

**Zeitschrift:** Saussurea : journal de la Société botanique de Genève  
**Herausgeber:** Société botanique de Genève  
**Band:** 29 (1998)

**Artikel:** Étude de la rhizogenèse adventive in vitro chez Malus domestica Borkh. Jork 9  
**Autor:** Auderset, Guy / O'Rourke, Jane / Moncousin, Charles  
**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-1099125>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

**Download PDF:** 17.04.2026

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

# Etude de la rhizogenèse adventive in vitro chez *Malus domestica* Borkh. Jork 9

GUY AUDERSET,  
JANE O'ROURKE  
&  
CHARLES MONCOUSIN

## ABSTRACT

AUDERSET, G., J. O'ROURKE & C. MONCOUSIN (1998). Study of the adventitious root histogenesis on *Malus domestica* Borkh. Jork 9. *Saussurea* 29: 77-96. In French, English and French abstracts.

This study is aimed towards better understanding concerning the dynamics of adventitious root histogenesis during the six days following an auxinic shock on *Malus* cuttings. It has been complemented by a study of the ultrastructural characteristics involved with the regions concerned with root organogenesis and by autoradiographic studies of DNA synthesis in the areas concerned by root organogenesis. All auxin-treated plants produced roots, they did not necessarily do so in a synchronous manner. Nevertheless, the histological study permitted the identification of the principal events in "windows" of about 10 hours and thus, in a relatively precise manner between the twentieth and the hundred and twentieth hour following auxin treatment. Although prepared for use with electron microscopy, the cytological preservation has been good enough to permit a detailed light microscopy study of the organelles as well as the tissue events. This method has been used to follow events through serial sections in order to determine the spatial relationships during adventitious root histogenesis and has permitted the identification of four stages in the organogenesis of adventitious roots from *Malus* Jork 9. **1.** Primary modifications of all the tissues in the zone of study, and particularly the cortical parenchyma. These relatively rapid modifications, occurring within 20-30 hours following auxin shock, are in the form of a dedifferentiation: increases in nucleolar volume, cytoplasmic density and numbers of plastids. These changes appear to be generally involved in this relatively rapid change both in other *Malus* varieties and in other species as seen in the literature. **2.** From about 30 to 50 hours, the modifications are specific and affect especially the vascular bundles: cambial activation and formation of cambial derivatives, differentiation of lignified vascular elements and well-developed secondary phloem. Thus, from 50 hours onwards, at certain levels in the vertical plane, the vascular tissue possesses a meristematic structure four times as large as that seen in the control plants. **3.** Between 60 and 80 hours after auxin shock, most interfascicular regions are the sites of dedifferentiation, especially in proximity to the intrafascicular meristematic regions. **4.** After 70 hours, the first meristematic production for future root organogenesis starts to develop in the interfascicular parenchyma, close to the phloem; a part of which will evolve into a root apical structure during the following 30 hours. Our short sampling intervals (every 6 hours during 6 days) following auxin treatment has permitted us to follow the changes with great precision especially with the use of transversal serial sections.

**Key-words:** Adventitious roots – Auxin shock – Histogenesis – IAA – *Malus domestica* Borkh. Jork 9 – Microcuttings – Microscopy.

## RÉSUMÉ

AUDERSET, G., J. O'ROURKE & C. MONCOUSIN (1998). Etude de la rhizogenèse adventive in vitro chez *Malus domestica* Borkh. Jork 9. *Saussurea* 29: 77-96. Résumés anglais et français.

Cette étude a pour objectif de comprendre la dynamique de l'histogenèse adventive dans des microboutures de *Malus* Jork 9 durant les six jours qui suivent un traitement inducteur. Elle est complétée par une étude autoradiographique et ultrastructurale des zones concernées par l'organogénèse racinaire. Au niveau histologique, cette étude a permis l'identification des principaux événements liés à l'organogénèse, et ceci dans des séquences d'environ dix heures, entre la vingtième et la cent-vingtième après le choc auxinique. Ce travail permet l'identification de quatre étapes marquant l'histogenèse adventive. **1.** Les modifications primaires, touchant tous les tissus de la zone impliquée, entre la 20<sup>e</sup> et la 30<sup>e</sup> heure après le choc auxinique, et qui vont dans le sens d'une dédifférenciation: augmentation du diamètre nucléolaire, de la densité cytoplasmique et du nombre de plastides. **2.** Entre la 30<sup>e</sup> et la 50<sup>e</sup> heure, les modifications touchent surtout la zone vasculaire: activation du cambium et formation de tissus dérivés (éléments lignifiés, phloème secondaire). A partir de la 50<sup>e</sup> heure, les zones vasculaires manifestent une structure méristématique prononcée. **3.** Entre la 60<sup>e</sup> et la 80<sup>e</sup>, la plupart des régions interfasciculaires sont les sites d'une dédifférenciation active, spécialement au contact des faisceaux vasculaires. **4.** Dès la 70<sup>e</sup> heure, les premiers éléments méristématiques marquant le début de l'histogenèse racinaire sont identifiables dans la zone du parenchyme interfasciculaire, au contact du phloème qui participe lui-même à la formation de la racine pendant les 30 heures consécutives. Nos prélèvements fréquents (toutes les six heures) ont permis de suivre cette évolution avec une grande précision.

**Mots-clés:** Racines adventives – Choc auxinique – Histogenèse – IAA – *Malus domestica* Borkh. Jork 9 – Microboutures – Microscopie.

## Introduction

La rhizogenèse adventive est une étape importante dans la micropropagation des vitroplants. Un certain nombre de traitements a été proposé pour promouvoir la rhizogenèse, en particulier des traitements par auxine ou substances analogues. Les modalités de traitement permettant d'induire et de faciliter la rhizogenèse sont diverses et relativement nombreuses (LIS-BALCHIN, 1989; STANDARDI & ROMANI, 1990; AUDERSET & al., 1996, 1997).

Parmi les traitements proposés, celui du choc auxinique, que nous avons pratiqué dans ces études, permet de suivre un certain nombre de séquences morphologiques et biochimiques dans les jours qui suivent son application (AUDERSET & al., 1994).

Depuis quelques années un nombre encore relativement faible d'études histologiques ont été publiées concernant des Angiospermes non ligneuses tel que *Pisum* (NOUGARÈDE & RONDET, 1982, 1983) ou des Angiospermes ligneuses, en particulier *Malus* (HICKS, 1987; ZHOU & al., 1992; WELANDER & PAWLICKI, 1992).

L'établissement d'un modèle structural de l'organogénèse racinaire adventive est encore actuellement peu avancé car soumis aux variations des espèces utilisées. Ce point a été passé en revue par JACKSON (1986), JARVIS (1986) & MONCOUSIN (1988 a et b, 1992).

Le clone *Malus* Jork 9 est considéré comme un matériel dont l'induction rhizogène est relativement facile et ses réactions aux conditions de culture sont actuellement assez bien connues.

Nous nous sommes proposé de suivre la rhizogenèse adventive de *Malus Jork 9* consécutive à un choc auxinique, et ceci étape par étape en effectuant des prélèvements séparés par des temps relativement courts (6 heures) durant les 6 jours qui suivent l'application d'auxine.

Notre objectif a été de mettre en évidence les changements intervenant au niveau des différents tissus de la tige, durant toutes les étapes de la rhizogenèse. Dans le but de caractériser les territoires concernés et leur évolution, nous avons mené cette étude à trois niveaux:

- niveau histologique et cytologique,
- niveau ultrastructural,
- niveau cytophysiologique: synthèse de l'ADN.

## Matériel et méthodes

### 1. Culture du matériel biologique

Des boutures de *Malus domestica*, Jork 9, provenant de chez Kunneman (Lisse, Pays Bas) sont propagées in vitro sur milieu Murashige et Skoog (MS) défini par Seingre (SEINGRE & al., 1991). Au début d'une expérience de rhizogenèse, des micro-boutures d'environ 2 cm sont excisées puis disposées durant une heure dans une solution agarisée d'auxine (Acide indoylé acétique, AIA) à la concentration de 1 mM. La base des tiges est plongée de 2 à 3 mm dans le gel (**choc auxinique**). Les boutures sont ensuite disposées sur milieu MS sans régulateurs de croissance pour la durée de l'expérience. Durant les 6 jours consécutifs, les plantes sont tenues à l'obscurité à une température de 26°C.

