

INFLUENCE DE LA FORME D'AZOTE MINÉRAL ET DE LA CONCENTRATION EN FER SUR LA MORPHOGÉNESE *IN VITRO* DU BASILIC SALUTAIRE (*Ocimum gratissimum* L.)

Kodjo Djidjolé ETSE^{*} et Atsou Vincent AÏDAM

*Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie végétale, Faculté des Sciences,
Université de Lomé, BP 1515 Lomé, Togo*

*Correspondance, e-mail : kodjo.etse@yahoo.fr

RÉSUMÉ

La chlorose ferrique est un obstacle à la production végétale. Elle survient principalement sur les sols calcaires où les ions nitrates sont la forme exclusive d'azote dans la solution du sol. Nous avons mis en évidence ce phénomène chez *Ocimum gratissimum* en étudiant les effets de différentes concentrations en fer du milieu et ceux de la forme d'azote minéral sur la morphogenèse *in vitro* des explants. Les résultats montrent que l'absence de fer ou le doublement de sa teneur, la présence de nitrates seuls ou l'absence d'azote minérale réduisent progressivement la survie des explants. Le taux de débourrement est réduit en présence de nitrates seuls.

L'absence de fer ou la réduction de sa teneur, l'absence d'azote minéral ou la présence de nitrate seul induisent une chlorose manifeste dès la première semaine de culture. Ce phénomène n'est pas observé lorsque l'azote est apporté uniquement sous forme d'ions ammonium ou en association avec des nitrates. Une diminution de moitié ou le doublement de la teneur en fer réduit considérablement le taux d'enracinement des explants. Seule la combinaison ammonium-nitrate permet un enracinement efficient. Le milieu de Murashige et Skoog (MS) généralement utilisé, est bien adapté pour une bonne morphogenèse *in vitro* chez *Ocimum gratissimum*.

Mots-clés : *chlorose, fer, ammonium, nitrate, Ocimum gratissimum.*

ABSTRACT

Influence of the mineral form of nitrogen and of the iron concentration on *in vitro* morphogenesis of the salutary basil (*Ocimum gratissimum* L.)

Ferric chlorosis is a challenge to plant production. It occurs mainly on calcareous soils where nitrates are the exclusive form of nitrogen in the solution of the soil. We demonstrated this phenomenon with *Ocimum gratissimum* while studying the effects of iron concentrations in the media and those of the mineral form of nitrogen on the *in vitro* morphogenesis of the explants. The results showed that the absence of iron or the doubling of its concentration, nitrate alone or the mineral nitrogen starvation reduced progressively the survival rate. The dudding rate was reduced in the presence of nitrates. The absence of iron or the reduction of its concentration, the absence of mineral nitrogen or the presence of nitrate alone induced a manifest chlorosis since the first week of culture. When ammonium was the sole source of nitrogen or was associated with nitrate in the culture media, this phenomenon was not observed. A reduction at half of iron concentration or its doubling reduced considerably the rooting rate of the explants. Only the combination of ammonium and nitrate permitted an efficient rooting. The medium of Murashige and Skoog (MS) commonly used was well adapted for a good *in vitro* morphogenesis of *Ocimum gratissimum*.

Keywords : *chlorosis, iron, ammonium, nitrate, Ocimum gratissimum.*

I - INTRODUCTION

Les corrélations physiologiques, en conditions de culture *in vitro*, sont souvent réduites, privant les explants des mécanismes de régulation retrouvés chez la plante entière. Ces explants sont par conséquent sensibles aux variations de la composition du milieu, ce qui se traduit aussi par le développement des symptômes de carence ou de toxicité selon les cas [1]. Le fer joue un rôle très important dans la vie de la cellule. Il a été montré que dans certaines conditions, les plantes pouvaient présenter des symptômes de carence en fer à des concentrations optimales en cet élément [2-4]. De manière générale, les plantes cultivées sur milieu pauvre en fer ou sur des sols calcaires qui présentent un pH alcalin, manifestent une chlorose, symptôme caractéristique d'un déficit en fer ou de sa mauvaise absorption. Cependant, la chlorose peut aussi provenir d'un déficit en magnésium ou en azote. Par ailleurs, il a été démontré que les manifestations de chlorose s'accentuent avec les concentrations élevées en ions nitrates [5].

