

ELABORATION D'UNE TECHNIQUE DE REGENERATION DE L'ACTINIDIA CHINENSIS PAR EMBRYOGENESE SOMATIQUE

**CHAOUIA C. ¹, VALLES V. ², SNOUSSI S. A. ³, SAIDI F. ⁴,
BENREBIHA F. ⁵, ABDULHUSSAIN M. S. ⁶, GHEZALI H. ⁷**

^{1,3,5,7} *Laboratoire de Physiologie et d'Amélioration des plantes. Département
d'Agronomie. Faculté des Sciences Agronomiques Vétérinaires et Biologiques.*

Université SAAD DAHLAB – BLIDA

² *Laboratoire de physiologie végétale.*

⁴ *Laboratoire de Biologie Végétale. Département de Biologie. Faculté des
Sciences Agronomiques Vétérinaires et Biologiques.*

Université SAAD DAHLAB – BLIDA

⁶ *Laboratoire de Génétique. Faculté des Sciences Médicales. Université SAAD
DAHLAB – BLIDA*

Résumé.

Dans des études réalisées sur des espèces ligneuses, les embryons sont régénérés à partir des tissus de folioles ou des segments des pousses avec passage ou non par cal en présence du 2,4D sur un milieu de MURASHIG et SKOOG (Walali, 1993). Dans notre étude, l'objectif visé est l'étude de l'influence du matériel végétal de l'Actinidia sur la réponse à l'embryogénèse somatique où très peu de travaux ont été réalisés. On a observé l'induction puis la maturation des embryons somatiques produits. Les graines utilisées, en nombre de trois cent proviennent de la Station Expérimentale Boufarik (Algérie) et de la Station de Jourdain (Toulouse, France). Ces graines sont mises à germer dans des boîtes de Pétri après désinfection. Après 25 jours, on a récolté des folioles, qui sont ensuite sectionnées en segments et placées sur un milieu d'induction d'embryogénèse somatique M2 composée MS+25 μ M (2,4D) à raison de 4 explants par boîte de Pétri. Un traitement de développement et de maturation des embryons somatiques formés et ensuite appliqué sur tous les explants. Un premier repiquage à lieu sur le milieu M3 (MS+750 mg Glutamine) suivi d'un deuxième repiquage M4 (MS+5,37 μ M NAA+ 2,5 μ M AG3). La calogénèse s'est manifestée pour chaque type d'explant et pour chaque durée d'exposition au 2,4 D après un transfert dans un milieu enrichi en Glutamine mais dépourvu de 2,4 D. L'effet stimulant du 2,4 D pour la calogénèse est inhibiteur d'embryogénèse somatique et il a été observé aussi par Tetu et al. (1987) chez la betterave.

Mots clés : Calogénèse, inhibiteur, embryogénèse, milieu, embryon.

INTRODUCTION

La technique de régénération exploitée dans ce travail est l'embryogenèse somatique directe et indirecte de *l'Actinidia chinensis* PL. Une vingtaine d'espèces ligneuses est capable de révéler une potentialité embryogène souvent décelée à partir d'embryons zygotiques (Williams et Maheshwaran, 1986). Des embryons somatiques ont été également obtenus avec des essences forestières telles que le chêne vert (*Quercus ilex*) (Féraud- Keller et Espagnac, 1988). Des régénérations ont été obtenues avec une vingtaine de cultivars et porte- greffe de pommier (*Malus pumila*) (Jones, 1991). Les difficultés de multiplication par voie sexuée et végétative de *l'Actinidia* ont orienté notre travail vers la micropropagation

Cette étude vise à étudier la possibilité de régénération de *l'Actinidia* par embryogenèse somatique directe et indirecte à partir d'une induction au 2.4-D. Dans la majorité des cas, chez les ligneux les embryons sont régénérés à partir de tissus de folioles ou de segments de pousses avec passage ou non par cal, en présence du 2.4-D sur un milieu de Murashige et Skoog (Walali, 1993). Rajasckaran et Mullins (1985) signalent que pour la vigne une cytoKinine (BAP ou K) est nécessaire au développement des embryons jusqu'au stade cotylédonaire. Cette constatation est confirmée par Féraud- Keller et Espagnac (1988) pour le chêne vert. L'objectif visé est l'étude de l'influence du matériel végétal de *l'Actinidia* sur la réponse à l'embryogenèse somatique où très peu de travaux ont été entrepris. Les essais portent sur l'induction suivie de la maturation des embryons somatiques produits.