### 2. Microscopie optique et électronique

Les prélèvements sont effectués toutes les 6 heures durant les six jours qui suivent le choc auxinique. De 6 à 8 échantillons ont été prélevés à chaque fois, ce qui représente pour une expérience environ 200 plantes. Les témoins subissent les mêmes manipulations, sans traitement à l'AIA. Nous avons procédé à l'étude de cinq séries expérimentales.

#### a. Histologie

Des segments de 3 à 5 mm sont prélevés au dessus de la section de la base des boutures et fixés par le mélange Formol/alcool/acide acétique (FAA) pendant 48 heures. Ils sont ensuite déshydratés et inclus dans la paraffine. Des coupes sériées de 8  $\mu$  d'épaisseur, colorées à l'hématoxyline de Groat permettent une reconstitution tridimensionnelle de la tige à n'importe quelle étape de la rhizogenèse.

#### b. Cytologie et microscopie électronique

Des segments de 1,5 à 2 mm sont prélevés juste au dessus de la section de la base de la tige et sont fixés durant 12 heures dans de la glutaraldéhyde à 2,5% dans le tampon phosphate 0.1 M, pH 7.1, à température de 20 °C.

Après trois lavages de 30 minutes dans le même tampon, ils subissent une post-fixation au tétroxyde d'osmium à 1% dans le tampon phosphate durant 2 heures à 4 °C. Après déshydratation à l'acétone, les blocs sont inclus dans l'Epon puis débités à l'ul-

tramicrotome en coupes semi-fines de 1 à 2  $\mu$  d'épaisseur, dans les plans transversal et longitudinal et de manière sériée.

La coloration du matériel inclus dans l'Epon est faite au moyen d'une solution aqueuse d'Azur B à 0,25% sur plaque chauffante.

Pour l'étude au ME, les mêmes blocs sont coupés au moyen d'un ultramicrotome Sorvall MT2, et, après coloration au citrate de plomb, les coupes sont observées et photographiées au moyen d'un microscope électronique Philips 300.

Le couplage systématique de l'observation en microscopie optique et en microscopie électronique permet un repérage précis des zones étudiées au niveau ultrastructural.

### **3. Autoradiographie**

#### **a. Incubation et coupe**

La base de boutures de Malus Jork 9 ayant subi un choc auxinique est immergée dans une solution de 2 mM de  $^6\text{-}^3\text{H}$ -thymidine (4 mCi) dans de l'eau distillée, durant 4 heures à des temps variables après le choc auxinique. Après l'incubation, les plantules sont immédiatement fixées dans le mélange FAA, ou la glutaraldéhyde puis après inclusion dans la paraffine ou l'Epon, sont débitées en coupes longitudinales et transversales. Les plantes témoins, n'ayant pas subi de choc auxinique, sont traitées de la même manière.

Les coupes sériées hydratées sont recouvertes d'un film d'émulsion Kodak NTB2 puis laissées en exposition à l'obscurité (4°C) durant 7 jours pour les coupes à la paraffine (8  $\mu$  d'épaisseur) et 11 jours pour les coupes semi-fines (2  $\mu$  d'épaisseur). Le développement est effectué au moyen du révélateur Dektol et les coupes sont colorées par le bleu de toluidine (0,5%) puis montées de manière habituelle. Le temps d'incubation utilisé (4 heures) permet de repérer tous les noyaux qui, durant cette période assez longue, entreprennent la phase de synthèse d'ADN. Ces noyaux sont révélés par les grains d'argent réduit qui les recouvrent et en permettent l'observation et leur comptage au microscope.

Dans cette étude autoradiographique, nos observations ont porté sur 3 séries de 60 à 70 plantes

#### **b. Quantification**

Les cellules des différentes zones (cambiale, phloémienne, interfasciculaire, parenchymateuses corticale et médullaire) sont observées chez 6 à 8 plantes différentes par temps de traitement, pour les trois expériences.

Le nombre de noyaux marqués est exprimé en % du total des noyaux observés. Trois coupes d'un plan proche mais non contigu (afin d'éviter un double comptage) sont quantifiées par échantillon et réduites à une moyenne simple. Ces moyennes des différents échantillons de chaque lot, exprimées en % de noyaux en phase de synthèse d'ADN, sont représentées avec l'écart type des trois expériences.

Dans l'état actuel du travail, les comptages ont été effectués sur des coupes transversales seulement, et ceci pour utiliser la commodité de diagnostic de chaque zone quantifiée, ce qui est beaucoup plus aléatoire sur les coupes longitudinales.

## RÉSULTATS

### 1. Evolution des plantes témoins (Fig. 1a et 1b)

Chez les plantes témoins des trois premiers jours, ainsi que chez les plantes traitées, en début d'expérience, on observe sur des coupes transversales la structure générale suivante:

- un épiderme dont les cellules sont fréquemment encombrées d'un contenu vacuolaire granulaire, fortement osmiophile,
- un parenchyme cortical (PC) formé de 8 à 10 couches de cellules de grande taille dont le cytoplasme est peu abondant. La couche la plus profonde, au contact des zones de phloème, paraît plus dense et légèrement amyliifère.
- une zone centrale contenant 6 à 9 faisceaux vasculaires collatéraux généralement limités à l'extérieur par une zone de fibres fortement lignifiées (fibres du phloème, F), et, plus en profondeur, une zone de phloème qui contient des cellules parenchymateuses, des tubes criblés et des cellules-compagnes.
- la zone cambiale est, à ce stade, formée par 2 à 3 couches de cellules claires, de faibles dimensions dont le peu de cytoplasme et les très rares divisions permettent le qualificatif de quiescent.

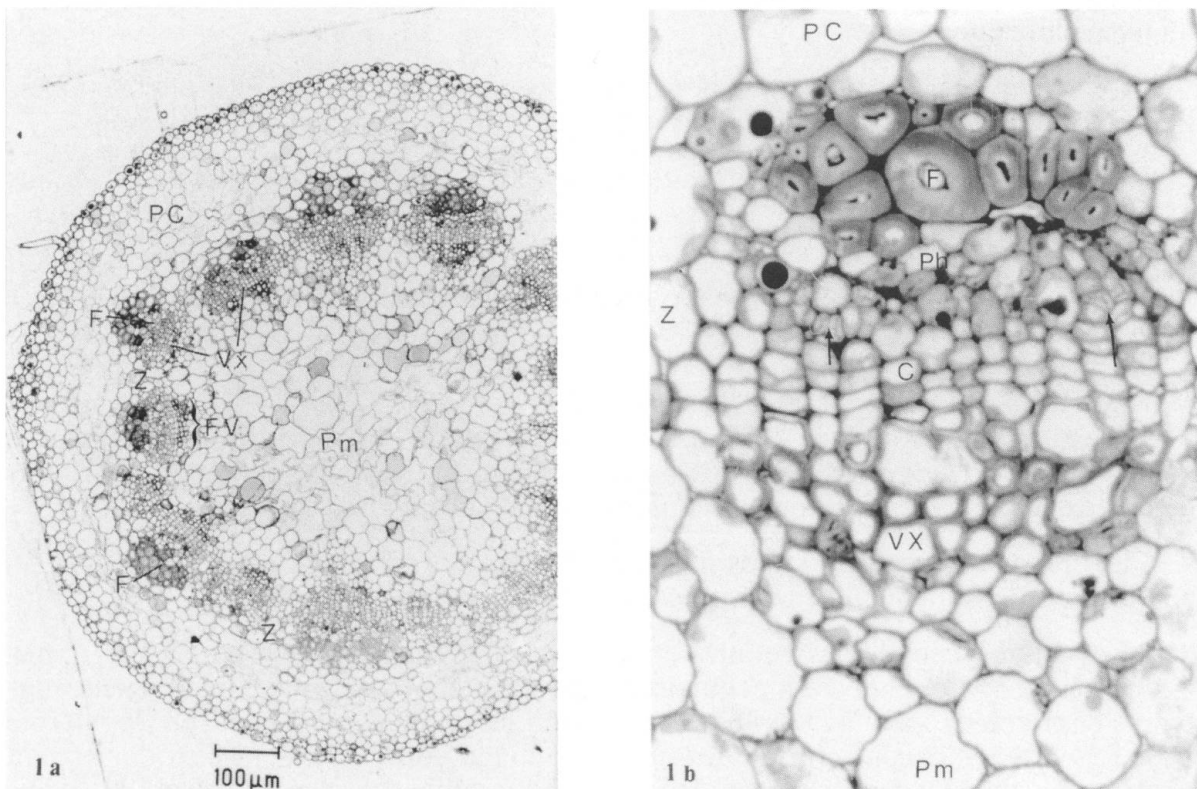


Fig. 1 a. – Vue générale d'une coupe transversale de tige (coupe semi-fine, Epon). Echelle 100  $\mu$ . Plante au temps 0, début d'expérience. Parenchyme cortical (PC); faisceaux vasculaires (FV); fibres lignifiées du phloème (F); zone interfasciculaire, cellules parenchymateuses (Z); vaisseaux de xylème (VX); parenchyme médullaire (Pm).