Néanmoins, la chlorose induite par les nitrates peut être levée, en les remplaçant par les ions ammonium sans apport extérieur de fer [6]. Du fait de leur co-transport avec les protons, les nitrates provoquent une augmentation du pH apoplasmique alors que les ions ammonium en entraînent plutôt une baisse [7]. Ces observations suggèrent donc que la forme d'azote minéral agit sur les manifestations de chlorose en modulant le pH apoplasmique. Cet article expose les résultats d'une étude sur l'influence de la concentration en fer du milieu d'une part, et celle de la forme d'azote minérale d'autre part, sur le comportement morphogénétique *in vitro* du basilic salutaire, *Ocimum gratissimum* L., une plante médicinale très utilisée en Afrique en raison de ses multiples vertus culinaires et thérapeutiques [7].

II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

Un clone d'*Ocimum gratissimum*, issu de germination *in vitro*, a été utilisé pour cette étude dans le but d'avoir une population aussi homogène que possible. Les explants proviennent de vitroplants cultivés sur le milieu de Murashige et Skoog (MS) [8], supplémenté de 30 g.L⁻¹ de saccharose, des vitamines MS et solidifié avec de l'agar-agar à 8 g.L⁻¹. Le pH est ajusté à 5,70 ± 0,01 avant autoclavage. Les explants sont des fragments uninodaux de tiges débarrassés de leurs feuilles et ayant une taille de 0,5 à 1,0 cm environ. Ils sont mis en culture sur les milieux à raison d'un explant par tube. Les cultures sont disposées dans une chambre de culture avec une photopériode de 16 h/j à 27°C ± 1° C sous une lumière blanche d'une intensité de 120 µE.m⁻².s⁻¹.

II-1. Effet du fer sur le comportement morphogénétique des explants

Les explants sont mis en culture en phase de multiplication sur milieu de base MS modifié comme suit :

- Milieu de concentration normale en fer (Fe 1, Témoin),
- Milieu sans fer (Fe 0),
- Milieu de concentration en fer diluée au demi (Fe/2),
- Milieu deux fois concentré en fer (Fe×2).

Les titres des ions, après modification des différents milieux, sont présentés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Titre en méq.L⁻¹ des ions après modification des milieux utilisés pour le test fer.

Ions	Témoin (méq.L ⁻¹)	Fe 0 (méq.L ⁻¹)	Fe/2 (méq.L ⁻¹)	Fe×2 (méq.L ⁻¹)
SO ₄ ²⁻	3.520	3.320	3.424	3.724
Na ⁺	2.268	2.066	2.167	2.470
Fe ⁺⁺⁺	0.200	0.000	0.100	0.400
EDTA	0.200	0.000	0.100	0.400

II-2. Effet de l'azote sur le comportement morphogénétique des explants

Le test est réalisé sur le milieu de base MS modifié comme suit :

- Milieu témoin (NH₄⁺) à 20 méq.L⁻¹ et (NO₃⁻) à 40 méq.L⁻¹,
- Milieu sans azote (N 0),
- Milieu avec nitrate seul (NO₃⁻) à 60 méq.L⁻¹,
- Milieu avec ammonium seul (NH₄⁺) à 60 méq.L⁻¹.

Les titres des ions, après modification des différents milieux, sont présentés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Titre en méq.L⁻¹ des ions après modification des milieux utilisés pour le test azote.

