dans le milieu MS/2 étaient vigoureuses et courtes. Pour d'autres études faites sur la luzerne les pousses sont transférées sur un milieu MS/2 additionné de différentes concentrations de NAA, entre 0 et 0,5 mg/l (Li et al., 2009). Ce même auteur a trouvé que la fréquence la plus élevée de l'induction des racines (83,3%) a été assurée par immersion de la partie inférieure des pousses dans 1.0 mg dm⁻³ de NAA.

4. Conclusion

Le milieu Z est le meilleur quant à la formation de pousses en donnant des pousses multiples avec un faible taux de vitrification. Seuls les milieux Z et MS/2 combinés ont favorisé la régénération d'une plante entière à partir d'un explant de feuilles (cotylédons).

5. Références

- Atanassov A I, Mehandjier A D (1979) *In vitro* induced morphogenesis in pea. R Acad Bulg Sci 32: 115-118.
- Barbulova A, Iantcheva A, Zhiponova M, Vlahova M, Atanassov (2002) Establishment of embryogenic potential of economically important Bulgarian alfalfa cultivars (*Medicago sativa* L.). Biotechnol Equipment 75 : 97-110.
- Bingham E T, McCoy T J, Walker K A (1988) Alfalfa tissue culture. In: Hanson A, Barnes D, Hill R (eds) Alfalfa and alfalfa improvement. American Society of Agronomy, Madison, WI, 903-929.
- Eapen S, Tivarekar S, George L (1998) Thidiazuron-induced shoot regeneration in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) Plant Cell Tiss Org 53 : 217-220.
- Hamdani F Z (2001) Essai de régénération de plantes entières chez le *Scorpiurus* via l'organogenèse et l'embryogenèse somatique. Thèse de magister : Université Hassiba Benbouali, Chlef (Algérie).
- Hassen H, Zoghalmi A, Sassi S (1994) Contribution à l'étude de quelques espèces spontanées de légumineuses pastorales en Tunisie centrale: répartition géographique et relation avec le milieu environnant. Ann INRAT 1 & 2 : 203-222.
- Kaneda Y, Tabei Y, Nishimura S, Harada K, Akihama T, Kitamura K (1997) Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr]. Plant Cell Rep 17 (1): 8-12.
- Kanyand M, Desai A P, Prakash C S (1994) Thidiazuron promotes high frequency regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plants *in vitro*. Plant Cell Rep 14: 1-5.
- Keyton W A, Wayne A P (1993) Repetitive somatic embryogenesis and plant recovery in white clover. Plant Cell Rep 12: 125-128.
- Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M, (eds) (2005) *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp 577.

- Li J J W u Y M, Wang T (2009)**. In vitro direct organogenesis and regeneration of *Medicago sativa*. Biol Plant 53 (2): 325-328.
- Li S, Li W, Yang D L, Cao Z Y (2003)** Advance of research vitrification in plant test-tube plantlets. J Gansu agr Univ 38: 1-16.
- Liang H M, Huang J, Xia Y, W T M, Sun Z X, Li X Y (2003)** Establishment of high frequency regeneration system for tissue culture of alfalfa. J Agr Biotechnol 11: 321-322.
- Loureiro J, Capelo A, Brito G, Rodriguez E, Silva S, Pinto G, Santos C (2007)** Micropropagation of *Juniperus phoenicea* from adult plant explants and analysis of ploidy stability using flow cytometry. Biol Plant 5: 17-14.
- Mallikarjuna K, Rajendrudu G (2007)** High frequency *in vitro* propagation of *Holarrhena antidysenterica* from nodal buds of mature tree. Biol Plant 51: 525-529.
- Malmberg R L (1979)** Regeneration of whole plants from callus cultures of diverse lines of *Pisum sativum* L. Planta 146: 243-244.
- Michaud R, Lehman W F, Runbaugh M D (1988)** World distribution and historical development. In: Hanson A A & Barnes D K, Hill R R, (eds) Alfalfa and alfalfa improvement. Madison, WI, USA, pp 25-91.
- Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15 : 473-497.
- Nadolska O A Milowska L, Orczyk W (1994)** Two ways of plant regeneration from immature cotyledons of pea. Acta Soc Bot Pol 63(2): 153-157.
- Neves L O, Tomaz L, Feveriro MPS (2001)** Micropropagation of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. *Jemalong* and *Medicago truncatula* ssp. *Narbonensis*. Plant Cell Tiss Org 67: 81-84.
- Ochatt S J, Muneaux E, Machado C, Jacas L, Pontécaille C (2002)** The hyperhydricity of *in vitro* regenerants of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) is linked with an abnormal DNA content. J Plant Physiol 159: 1021-1028.
- Piccioni E, Baraccia G, Falcinelli M, Standardi A (1997)** Estimating alfalfa somaclonal variation in auxiliary branching propagation and indirect somatic embryogenesis by RAPD fingerprinting. Int J Plant Sci 158: 556-562.
- Quiros C F, Bauchan G R (1988)** The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. In: Hanson A A, Barnes D K & Hill R R (eds) Alfalfa and Alfalfa Improvement, pp. 93-121. Madison, WI, USA: ASA-CSSA-SSSA, Madison, Wisconsin, pp 93-124.
- Rouget Y (1989)** Embryogénèse somatique de la laitue *Lactuca sativum* L. Thèse doctorat : Université d'Orsay-Université Paris Sud (France).
- Russelle M P, Lamb J F S, Montgomery B R, Elsenheime D W R, Miller B S, Vance C P (2001)** Alfalfa Rapidly Remediate Excess Inorganic Nitrogen at a Fertilizer Spill Site. J Environ Qual 30 : 30-36.
- Saadi A, Hamdani F Z (2007)** Régénération *in vitro* du *Scorpiurus muricatus* ssp. *Subvillosus* via la caulogénèse. Biotechnol Agron Soc Environ 11 (3) : 185-191.
- Seklani H (1991)** Possibilités des *Medicago* annuelles: intérêt et exploitation par les animaux. Congrès sur le Ley-farming, Medics-céréales, Alep, Syrie, 28/04-02/04.
- Tegeder M, Kohn H, Nibbe M, Otto S, Pickardt T (1996)** Plant regeneration from protoplasts of *Vicia narbonensis* via somatic embryogenesis and shoot organogenesis. Plant Cell Rep 16 :22-25.
- Tetu T (1989)** Régénération de plantes *in vitro* par organogénèse et embryogénèse somatique chez la betterave sucrière, le pois et le soja. Études physiologiques, morphologiques, anatomiques et ultrastructurales. Thèse de doctorat. : Université de Paris VI, (France).
- Tian L N, Brown D C W, Watson E (2002)** Continuous long-term somatic embryogenesis in alfalfa. In Vitro Cell Dev Biol Plant 38: 279-28.
- Volnec J J, Cunningham S M, Haagensohn D M, Berg W K, Joern B C, Wiersma D W (2002)** Physiological genetics of alfalfa improvement: past failure, future prospects. Field Crop Res 75: 97-110.
- Whyte R O, Nilsson G L, et Trumble H C (1953)** Legumes in agriculture. FAO Agriculture Studies, series 21, Rome, Italy.
- Zagorska N, Dimitrov B, Gadeva P, Robeva P (1997)** Regeneration and characterization of plants obtained from anther cultures in *Medicago sativa* L. In Vitro Cell Dev Biol Plant 33 :107-110.