Fig. 1 b. – Vue détaillée d'une zone fasciculaire. Echelle 10  $\mu$ . Même condition. C: cambium; Phloème (Ph); Tubes criblés (flèches); autrement, mêmes légendes que Fig 1. A ce stade initial, le cambium n'est formé que de 2 à 3 couches cellulaires.

Au pôle interne des faisceaux, la différenciation vasculaire ligneuse a mis en place deux à trois rangées d'éléments conducteurs selon les faisceaux. Le centre du cylindre est occupé par la moelle formée de grandes cellules fortement vacuolisées. Les faisceaux sont séparés par des files de cellules parenchymateuses, la zone interfasciculaire. On ne décèle pas de cambium interfasciculaire.

L'interprétation des coupes longitudinales reste plus délicate selon le niveau d'observation, mais les renseignements qu'elles apportent sont comparables.

Signalons tout de suite que cette configuration est celle de la majorité des boutures observées, en particulier en ce qui concerne la présence de faisceaux de fibres lignifiées. Dans un nombre restreint d'observations, environ 20% des plantules observées, aussi bien chez les témoins que dans les lots expérimentaux, il y a absence plus ou moins complète de fibres phloémiennes: il s'agit vraisemblablement de boutures excisées à un niveau plus basal que les autres. Nous verrons plus loin l'incidence que paraît avoir la présence des fibres sur la rhizogenèse.

Au cours des six jours qui suivent le choc auxinique, les témoins manifestent une évolution discrète, lente mais perceptible dès le troisième ou quatrième jour, en particulier au niveau fasciculaire: elle se résume à une faible différenciation des vaisseaux de bois, à un début d'activation de la zone cambiale dont les cellules deviennent plus denses et montrent un regain d'activité mitotique, et à une augmentation de la surface du tissu phloémien.

Cette réponse des plantes témoins est cependant hétérogène et n'atteint jamais l'ampleur de celle observée chez les plantes qui ont subi le traitement auxinique.

Ces témoins ne manifestent aucune organogenèse racinaire dans le temps de nos expériences.

## *2. Evolution des plantes traitées par AIA*

### *a) Histologie et cytologie*

Chez les plantes traitées à l'auxine on assiste entre 0 et 144 heures à l'histogenèse puis au début de l'organogénèse des racines adventives. Cette évolution, à des degrés divers, est enregistrée chez toutes les plantes ayant subi le traitement.

Les premières manifestations dues au choc auxinique apparaissent entre 24 et 30 heures après le traitement. Elles sont enregistrées à plusieurs niveaux:

- allure générale des cellules épidermiques et corticales: le cytoplasme, appliqué contre les parois cellulaires et peu apparent en début d'expérience, augmente de manière significative et selon un gradient centripète, de l'épiderme vers les couches profondes du parenchyme cortical. Les plastes deviennent plus faciles à observer et, dès 24 heures, manifestent des divisions.
- nucléoles: au niveau des cellules parenchymateuses corticales et parfois médullaires, ainsi que dans les cellules du phloème on observe dès la 24<sup>e</sup> heure une augmentation de la densité et du diamètre des nucléoles.

Les changements qui interviennent par la suite, dès la 40<sup>e</sup> heure, se manifestent de manière précise dans la zone fasciculaire (cambium et dérivées) puis, dans une seconde étape, dans les espaces interfasciculaires.

### *Evolution au niveau de la zone fasciculaire*

Entre la 40<sup>e</sup> et la 48<sup>e</sup> heure, la plupart des plantes manifestent un début d'augmentation des dimensions de la zone comprise entre les fibres du phloème et le pôle vasculaire ligneux. Tous les faisceaux vasculaires sont concernés.

Cette augmentation des surfaces transversales est causée en partie par une activation des **cellules cambiales** dont les divisions donnent naissance à des dérivées plus petites, plus denses, isodiamétriques: le nombre moyen de couches cellulaires cambiales passe progressivement de 2-3 à 5-6. D'autre part, une augmentation de surface de la zone du phloème contribue également à l'élargissement de la zone intrafasciculaire.

Celle-ci paraît due partiellement à une différenciation de tissu secondaire, traduite par une augmentation du nombre de tubes criblés facilement identifiables, et de leurs cellules compagnes. D'autre part, par des divisions cellulaires qui affectent directement le parenchyme libérien, en particulier sur les flancs des faisceaux, à l'interface du parenchyme interfasciculaire.

Le développement du phloème secondaire est marqué par la différenciation rapide de nouveaux tubes criblés alors que les cellules conductrices déjà en place, ainsi que leurs cellules compagnes, subissent des altérations structurales dues vraisemblablement à la compression qu'elles subissent entre les fibres ligneuses et le phloème secondaire. Conjointement, on assiste à une activation de la différenciation de cellules vasculaires ligneuses.

Dès 70 heures environ, le caractère méristématique des cellules et leur stratification de moins en moins précise ne permet plus d'identifier nettement la zone cambiale.

Tout l'espace compris entre les fibres ligneuses du phloème et le pôle vasculaire ligneux évolue vers un aspect en **massif méristématique** débordant de part et d'autre vers les zones interfasciculaires elles-mêmes en dédifférenciation (**Fig. 2a**).

Durant le 4<sup>e</sup> et le 5<sup>e</sup> jours qui suivent le choc auxinique, les zones méristématiques intrafasciculaires sont en étroit contact avec les primordiums racinaires qui se différencient progressivement dans les zones interfasciculaires. Leur participation à l'histogenèse de tissus racinaires est suggérée par de nombreuses observations.

L'augmentation de la surface en coupe transversale de la zone intrafasciculaire a pu être estimée par planimétrie effectuée sur un nombre relativement élevé de faisceaux différents, provenant de plantes fixées aux différents stades: cette augmentation est constante entre le 2<sup>e</sup> et le début du 5<sup>e</sup> jour qui suit le traitement.

L'observation de coupes en série nous a permis de montrer que cette activation de la zone fasciculaire ne se produit pas de manière uniforme dans le plan vertical, mais qu'elle se distribue en foyers répartis verticalement sur 1,5 à 2 mm au dessus de la section de la base de la tige. D'après nos observations, on peut parler de 3 à 5 étages de foyers circulaires de différenciation, répartis sur environ 2 mm de hauteur.

Ces foyers méristématiques intrafasciculaires apparaissent toujours dans des espaces situés au contact de fibres lignifiées du phloème.

D'après nos observations, ces foyers méristématiques ne donnent pas directement naissance à des primordiums racinaires. Cependant, il semble que l'on puisse associer leur présence pour qu'à leur contact, cette différenciation racinaire puisse se produire dans le parenchyme de la zone interfasciculaire.