Ions	Témoin (méq.L ⁻¹)	N 0 (méq.L ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (méq.L ⁻¹)	NH ₄ ⁺ (méq.L ⁻¹)
NH ₄ ⁺	20.00	0.000	0.000	60.000
NO ₃ ⁻	40.00	0.000	60.000	0.000
K ⁺	20.044	20.044	61.249	20.044
Cl ⁻	4.806	24.806	4.806	24.806
SO ₄ ²⁻	3.520	3.520	3.520	63.520

II-3. Dosage des chlorophylles totales

1 g de feuilles fraîches récoltées sur des vitroplants sont broyées dans une solution aqueuse d'acétone à 80% (v/v). Le broyat est récupéré dans des tubes puis centrifugé à 5000 rotation par minute pendant 10 minutes. Le surnageant est collecté dans un nouveau tube. La mesure de la densité optique est réalisée à une longueur d'onde de 652 nm, sur l'extrait brut dilué au 10^{ème}, à l'aide d'un spectrophotomètre Spectronic 610 Milton Roy.

Les concentrations en chlorophylles totales des extraits, exprimées en mg.L⁻¹, sont déterminées selon la loi de Beer-Lambert en utilisant le coefficient d'extinction molaire donné par Arnon [9] ainsi présenté dans *l'Equation 1*.

$$\text{Concentration en Chlorophylles totales} = \frac{\text{DO}_{652 \text{ nm}}}{34,5} \quad (1)$$

Ainsi, la teneur en chlorophylles totales des échantillons, exprimée en milligramme de chlorophylle par gramme de feuilles fraîches, est calculée selon *l'Equation 2* ci-dessous :

$$\text{Teneur en chlorophylles totales des feuilles} = \frac{\text{DO}_{652 \text{ nm}}}{34,5} \cdot 10 \cdot \frac{10 \text{ ml}}{1 \text{ g}} \quad (2)$$

II-4. Analyse des données

Les données sont analysées avec le logiciel Statistica, version 10. (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Les différences significatives sont révélées après une ANOV univariée. Le classement des moyennes en groupes homogènes par ordre croissant est effectué selon le test de Newman-Keuls au seuil de 5%. Les moyennes appartenant au même groupe sont affectées de la même lettre et ne sont pas significativement différentes.

III - RÉSULTATS

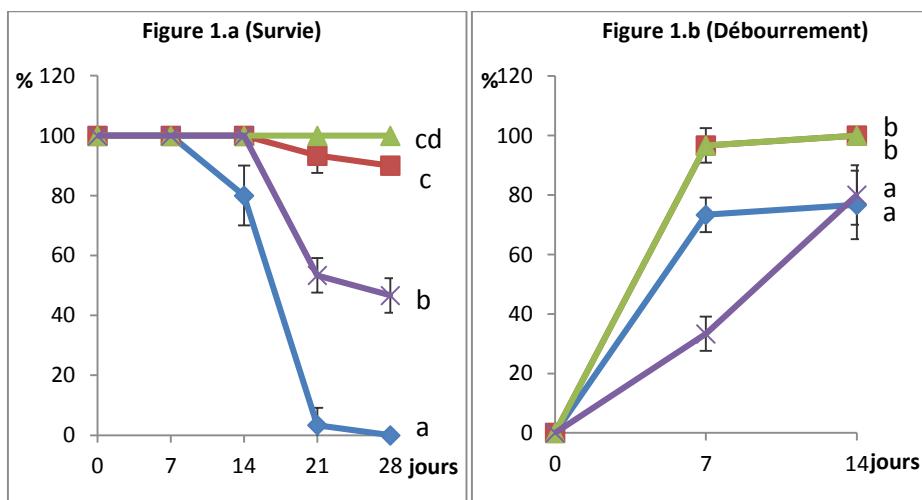
III-1. Effet de la concentration en fer sur le comportement morphogénétique des explants en fonction du temps.