MATERIEL ET METHODES

1.1- Graines

Les graines utilisées sont extraites à partir des fruits mûrs de la variété Hayward. Afin de préparer la levée de la dormance, les graines ont subi un traitement au froid à une température de 4 à 5°C +/- 1°C pendant deux semaines. Deux lots de 300 graines chacun de provenance de la station expérimentale de Boufarik et de la station de Jourdain (Purpan - Toulouse) ont été étudiés.

1.2- Désinfection, Germination et repiquage

L'expérimentation a été menée sous une température de 25°C +/- 1°C et une photopériode de 16 heures d'éclairage blanc et 8 heures d'obscurité dans la chambre de culture. Les graines initialement désinfectées par trempage de 10 minutes à l'alcool éthylique à 70° et ensuite dans l'hypochlorite de sodium à l'eau distillée stérile. Les graines sont mises à germer dans des boîtes de Petri (20 à 30 graines / boîte) munies d'un papier filtre humecté avec 10 ml d'eau distillée. Au bout de 25 jours, période correspondant à l'apparition de foliole, les vitro- semis sont transférés dans des tubes à essais contenant 20 ml du milieu (M₁) de Murashige et Skoog (1962). Le milieu M₁ permet aux vitro- semis de poursuivre leur développement.

1.3- Embryogenèse somatique directe

Les entre- nœuds et les jeunes folioles sont prélevées à partir de plantules de 8 semaines. Ils sont sectionnés en segments et sont placés sur un milieu d'induction d'embryogenèse somatique (M_2 : MS +25 μ M (2.4-D)) à raison de 4 explants par boîte de Pétri. Deux durées d'exposition à 25°C +/- 1°C sous un éclairage blanc fourni durant 16 heures quotidiennement à l'aide de néons de 36 W. l'intensité de l'éclairage varie de 38 à 62 μ mol/m² /sec. (6 boîtes par durée de traitement sont utilisées) (tableau1).

Tableau 1

Traitement d'induction d'embryogenèse somatique directe
(cas des entre- nœuds et des folioles).

Milieu	Durée
M_2 : MS +25 μ M (2.4-D)	7 jours
M_2 : MS +25 μ M (2.4-D)	14 jours

Un traitement de développement et de maturation des embryons somatiques éventuellement formés est ensuite appliqué à tous les explants. Un premier repiquage a lieu sur le milieu M_3 (MS + 750 mg glutamine) suivi d'un deuxième repiquage sur le milieu M_4 (MS + 5.37 μ M NAA + 2.5 μ M AG₃), 12 semaines plus tard. Les 2 cultures se font dans les mêmes conditions environnementales que lors du traitement d'initiation. La glutamine présente dans le milieu M_3 est ajoutée avant l'autoclavage. La AG₃ présente dans le milieu M_4 est ajoutée après l'autoclavage à l'aide d'une seringue ajoutée d'un filtre (0.2 μ m).

1.4- Embryogenèse somatique indirecte

• Folioles d'Actinidia, origine : Boufarik (Algérie)

Les 2 ou 4 folioles les plus développées sont excisées après 4 semaines pour un premier groupe de plantules et après 12 semaines pour le deuxième groupe. Pour les deux (2) périodes de prélèvement, des folioles ayant une dimension sensiblement identique sont excisées. Les explants sont mis en culture sur les milieux d'induction de callogenèse et d'embryogenèse M_5 (MS+ 4.5 μ M (2.4-D) + 4.6 μ M (kin) + 8g/l d'Agar) et M_6 ayant les mêmes concentration avec 12g/l d'Agar. Nous avons utilisé 5 boîtes de Petri par traitement soit 20 explants par traitement et par milieu.

Tableau 2

Traitement d'induction de la callogenèse et embryogenèse somatique sur feuille de plantules issues de graines de Hayward originaires de la région de Boufarik.

Exposition	Obscurité	Photopériode 26+/- 1°C
Milieu	M_5	M_5
	M_6	M_6

Des traitements de développement et de maturation des embryons somatiques éventuellement formés sont appliqués aux cals de foliole du premier et deuxième groupe. Le milieu M₇ et M₈ contiennent de l'ABA qui est ajouté au milieu de culture après l'autoclavage à l'aide d'une micropipette (0.2 μm). Les cals mis en culture sont au nombre de 4 par boîte de Pétri. Le taux de croissance relatif moyen (RGR) est calculé sur la base du poids frais des cals pour chaque milieu d'induction.

$$\text{PRG} = (\text{Ln}(\text{Fwf}) - \text{Ln}(\text{Fwi})) / t.$$

Avec Fwf = poids frais final.
Fwi = poids frais initial.
t = durée de culture.