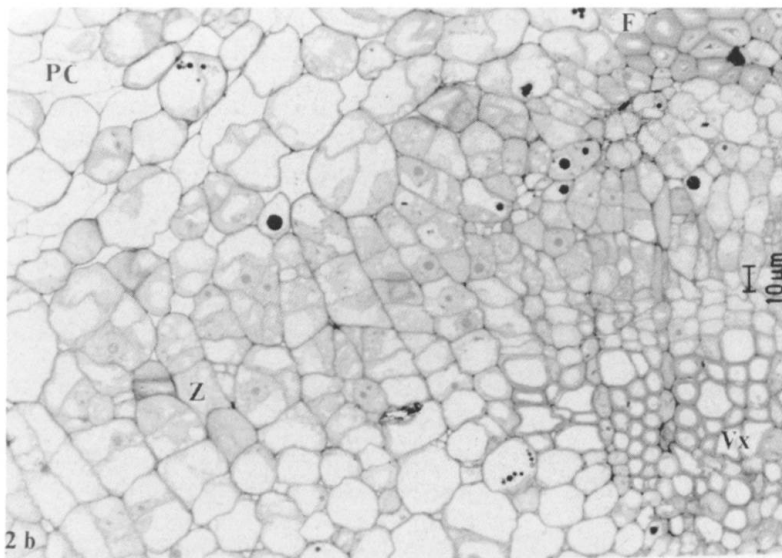
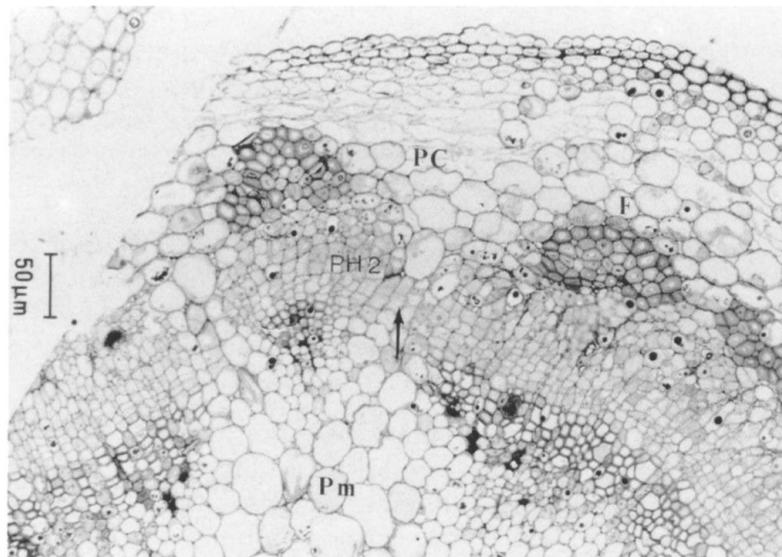


Fig. 2 a. – Coupe transversale d'une tige de plante 72 heures après le choc auxinique. Le cambium, de dimensions accrues, a mis en place au niveau fasciculaire, un tissu méristématique qui contribue à l'accroissement du phloème secondaire (PH2). Certaines cellules de la zone interfasciculaire entreprennent une dédifférenciation (flèches). Mêmes légendes que précédemment. Echelle 50  $\mu$ .

Fig. 2 b. – Plante de 78 heures après le choc auxinique. Vue détaillée d'une zone interfasciculaire active. Echelle 10  $\mu$ .

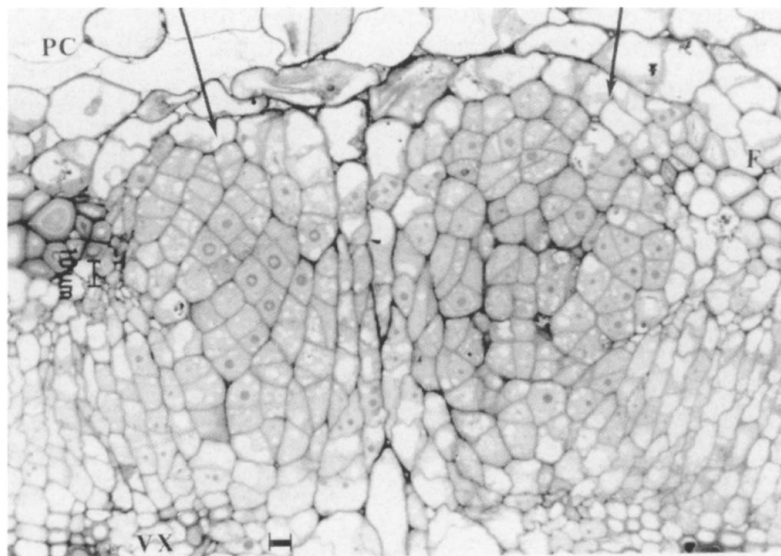
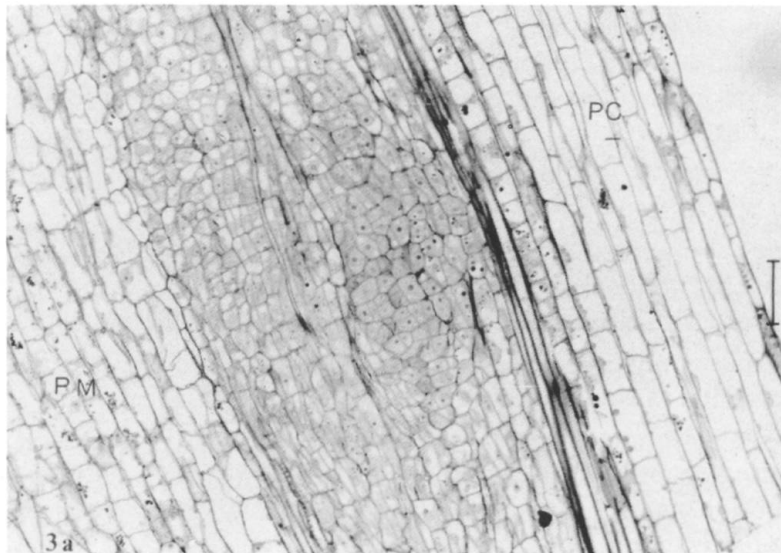


Fig. 3 a. – Coupe longitudinale, 96 heures après le choc auxinique: début de formation d'un méristémoïde au bord d'un faisceau vasculaire. Mêmes légendes. Echelle 50  $\mu$ .

Fig. 3 b. – Coupe transversale, 112 heures après traitement auxinique. Vue détaillée d'une zone interfasciculaire comportant deux méristémoïdes (flèches). Mêmes légendes. Echelle 10  $\mu$ .

### *Evolution au niveau des zones interfasciculaires*

On enregistre chez la majorité des plantes de 60 à 68 heures, un début de dédifférenciation de cellules parenchymateuses situées dans les espaces interfasciculaires.

De nouveaux cloisonnements apparaissent dans ces cellules de grande taille et donnent naissance à une nouvelle population de cellules plus petites dont le contenu est plus fortement coloré. Cette dédifférenciation est particulièrement marquée à proximité de la zone fasciculaire, en particulier au niveau du phloème secondaire, puis gagne progressivement les territoires médians de cette zone (**Fig. 2 b**).

Entre 70 et 80 heures, de nombreuses cellules possèdent des nucléoles de fortes dimensions, qui affectent une structure en couronne.

Dès 76 heures, toutes les plantes observées montrent des foyers de dédifférenciation plus ou moins prononcée au niveau de cette zone interfasciculaire: il s'établit progressivement un pont de cellules méristématiques entre la plupart des faisceaux voisins.

Selon le niveau d'observation dans le plan vertical, cette dédifférenciation peut revêtir des aspects plus ou moins marqués.

Dès 96 heures, sur une même plante, nous pouvons observer, selon le niveau horizontal, soit une zone de cellules dédifférenciées de 3 à 5 couches d'épaisseur, sans morphogenèse particulière, soit, par exemple 200  $\mu$  plus bas, une zone interfasciculaire où s'ébauche une zone d'histogenèse racinaire.

Dès 110 heures, lorsque les coupes transversales passent par le plan des foyers organogènes, il est aisé de déterminer les zones où s'organisent les ébauches racinaires. Elles figurent sous forme de massifs elliptiques de cellules d'aspect très méristématique, localisés dans les intervalles interfasciculaires et au contact des faisceaux vasculaires auxquels ils sont associés (**Fig 3 a, b**).

Sur un même plan de coupe transversale passant par un foyer organogène, la plupart des faisceaux vasculaires montrent une association avec une zone de différencia-

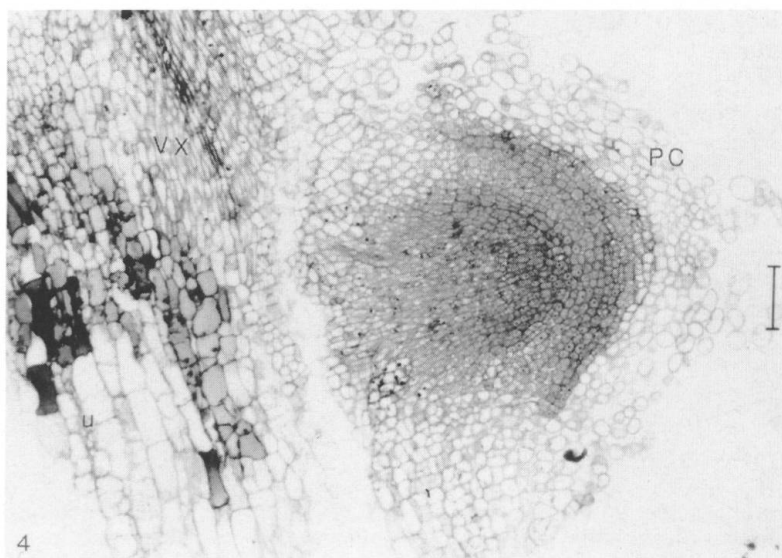


Fig. 4. – Coupe longitudinale; 120 heures après le traitement. Un primordium racinaire, à l'extrémité duquel une coiffe est en cours de différenciation. On peut voir la nature désagrégée du parenchyme cortical encore présent. Mêmes légendes. Echelle 100  $\mu$ .

tion racinaire, plus rarement avec deux associations, situées de part et d'autre du faisceau.