L'absence de fer entraîne une chute progressive du taux de survie entraînant la mort de tous les explants au bout de 21 jours. Une diminution de moitié de la teneur en fer n'affecte pas de façon significative la survie des explants. Par contre le doublement de la teneur en fer induit une baisse de 50% du taux de survie des explants au 28^{ème} jour (*Figure 1a*) contrairement aux témoins qui survivent tous. Ceci montre que la teneur en fer a une incidence directe sur la survie des explants. La reprise des explants est aussi affectée par la teneur en fer du milieu (*Figure 1b*). En absence de fer, 80% des explants débourent dès la première semaine. Le taux de débourrement passe à 100% au 14^e jour puis chute à 0% au 21^e jour suite à la nécrose de tous les explants. Une diminution de moitié de la teneur en fer du milieu, n'affecte pas la reprise des explants. Le taux de reprise des essais est comparable à celui des témoins. Sur un milieu deux fois plus concentré en fer on note un ralentissement de la reprise des explants.

Au début de la culture, seulement 30% des explants débourrent. Ce taux est de 100% dès la troisième semaine de culture et reste constant (**Figure 1. b**). En absence de fer, les symptômes de la chlorose apparaissent dès le débourrement des explants. Une diminution de moitié de la teneur en fer induit également la chlorose chez tous les explants à partir du 14^{ème} jour (**Figure 1. c**). Ces observations sont confirmées par les résultats du dosage des chlorophylles totales. En effet, les teneurs en chlorophylles chez les témoins et chez les explants cultivés sur un milieu dont la concentration en fer est doublée ne sont pas significativement différentes, alors que les différences sont significatives en absence totale de fer ou de la réduction de sa teneur (**Tableau 3**). Il a été observé que la chlorose n'affecte que les feuilles âgées jusqu'au 21^{ème} jour mais au-delà de cette période, toutes les feuilles sont sévèrement atteintes dès leur apparition. L'enracinement est également affecté par les variations de teneur en fer du milieu. On remarque une baisse du taux d'enracinement en absence du fer et aussi quand sa concentration est doublée. Par contre, sa réduction de moitié n'affecte significativement pas l'enracinement. (**Figure 1d**)

Tableau 3 : Teneur en chlorophylles totales des explants en fonction de la teneur en fer du milieu (Moyenne ± écart-type sur 10 explants en trois répétitions. abc : groupes homogènes au seuil de 5%).

	Fe 0	Fe/2	Fe 1	Fe 2
Chlorophylles totales (mg g ⁻¹ de poids frais)	0,198 ± 0,010 c	0,905 ± 0,031 b	1,298 ± 0,017 a	1,303 ± 0,013 a



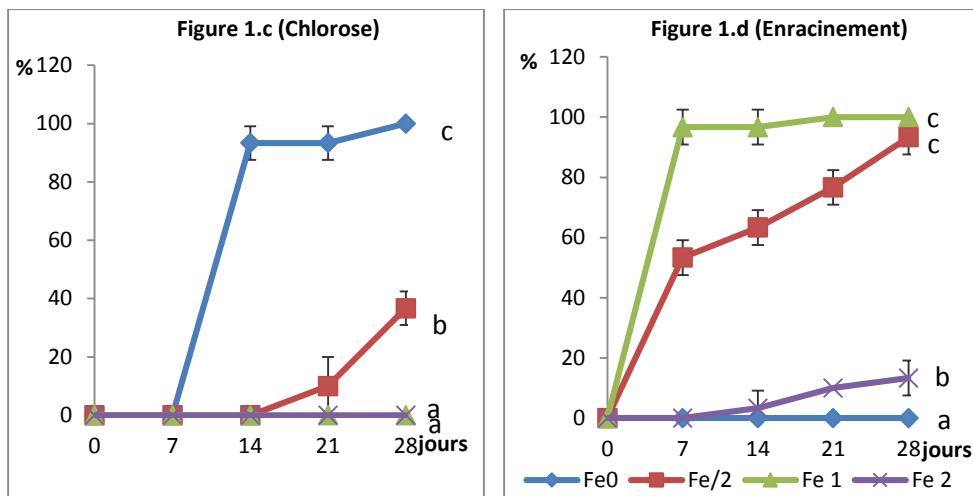


Figure 1 : Effet de la concentration en FeEDTA sur la réactivité in vitro des explants d'*Ocimum gratissimum* cultivés sur milieu MS modifié. Effet de la concentration en fer sur le taux de survie des explants (**Figure 1a**), sur le taux de débourrement des explants survivants (**Figure 1b**), sur le taux de chlorose des explants (**Figure 1c**), sur le taux d'enracinement des explants (**Figure 1d**)

III-2. Effet de l'azote minéral sur le développement morphogénétique des explants en fonction du temps

Les résultats montrent qu'en absence d'azote ou en présence de nitrate seul comme source d'azote, les explants ne survivent pas, contrairement aux explants cultivés en présence d'ammonium seul ou en association avec le nitrate (**Figure 2a**). Toutefois tous les explants débourent sauf ceux cultivés en présence de nitrate seul qui montrent un taux de débourrement de 50% (**Figure 2b**). La **Figure 2c** présente des résultats qui montrent une augmentation, dans le temps, du nombre de vitroplants atteints de chlorose en présence de nitrate seul ou en absence totale d'azote minéral. Quelques cas de chlorose sont également observés en présence d'ammonium seul contrairement aux témoins. Si la **Figure 2c** ne présente que des taux de chlorose, le **Tableau 4** par contre expose les teneurs réelles en chlorophylle totales, donnant une idée plus précise du niveau de chlorose. Ainsi on remarque un gradient croissant de la teneur en chlorophylles totales allant de 0.54 mg g^{-1} en absence d'azote, 0.9 mg g^{-1} en présence de nitrate, 1.1 mg g^{-1} en présence d'ammonium et enfin de 1.3 mg g^{-1} avec l'association des deux formes d'azote minérale.

L'organogenèse racinaire est aussi affectée par la forme d'azote. On remarque que les témoins s'enracinent tous alors qu'on note des taux d'enracinement de 53% en absence d'azote, de 30% en présence de nitrate ou d'ammonium au bout des 28 jours de culture (*Figure 2d*).