A la fin du 5<sup>e</sup> jour qui suit le choc auxinique, soit à 120 heures, selon le plan de la coupe transversale ou longitudinale, on peut observer, dans le parenchyme cortical en désagrégation locale, plusieurs méristèmes racinaires dont la croissance est dirigée vers l'extérieur de la tige.

Cependant, d'après nos observations, un nombre limité de proméristèmes s'engagent dans une organogénèse complète.

L'observation de la structure d'une ébauche racinaire révèle, à ce stade précoce, une structure encore homogène (**Fig. 4**).

### **b) Autoradiographie**

L'incorporation de thymidine tritiée est effective et détectable dans toute la microbouture: certains méristèmes axillaires et principaux montrent un marquage parfois important.

Nos observations et quantification zone par zone, mises en parallèle avec nos observations en histologie classique, illustrent de manière précise l'activation cambiale, entre autres, qu'avait suggérée une première série d'observations: nous avons enregistré une activation cambiale se produisant vers la 30<sup>e</sup> heure après le traitement auxinique, atteignant son maximum vers la 60<sup>e</sup> heure pour décliner ensuite à des valeurs proches de celles des témoins. Nous avons depuis développé une série d'expériences en couplant l'autoradiographie à l'utilisation des coupes semi-fines dont les caractères cytologiques sont nettement supérieurs à ceux obtenus au moyen de la paraffine.

Dans l'état actuel du dépouillement des résultats, nous pouvons produire le tableau suivant qui distribue le % de noyaux radioactifs (en phase de synthèse) selon les zones:

temps	Z.I.F.	CAMBIUM	PHLOÈME
36h	14.8 (2.5)	43.7 (2.4)	20.7 (3.9)
48	33.6 (5.4)	40.7 (4.6)	43.6 (2.0)
54	43.3 (4.2)	37.3 (3.6)	43.2 (3.7)
60	43.1 (1.2)	25.4 (2.1)	32.9 (0.5)
66	42.6 (0.6)	24.2 (1.8)	26.1 (2.5)
72	38.3 (2.9)	12.1 (3.2)	21.0 (2.1)
78	36.0 (2.2)	10.3 (3.1)	18.4 (2.6)

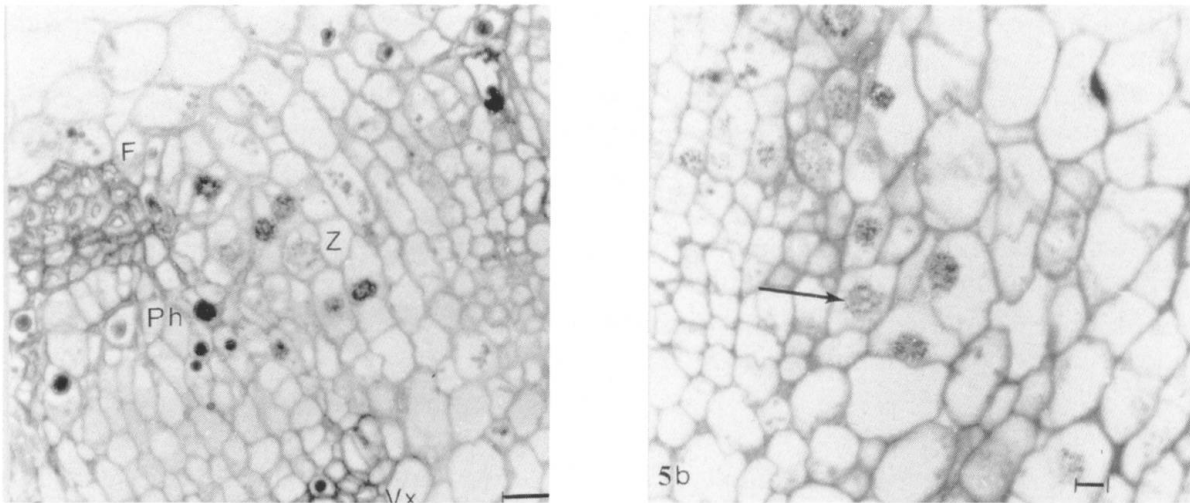
Les écarts types représentent la variation entre les résultats des 3 séries expérimentales.

Les plantes témoins ont, dans ces délais, une activité très faible, inférieure à 4% de marquage. (Z.I.F. = cellules de la zone interfasciculaire).

Ces résultats encore partiels montrent déjà une dynamique intéressante selon les tissus qui sont supposés intervenir directement dans la rhizogenèse:

- le cambium est à son maximum d'activité déjà à 30-40 heures après le choc auxinique. Cette activité baisse significativement peu après alors que l'activation atteint le tissu du phloème voisin.

Nous avons de nombreux cas d'observation où l'on peut mettre en évidence cette sorte de migration de l'activité mitotique d'une zone à l'autre. D'autre part, le marquage cambial des noyaux en synthèse d'ADN est généralement localisé sur la couche de cellules cambiales la plus externe, au contact du phloème.



ig. 5 a. – Zone interfasciculaire en début de dédifférenciation: plante de 66 heures après le traitement. Des cellules parenchymateuses différenciées entreprennent une synthèse d'ADN (noyaux marqués). Mêmes légendes que précédemment. Echelle 50  $\mu$ .

Fig. 5 b. – Même zone, détail: plante de 72 heures après traitement. Noyaux marqués (flèche) au niveau d'une cellule parenchymateuse. Echelle 10  $\mu$ .

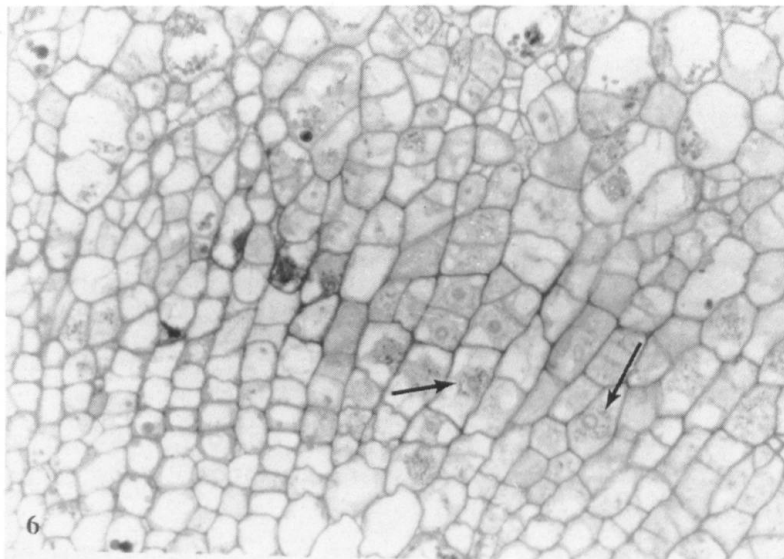


Fig. 6. – Zone interfasciculaire d'une plante de 78 heures. A rapprocher de la Fig. 2b. Marquage nucléaire (discret) généralisé de cette zone (flèches). Echelle 10  $\mu$ .

La zone interfasciculaire est le siège d'une augmentation de la synthèse de l'ADN entre la 40<sup>e</sup> et la 50<sup>e</sup> heure environ. Il paraît important de souligner qu'à ce stade, cette zone n'est pas méristématique: elle est constituée de cellules parenchymateuses différenciées; l'augmentation du marquage à ce niveau semble être l'indice d'un redémarrage du cycle cellulaire de ce tissu, dans le sens d'une dédifférenciation (**Fig. 5 et 6**).

La méthode autoradiographique a l'avantage, de plus, de révéler la précocité de cette activation:

Elle anticipe d'environ 20 heures sur les observations cytologiques qui montrent la dédifférenciation de telles cellules et leur contribution à la mise en place des méristémoïdes destinés à évoluer en primordiums racinaires.