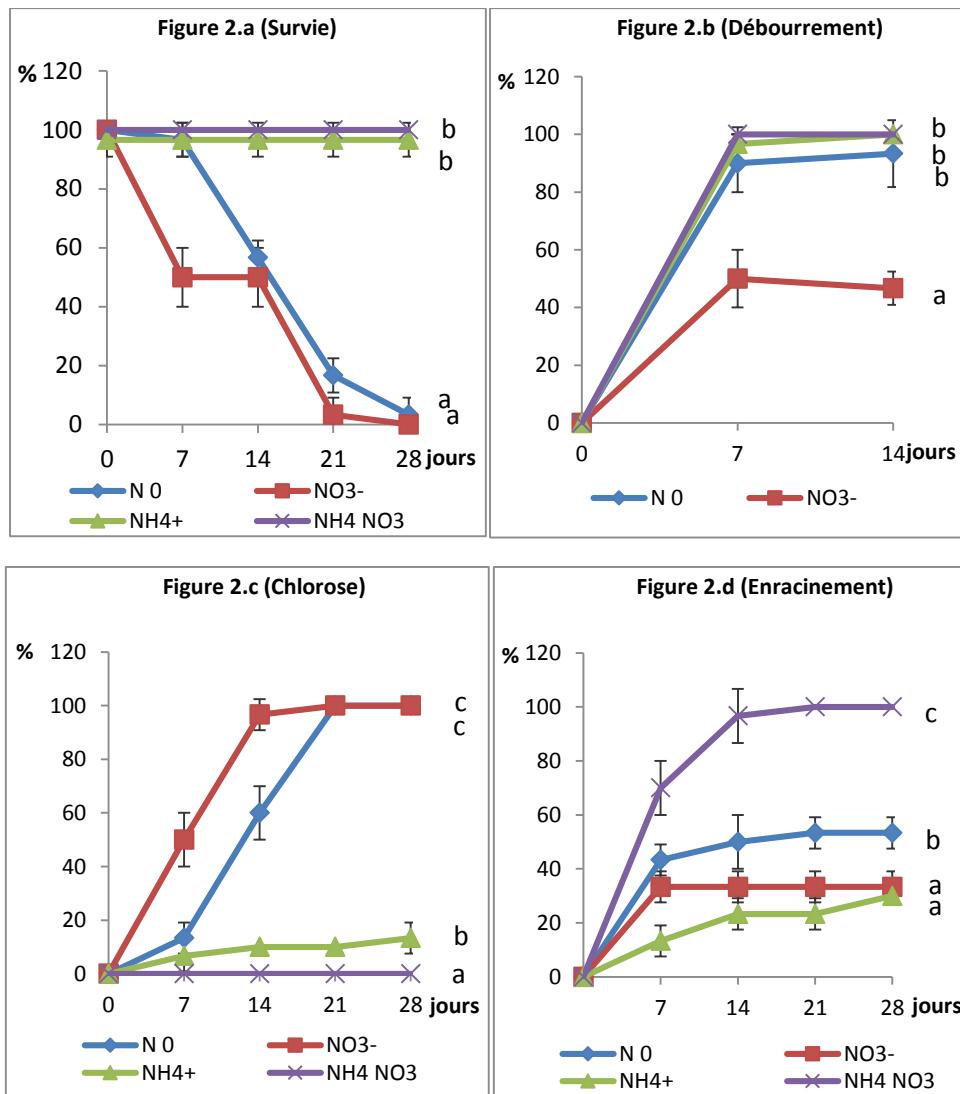


Figure 2 : Effet de la forme d'azote minérale sur la réactivité in vitro des explants d'*Ocimum gratissimum* cultivés sur milieu MS modifié. Effet de la forme d'azote sur le taux de survie des explants (*Figure 2.a*), sur le taux de débourrement des explants survivants (*Figure 2.b*), sur le taux de chlorose des explants (*Figure 2.c*), sur le taux d'enracinement des explants (*Figure 2.d*)

Tableau 4 : Teneur en chlorophylles totales des explants en fonction de la forme d'azote minérale (Moyenne \pm écart-type sur 10 explants en trois répétitions. abc : groupes homogènes au seuil de 5%).

	N 0	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NH ₄ NO ₃
Chlorophylles totales (mg.g ⁻¹ de poids frais)	0,548 \pm 0,078 a	0,930 \pm 0,051 b	1,105 \pm 0,067 c	1,358 \pm 0,115 d

IV - DISCUSSION

L'azote représente l'un des éléments dont l'influence est prépondérante sur l'organogenèse. Cependant la forme d'azote minéral disponible dans le milieu s'est avérée être un facteur déterminant. Quand bien même certaines espèces préfèrent le nitrate à l'ammonium [10], il n'en est pas ainsi chez *Ocimum gratissimum*. Nos travaux montrent que *Ocimum gratissimum* affiche une bonne caulogenèse en présence de NH₄⁺ comme seule source d'azote minéral. Cao *et al.* [11] ont montré que chez plusieurs espèces, la croissance est sévèrement inhibée par NH₄⁺ en absence de K⁺, alors que l'addition de faibles quantités de ce dernier cation supprime certains des effets toxiques. Selon nos résultats, la survie et le débourrement des vitroplants ne sont pas affectées significativement par NH₄⁺. Bien que nos tests n'aient pas été effectués en absence de K⁺, avec un rapport [NH₄⁺] / [K⁺] = 1 pour le témoin contre 3 pour le milieu test NH₄⁺, la présence de NH₄⁺ seul inhibe fortement la rhizogénèse. Mais dans cette action peuvent également être impliqués les ions Cl⁻ et SO₄²⁻ dont les concentrations atteignent des valeurs très élevées (4.8 et 3.52 méq L⁻¹ dans le témoin contre 24.8 et 63.52 méq L⁻¹ respectivement, dans le milieu test NH₄⁺).