Entre 60 et 70 heures, on assiste également à une augmentation du marquage nucléaire de régions voisines, en particulier au niveau des couches cellulaires profondes du parenchyme cortical.

Lors de la mise en place des méristèmes racinaires, au delà de 80 heures environ, le marquage au niveau du cambium retombe à un niveau inférieur à 5%. Cette zone ne semble plus concernée par l'édification des racines.

### *Cas particulier des secteurs de tige sans faisceaux de fibres lignifiées*

Comme nous l'avons évoqué plus haut, un certain nombre de nos observations ont porté sur des secteurs basaux exempts de fibres libériennes. Dans ces cas, le cambium a presque toujours adopté une configuration d'anneau plus ou moins continu. Ce qui a pour conséquence la disparition des zones interfasciculaires.

Ces observations rejoignent celles que nous avons pratiquées brièvement sur des disques de tige provenant de culture sur milieu Sorbitol, caractérisés par une pauvreté en éléments lignifiés.

Dans cette situation, un début d'histogenèse racinaire se produit de place en place, directement à partir de dérivées cambiales et il s'établit de petits méristémoïdes qui progressent en direction des couches profondes du parenchyme cortical. L'autoradiographie montre qu'au contact de ces massifs méristématiques, de nombreuses cellules parenchymateuses voisines entrent en synthèse d'ADN, puis en dédifférenciation. Leurs dérivées alimentent les méristémoïdes en cellules.

Nous évoquerons plus bas l'existence vraisemblable de ces deux modalités de rhizogenèse.

### *c) Microscopie électronique*

Cette étude nous a permis de caractériser les différents tissus, et d'apporter des précisions concernant trois séquences enregistrées en microscopie optique:

#### *1. Evolution au niveau du parenchyme cortical:*

Entre 24 et 48 heures, les plantes traitées par l'auxine manifestent une "activation" principalement au niveau de leur parenchyme cortical, événement signalé par de nombreux auteurs. Elle constitue la première manifestation consécutive au choc auxinique dont les critères principaux sont:

- augmentation du diamètre des nucléoles,
- augmentation de la densité cytoplasmique,
- évolution de la population plastidiale.

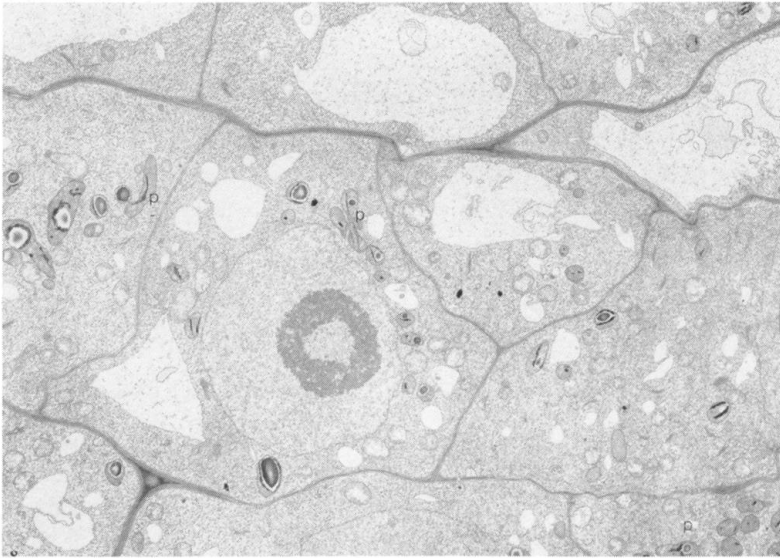
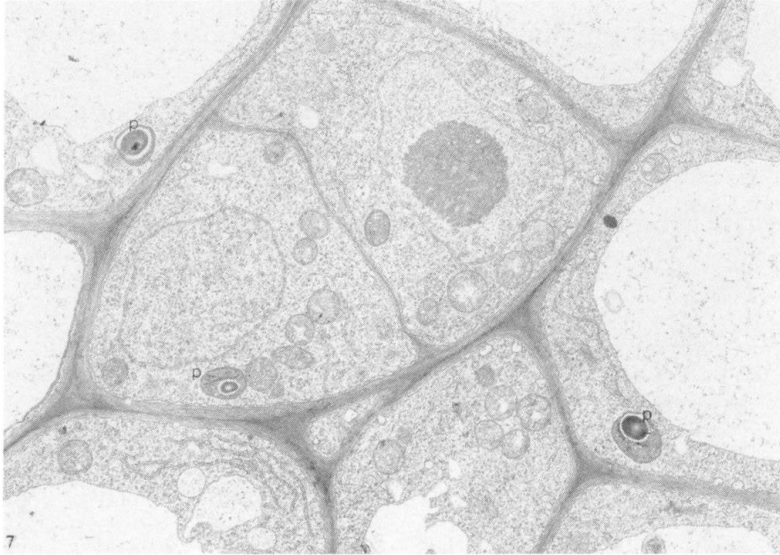


Fig. 7. – Zone interfasciculaire; plante de 72 heures après le choc auxinique. Des cellules parenchymateuses aux parois relativement épaisses entreprennent des divisions. Les vacuoles pour la plupart importantes ainsi que des plastes (p) comportant des structures lamellaires ainsi que de l'amidon sont l'indice d'une dédifférenciation débutante de la part de ces cellules. Grossissement 14.000 $\times$ .

Fig. 8. – Même zone, 96 heures après le traitement. Le système vacuolaire est en forte réduction. La population plastidiale est en augmentation, par division ou bourgeonnement de ces organelles. Dédifférenciation accrue de cette zone. Grossissement 10.000 $\times$ .

Nos observations en ME mettent en évidence avec plus de précision ces événements: de nombreux chloroplastes sont en division, la densité cytoplasmique, exprimée par la population ribosomiale est en augmentation; on peut également observer une augmentation des profils membranaires du réticulum endoplasmique.

Précisons que cette évolution, que l'on peut interpréter dans le sens d'une activation des synthèses d'ARN, ne semble pas concerner toutes les cellules du parenchyme cortical et qu'un gradient se manifeste: elle est plus accentuée dans les couches profondes du tissu.

Un autre événement, progressif et constant est enregistré dans cette zone et affecte précisément la structure des parois cellulaires de nombreuses cellules et leurs relations entre elles. Il est caractérisé par un relâchement plus ou moins prononcé de l'association des parois cellulaires entre cellules voisines ce qui conduit, à partir d'environ 60 heures, à l'augmentation des profils des méats intercellulaires.

Une évolution particulière de cette couche profonde a été décrite par NOUGARÈDE & RONDET chez *Pisum* (1982) et est qualifiée de "couche cellulaire en position d'endoderme". Ces auteurs lui attribuent un rôle de formation d'une coiffe provisoire durant l'histogénèse racinaire adventive.

## **2. Evolution particulière de la couche profonde du parenchyme cortical**

Dès 48 heures cette région cellulaire subit une évolution qui lui est particulière dans le sens d'une dédifférenciation exprimée par une forte augmentation de la densité cytoplasmique, par une fragmentation de la population plastidiale, qui jusque là, et contrairement à celle des autres couches corticales était fortement amylofère, par une prolifération très importante des profils de RE et une forte activité golgienne manifestement liée à la mise en place de nouvelles parois.

## **3. Evolution des cellules du parenchyme interfasciculaire:**

Nous nous sommes efforcés, grâce aux coupes semi-fines sériées, de localiser les cellules parenchymateuses interfasciculaires supposées compétentes dans l'initiation des futures racines, puis en étudiant au ME les coupes ultra-fines de ces régions précises, d'en caractériser l'évolution.

Dans l'état actuel, nous pouvons résumer les séquences ultrastructurales comme suit:

- A.** Des cellules parenchymateuses très différenciées acquièrent, dès environ la 60e heure, un volumineux nucléole, souvent en forme d'anneau. La densité ribosomiale augmente amenant une réduction graduelle du système vacuolaire (**Fig. 7 et 8**).
- B.** Ces cellules manifestent dès lors une reprise de l'activité mitotique caractérisant la mise en place de nouvelles parois. La population plastidiale, encore amylofère se divise activement donnant naissance à une nouvelle population de dimensions plus réduites comprenant encore quelques caractéristiques granulaires mais évoluant, dans les 20 heures qui suivent, vers un stade proplastidial de plus en plus prononcé. Les mitochondries se divisent également et le RE différencie de nouveaux profils membranaires. Le nombre de dictyosomes augmente fortement et leur activité est intense.

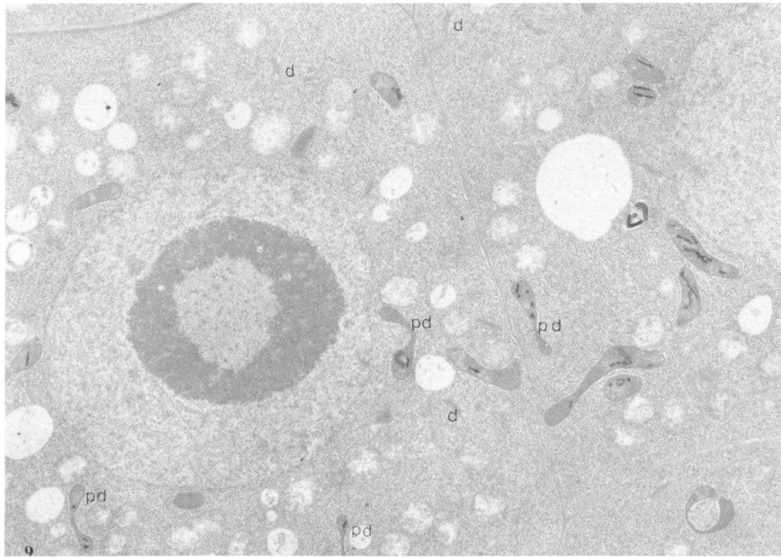


Fig. 9. – Zone identique où commencent à se différencier des méristémoïdes. L'état des cellules dédifférenciées est très méristématique: plastes en divisions (pd), nombreux dictyosomes, (d), système vacuolaire réduit, forte densité ribosomiale. Grossissement 14.000 $\times$ .

- C. Entre 70 et 80 heures, une nouvelle population cellulaire, dérivée de la dédifférenciation des cellules parenchymateuses est progressivement installée. Elle présente des caractéristiques méristématiques prononcées (**Fig. 9**).

A ce stade, environ 80 heures, il n'y a pas encore d'organisation tissulaire définie: on peut qualifier ces zones interfasciculaires de proméristèmes ou méristémoïdes.

L'organisation en territoires racinaires identifiables intervient au-delà de 90-100 heures.

Une observation, qui paraît intéressante, est également issue de l'examen en ME: à mesure que sont mises en place les cellules constituant les méristémoïdes, on observe toujours la différenciation de quelques tubes criblés (3 à 5), facilement identifiables au ME, au pôle interne de ces massifs méristématiques.

## DISCUSSION

Malus Jork 9 est considéré comme une plante dont la rhizogenèse adventive est aisée. Notre étude cytotologique avait pour objectif de tenter de comprendre la dynamique de cette histogenèse adventive. Elle est complétée d'autre part par une étude ultrastructurale destinée à mettre en évidence les caractéristiques des territoires concernés par cette organogenèse.

La première remarque qui s'impose est que si toutes les plantes traitées par l'auxine ont manifesté une réaction à ce traitement, la synchronisation reste aléatoire. Nos prélèvements effectués toutes les 6 heures ne permettent pas de décrire la réaction de manière aussi ponctuelle. Par contre, au niveau histologique, il devient possible de décrire les principales étapes dans des "fenêtres" d'environ 10 heures et ceci, de manière relativement précise entre la 20<sup>e</sup> et la 140<sup>e</sup> heure qui suivent le traitement auxinique.

La seconde remarque concerne la méthode que nous avons utilisée. Elle présente plusieurs avantages: destiné à l'observation en ME, notre matériel adapté à la microscopie optique permet, en raison de son degré de préservation, une excellente étude sur le plan cytologique et l'utilisation des critères précis et classiques de l'état cellulaire (nature des cellules et des tissus, degré de différenciation ou de dédifférenciation, organelles telles que plastes, nucléoles, noyaux et vacuoles).

Il s'est d'autre part rapidement révélé indispensable de procéder à des coupes en série afin de tenter une représentation "spatiale" de l'histogenèse racinaire adventive. Cette méthode s'y prête sans difficulté majeure et a permis d'observer les modifications à différents niveaux du plan vertical des 2 mm de tissus caulinaires situés au dessus de la base de l'explant.

Ces différentes conditions expérimentales nous ont permis de déterminer 4 étapes dans l'organogenèse racinaire adventive de Malus Jork 9:

1. Entre 20 et 30 heures après le choc auxinique.

Modifications primaires au niveau de l'ensemble des tissus de la zone étudiée, en particulier dans le parenchyme cortical. Ces modifications, relativement rapides puisqu'elles interviennent dans les 20 à 30 heures qui suivent le choc auxinique, vont dans le sens d'une dédifférenciation: augmentation du volume nucléolaire, augmentation de la densité cytoplasmique, augmentation de la population plastidiale. Les auteurs ayant traité de la rhizogenèse adventive chez différents Malus (HICKS, 1987, ZHOU & al., 1992) ainsi que chez d'autres plantes (NOUGARÈDE & RONDET, 1982 et 1983), sont unanimes à signaler ces changements parfois particulièrement rapides.

Selon ces auteurs, la stimulation nucléolaire rapide chez *Pisum* est la manifestation d'une augmentation de la population ribosomiale et l'indice de développement de la capacité de traduction des cellules.

Plus lente chez Malus, on peut là aussi mettre en rapport cette stimulation nucléolaire générale et l'augmentation de la densité cytoplasmique des différents territoires. Comme chez *Pisum*, cette stimulation n'est pas spécifique d'un territoire précis mais paraît ubiquiste.

2. Entre 30 et 40 heures:

Aux environs de la 30<sup>e</sup> heure, les modifications structurales sont de nature locale et affectent surtout la zone fasciculaire: activation du cambium et mise en place de nombreuses dérivées, différenciation d'éléments vasculaires ligneux, fort développement du phloème secondaire.

Cette évolution a pour résultat que, dès la 60<sup>e</sup> heure, la zone fasciculaire manifeste, à certains niveaux du plan vertical, une structure méristématique dont les dimensions sont plus du quadruple de celles des plantes témoins.

Des observations similaires figurent chez HICKS (1987) qui utilise Malus KCS-3 ainsi que chez ZHOU & al. (1992) chez Malus M 26. Ces auteurs cependant interprètent l'évolution des zones fasciculaires qu'ils appellent "meristemoids" comme étant les centres initiateurs directs de la rhizogenèse. Notons cependant que ZHOU & al. admettent dans cette histogenèse racinaire un "involvement of dedifferentiating cells of surrounding parenchyma".

3. Entre 60 et 80 heures:

La plupart des régions interfasciculaires sont le siège d'une dédifférenciation particulièrement active à proximité des foyers méristématiques intrafasciculaires.

#### 4. Après 90 à 100 heures:

De nombreuses divisions mettent en place, au niveau interfasciculaire, les premières ébauches méristématiques des futures racines, dont une partie va évoluer dans les 20 heures qui suivent vers une structure d'apex radulaire.

Sur un matériel comparable, la différence apparente entre l'interprétation de Hicks et Zhou et la nôtre peut s'expliquer par le temps relativement long qui s'est écoulé entre les prélèvements d'échantillons pratiqués par ces auteurs (intervalles de 12 à 24 heures) et les intervalles courts qui séparent nos prélèvements effectués toutes les 6 heures et qui donnent plus de précision au modèle d'histogenèse.

Cette précision a pu également être amplifiée par la pratique de coupes sériées, en particulier dans le plan transversal. Cette technique permet en effet de dissocier nettement la dédifférenciation qui se manifeste dès la 50<sup>e</sup> heure au niveau interfasciculaire de la mise en place déjà fort avancée d'une zone méristématique intrafasciculaire.

L'étude en microscopie électronique permet de préciser un certain nombre d'événements révélés de manière générale par l'histologie et la cytologie classiques:

- la caractérisation des différents territoires des régions rhizogènes et l'identification des types cellulaires,
- le déroulement de séquences suggérées par la microscopie optique telle, par exemple, l'activation de la zone corticale dans un délai relativement bref après le traitement auxinique,
- le comportement précis d'une population cellulaire qui paraît jouer un rôle déterminant dans la rhizogenèse adventive.

L'autoradiographie détectant la synthèse d'ADN nucléaire se révèle complémentaire à l'étude histologique classique. Elle confirme d'une part les observations cytologiques et en précise le déroulement tout en permettant d'anticiper, souvent de manière fort avancée, sur des événements décelés tardivement par les méthodes classiques d'observation.