Cependant, on sait que Cl⁻ est aisément absorbé par les racines, contrairement au SO₄²⁻, et facilite l'absorption de K⁺ mais surtout de NH₄⁺; celui-ci interférant fortement avec l'absorption de K⁺ [12]. Ces situations expliquent l'inhibition de la rhizogénèse. Contrairement à NH₄⁺, NO₃⁻ n'épargne aucun des paramètres de croissance étudiés. La survie, le débourrement et l'enracinement sont fortement inhibés par sa présence comme seule source d'azote. Les effets préjudiciables relevés sont encore plus marqués qu'en présence de NH₄⁺ seul. NO₃⁻ est surtout absorbé en co-transport avec les protons, mais lorsque la teneur du milieu en K⁺ est élevée, son absorption au détriment de H⁺ n'est pas à exclure. Dans ce cas les concentrations de K⁺ et NO₃⁻ atteignent des seuils toxiques et pourraient entraîner des perturbations physiologiques.

Nos travaux montrent l'importance de la concentration en fer du milieu dans la réussite d'une bonne culture *in vitro* d'*Ocimum gratissimum*. En absence de fer, les vitroplants dépérissent tous, n'ayant pas débourré et étant incapables d'induire une bonne organogenèse. Le fer intervient dans la synthèse d'enzymes-clef du métabolisme, son absence est donc une cause de perturbations métaboliques [13 ; 10], affectant la survie même des plants. De plus il est relevé une inhibition de la rhizogénèse par les concentrations élevées en fer du milieu. L'hypothèse d'une toxicité de cet élément à cette concentration pourrait être évoquée pour rendre compte de ce phénomène. La chlorose, palissement des feuilles tirant sur le jaune, par suite de l'arrêt de la synthèse de la chlorophylle, n'est pas spécifique à la carence en fer ou en azote, mais elle n'en demeure pas moins l'un des symptômes caractéristiques.

La chlorose ferrique survient principalement sur les sols calcaires où l'ion nitrate est la forme exclusive d'azote dans la solution du sol, due à une augmentation de la nitrification [14] et à la volatilisation de NH₃ [15]. Comme le montrent nos résultats, la forme d'azote minéral influence clairement la morphogénèse des plants. L'absence totale d'azote est cause d'une chlorose sévère et précoce chez tous les vitroplants de *O. gratissimum*. Ceci s'explique par un déséquilibre dû à la nutrition azotée par rapport à la photosynthèse, ce qui entraîne un rapport C/N trop élevé [11]. De façon générale, la carence azotée se traduit par des plants chétifs et chlorotiques chez la plupart des espèces comme il a été démontré chez des plantules de *Allium sativum* L [16]. Nos résultats confirment ce fait en montrant que *O. gratissimum* ne fait pas exception à la règle.

Sur milieu avec NH₄⁺ comme seule source d'azote, le taux de chlorose relevé chez *O. gratissimum* est faible durant la culture. Les ions NH₄⁺ représentent alors la forme d'azote minéral favorable à une synthèse de la chlorophylle chez *O. gratissimum*. Ceci est en accord avec les résultats de Harald *et al.*, [17]. Travaillant sur les feuilles de tournesol, ces auteurs ont montré que NH₄⁺ seul (ou NH₄⁺NO₃⁻) comme seule source d'azote n'induisait aucun signe de chlorose chez cette espèce. En milieu contenant des ions NH₄⁺, le pH apoplasmique est faible, favorisant la réduction du fer et son transport à travers la membrane. Les cultures effectuées en absence de fer montrent un taux élevé de chlorose, tous les vitroplants étant atteints dès la deuxième semaine. Le fer joue un rôle important comme transporteur d'électrons dans plusieurs enzymes notamment la nitrate réductase, la ferredoxine, la nitrogénase [18 ; 14], et aussi dans la synthèse de la ribonucléotide réductase [19]. Sa carence engendre des perturbations du métabolisme et de la synthèse de la chlorophylle, conduisant à la chlorose ferrique.