Dès nos premières observations sur les coupes sériées, nous nous sommes rendu compte que les manifestations histologiques liées à la rhizogenèse adventive pouvaient fortement varier selon le niveau vertical le long de la bouture. Si toute la rhizogenèse est distribuée sur une hauteur de 2-3 mm à partir de la base, elle ne se produit que dans des zones fortement localisées. Ces zones, ou foyers organogènes, apparaissent le long de l'axe en trois ou quatre endroits pouvant être séparés par des secteurs où les événements cytologiques sont parfois inexistantes.

L'utilisation de coupes sériées longitudinales permet une localisation précise et facile de ces foyers organogènes. Les descriptions et quantifications (autoradiographie) sont par contre plus aisées dans le plan transversal intéressant ces foyers organogènes.

#### *Rôle éventuel des fibres lignifiées du liber*

Evoquées plusieurs fois dans la littérature, elles se voient attribuer un rôle variable. Lorsqu'elles sont abondantes, allant jusqu'à former un anneau plus ou moins compact et continu, les auteurs leur attribuent un rôle de barrière physique et physiologique à la rhizogenèse. Cette configuration semble en effet être spécifique aux espèces difficiles à enraciner (BEAKBANE, 1961, 1969, WHITE & LOVELL, 1984, 1986).

Une autre conséquence de leur présence sous forme de faisceaux distincts serait celle d'un écrasement progressif des tissus adjacents, en particulier lors de l'activation

cambiale: les cellules comprimées ou déplacées par cette dynamique, facilement observables dès la 40<sup>e</sup> heure, en seraient altérées et endommagées. Pour certains auteurs, elles seraient alors la source “d’un signal” dont l’influence provoque l’activation des tissus voisins.

Nous avons pour notre part fréquemment observé la présence de cellules endommagées dans les zones de différenciation racinaire, sans toutefois pouvoir leur attribuer ce rôle hypothétique d’inducteur.

Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions procéder à des expériences de micro-lésions locales sur des lots de plantes traitées ou non par l’auxine.

Nous avons également pu observer la différence entre l’évolution de la rhizogenèse dans les zones interfasciculaires et celle qui se manifeste parfois en l’absence des fibres lignifiées.

La première modalité montre que la mise en place des primordiums racinaires s’effectue toujours de manière centrifuge entre deux faisceaux de fibres lignifiées. Leur origine est située à l’interface phloème/parenchyme interfasciculaire.

Nous pouvons dans ce cas parler d’un éventuel rôle de polarisation de ces fibres. Dans le second cas, la prolifération du cambium, ainsi que l’apparition du phloème secondaire, s’effectue rapidement sans contrainte physique et les premiers massifs méristématiques apparaissent directement dans les anneaux méristématiques issus du cambium.

Cependant, malgré la dynamique facilitée par l’absence des fibres, cette modalité de rhizogenèse ne paraît pas plus rapide que celle qui se produit dans les zones interfasciculaires. Sur nos coupes concernant l’une et l’autre région d’une même bouture, les stades de développement des racines sont comparables en fonction du temps d’expérience.

De plus, malgré les différences structurales entre ces deux types de rhizogenèse, l’une et l’autre semblent faire appel à des processus de dédifférenciation de cellules parenchymateuses interfasciculaires ou corticales.

Dans le premier modèle, les cellules méristématiques marquant le départ d’un futur méristème semblent provenir directement de la dédifférenciation des cellules adultes de la zone interfasciculaire, puis secondairement de cellules environnantes qui se dédifférencient à leur tour.

Dans le second cas, des cellules méristématiques initiales proviennent directement du cambium et induisent secondairement la dédifférenciation de cellules adultes au niveau du parenchyme cortical voisin ou /et du tissu libérien.

Nous nous proposons, dans un proche avenir, de développer l’approche histochemique de la rhizogenèse chez *Malus*. Des résultats préliminaires, concernant l’activité d’enzymes, nous permettent de penser que nous disposons de marqueurs métaboliques intéressants nous permettant peut-être de mieux cerner cette organogenèse et son déroulement.

#### REMERCIEMENTS

Ce travail portant sur plusieurs années a été rendu possible par le soutien financier du Programme Bridge-Cost 87 et par celui de l’Office fédéral de l’éducation et de la science. Nous tenons également à remercier le Professeur J. Morré pour son accueil permanent dans son laboratoire à Purdue University (Indiana, USA).

## BIBLIOGRAPHIE

- AUDERSET, G., S. GAVILLET, J. MICHELI, J. O'ROURKE, M. RIBAUX & C. MONCOUSIN (1994). Histological analysis and the evolution of biochemical markers during the in vitro rooting of *Malus domestica* (Borkh.) Jork 9. *Advances Hort. Sci.*, 8: 5-10.
- AUDERSET, G., C. MONCOUSIN, J. O'ROURKE & J. MORRÉ (1996). Stimulation of root formation by thiol compounds. *Hort. Sci.* 31(2): 240-242.
- AUDERSET, G., C. MONCOUSIN, J. O'ROURKE & J. MORRÉ (1997). Stimulation of root formation in difficult-to-root woody cuttings by dithiothreitol. *Int. J. Plant Sci.* 158(2): 132-135
- BEAKBANE, A. B. (1961). Structure of the plant stem in relation to adventitious rooting. *Nature* 192: 954-955.
- BEAKBANE, A. B. (1969). Relationship between structure and adventitious rooting. *Internat. Plant Propagators Soc. Proc.* 19: 192-201.
- GAHAN, P. (1984). *Plant histochemistry and cytochemistry: An introduction*. Academic Press, London.
- GAHAN, P. (1991). Quantitative enzyme cytochemistry in plant biotechnology. *Phytochem. Anal.* 2: 97-106.
- HICKS, G. (1987). Adventitious rooting of apple microcuttings in vitro: an anatomical study. *Canad. J. Bot.* 65: 1913-1920
- JACKSON, M. B. (1986). *New root formation in plants and cuttings*. Edited by M. B. Jackson. Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- JARVIS, B. C. (1986). Endogenous control of adventitious rooting in non-woody cuttings. In: JACKSON, M. B., *New root formation in plants and cuttings*. Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht, The Netherlands: 191-222.
- LIS-BALCHIN, M. (1989). The use of antioxidants as rooting enhancers in the Geraniaceae. *J. Hort. Sci.* 64(5): 617-623.
- MONCOUSIN, C. (1988a). Etude de la rhizogenèse adventive (1). *Rev. Hort. Suisse* 61(4): 286-292.
- MONCOUSIN, C. (1988b). Etude de la rhizogenèse adventive (2). *Rev. Hort. Suisse* 61(10): 286-292.
- MONCOUSIN, C. (1992). Rooting of in vitro cuttings. In: BAJAJ YPS ed., *Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer, Heidelberg: 231-261.
- NOUGARÈDE, A. & P. RONDET (1982). Rhizogenèse adventive dans l'épicotyle du Pois: initiation et structuration de la racine. *Canad. J. Bot.* 60: 261-280.
- NOUGARÈDE, A. & P. RONDET (1983). Bases cytophysiologiques de l'induction rhizogène en réponse à un traitement auxinique dans l'épicotyle du Pois nain. *Ann. Sci. Nat. Paris* 13(5): 121-149.
- SEINGRE, D., J. O'ROURKE, S. GAVILLET & C. MONCOUSIN (1991). Influence of gelling agent and carbon sources on the in vitro proliferation rate of apple rootstock EM9. *Acta Hort.* 289: 151-155.
- STANDARDI, A. & F. ROMANI F. (1990). Effects of some antioxidants on in vitro rooting of apple shoots. *Hort Sci.* 25(11): 1435-1436.
- WELANDER, M. & N. PAWLICKI (1993). A model system for studying root regeneration in woody species. *Acta Hort.* 336: 225-230.
- WHITE, J. & P. H. LOVELL (1984a). Factors influencing adventitious root production in cuttings of *Griselinia littoralis* and *G. lucida*. *Ann. Bot.* 53: 443-446.
- WHITE, J. & P. H. LOVELL (1984b). The anatomy of root initiation in cuttings of *Griselinia littoralis* and *G. lucida*. *Ann. Bot.* 54: 7-20.
- ZHOU, J., H. WU & G. COLLET (1992). Histological study of initiation and development in vitro of adventitious roots in minicuttings of apple rootstocks of MK26 and EMLA9. *Physiol. Pl.* 84: 433-440.