Une augmentation de la concentration en fer n'est pas source de chlorose, par contre quelques cas de chlorose tardive ont été enregistrés avec une réduction de moitié de la concentration en fer du milieu. *Ocimum gratissimum* peut avoir une croissance normale avec des doses en fer légèrement inférieures à celles habituellement utilisées dans le milieu témoin. Avec les ions nitrates comme source d'azote, *O. gratissimum* présente des symptômes similaires à ceux d'une carence en fer, tous les explants montrant une chlorose sévère. Nos résultats sont en accord avec ceux de Mengel et Geurtzen [6] qui ont rapporté que les nitrates provoquaient une chlorose, conduisant à une nécrose, alors que ni l'ammonium ni le nitrate d'ammonium n'induisaient cette anomalie. Par ailleurs, l'assimilation des nitrates nécessite obligatoirement leur réduction en ammonium avant leur incorporation dans les molécules organiques.

D'une part, il se peut que *O. gratissimum* ne possède pas la machinerie enzymatique nécessaire à une réduction efficace de NO_3^- , ce qui coûte en énergie ; d'autre part la présence de cet anion seul dans l'apoplasmme provoque une augmentation du pH apoplasmique. Or un pH apoplasmique élevé inhibe la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} , condition indispensable pour son transport à travers le plasmalemme vers le cytoplasme. Dans ces conditions, les vitroplants présentent les symptômes d'une carence en fer bien que ce dernier soit présent dans le milieu de culture. C'est également ce qu'ont montré Harald *et al.* [17], en faisant observer que la chlorose ferrique induite par NO_3^- pouvait être levée en remplaçant le nitrate par l'ammonium sans apport extérieur de fer. Nos résultats vont dans le même sens et confirment que NO_3^- induit toujours une chlorose ferrique par perturbation de l'assimilation du fer.

V - CONCLUSION

Les effets de la concentration en fer et de la forme d'azote minérale ont été démontrés chez *O. gratissimum*. Cet article montre bien l'importance de la concentration en fer et prouve l'efficacité du milieu de base MS dans le développement morphogénétique *in vitro* de cette espèce. Il en ressort que *O. gratissimum* est une espèce qui ne tolère pas les sols alcalins mais se développerait mieux en présence de l'ion nitrate en association avec l'ion ammonium.

RÉFÉRENCES

- [1] - J MARGARA. Paris, France : INRA (1982), 262 p.
- [2] - M R CARTER. Plant Soil; 56 (1980): 291
- [3] - K MENGEL, N MALISSIOVAS. Vitis. 20: (1981) 235-243
- [4] - M P SAHU, D D SHARMA, G L JAIN, H G SINGH. Hortic Sci. 62: (1987) 391-394
- [5] - M AKTAS, M VAN EGMOND. Plant Soil: (1979) 257-274
- [6] - K MENGEL, G GEURTZEN. Physiol Plant. 72: (1988) 460-465
- [7] - K MENGEL, R PLÄNKER, B HOFFMANN. Plant Nutr. 17: (1994) 1053-1065
- [8] - T MURASHIGE, F SKOOG. *Physiol Plant.* 15: (1962) 473–497
- [9] - D ARNON,. Plant Physiology 24: (1949) 1- 15
- [10] - R HELLER, R ESNAULT, C LANCE. Ed. Masson 267p. (1989)
- [11] - Y CAO, A D M GLASS, N M CRAWFORD. Plant Physiol 102: (1993) 983-989
- [12] - G E SANTA-MARIA, C H DANNA, C CZIBENER. Plant Physiol. 123: (2000) 297-306
- [13] - J KRÜH. Biochimie. Ed. Hermann. 269p (1989)
- [14] - P R DARAH, P H NYE, R E WHITE. J Soil Sci. 37: (1986) 479-484
- [15] - S PARAMASSIVAM, A K ALVA. Soil Sci. 162: (1997) 447-453
- [16] - B TISSERAT; J MANTHEY. A. Journal of plant nutrition, vol. 19, n°1, pp. (1996) 129-143
- [17] - U K HARALD, B HOFFMANN, K MENGEL. Plant Physiol. 121: (1999) 1069-1079
- [18] - N TERRY, J ABADIA. J Plant Nutr. 9: (1986) 609-649
- [19] - REICHARD P. Science.260: (1993) 1773-1777