- Folioles d'Actinidia, origine : Purpan (Toulouse - France)

Les graines utilisées proviennent de la station Jourdain de France. La méthode de désinfection, la germination se fait dans des conditions de culture identique que précédemment. Après 4 semaines les deux folioles les plus développées sont excisées et sont stérilisées. La mise en culture se fait sur deux milieux d'induction de callogénèse et d'embryogénèse somatique M₁ et M₂.

Tableau 3

Traitement d'induction de la callogénèse et embryogénèse somatique sur feuille de plantules issues de graines de Hayward originaires de la région de Jourdain.

Exposition	Photopériode 26+/- 1°C
20 explants/milieu	M ₅
	M ₆

Les observation macro et microscopiques des cals ainsi que le calcul du RGR moyen sur la base du poids frais des cals constitue des résultats des traitements d'induction.

Un prélèvement d'explants pour l'étude histologique ainsi qu'une observation macroscopique des explants est effectuée avant chaque repiquage.

RESULTATS

2.1- Embryogénèse somatique directe

- Entre- noeuds

Les explants des deux séries (exposition de 7 jours ou 14 jours au (2.4-D), 25 μM, suite au traitement d'induction ont présenté un aspect quasi identique. Des boursoufflures sont apparues à leur surface, plus marquées cependant suite à l'exposition

de 14 jours. Le traitement de développement sur le milieu M_3 (MS+750 μ g de glutamine) a favorisé l'apparition de cal sur 95% des explants et l'apparition de racines sur 58% des cals, après une exposition de 7 jours à 25 μ M de 2.4-D. A l'exposition 14 jours, tous les explants ont produit du cal et 20% de ces derniers ont différencié des racines. Le traitement suivant avec le milieu M_4 (MS+5.37 μ M Na+2.5 μ M AG₃) n'a pas modifié le mode de développement des explants, qui ont continué à former des racines et du cal (qui dans de nombreux cas, arrêtaient de croître et brunissaient).

- Folioles

Le milieu d'induction a eu très peu d'effets visibles au niveau des explants, et cela quelle que soit la durée d'induction. Seules quelques légères boursoufflures et déformations ont été observées. En fin de traitement de développement sur le milieu M_3 , nous avons noté 45% d'explants avec un cal (brun dans pratiquement tous les cas) et 15% des cals avec des racines, pour une durée d'induction de 7 jours. Les explants ayant subi 14 jours d'induction ont eu une callogenèse plus importante puisque 80% des explants ont formé un cal brun - beige. Cependant, aucun des cals formés n'a produit de racines. Le milieu M_4 a favorisé le développement de quelques petites racines sur 25% des cals issus des explants induits pendant 14 jours au détriment de la croissance des cals. Les cals issus d'explants induits pendant 7 jours n'ont pas évolués non plus mais il n'y a pas eu de formation de racines supplémentaires.

2.2- Embryogenèse somatique indirecte

-Folioles issues de plantules de 8 semaines (Boufarik)

La formation de cal sur le milieu d'induction a été beaucoup plus efficace sous une photo période (PP) de 16 heures. En effet, les taux de callogenèse suivants ont été observés :

- 60% des explants pour le milieu d'induction M_5 (MS+2.4-D, 4.5 μ M; Kin, 4.65 μ M; 8g/l Agar), PP de 16 heures.
- 65% des, explants pour le milieu d'induction M_6 (MS+2.4-D, 4.5 μ M; Kin, 4.65 μ M; 12g/l Agar) PP de 16 heures.
- 25% des explants pour le milieu d'induction M_5 , à l'obscurité.
- 15% des explants pour le milieu d'induction M_6 , à l'obscurité.

Dans le dernier cas, des infections bactériennes nous ont contraint à éliminer les cals. L'aspect de cals exposés à une PP de 16 heures pendant l'induction était très semblable pour les deux milieux. Ils étaient verts, beiges et bruns, très friables, avec souvent de petits points verts foncés à l'intérieur du cal. Les cals sur M_6 étaient, cependant, beaucoup plus secs en apparence à cause de la forte teneur en Agar et donc du potentiel hydrique plus faible. Des racines se sont aussi développées sur le milieu. Les cals à l'obscurité étaient beiges et très friables. La figure 1 présente les RGR moyens sur 3 sub- culture.

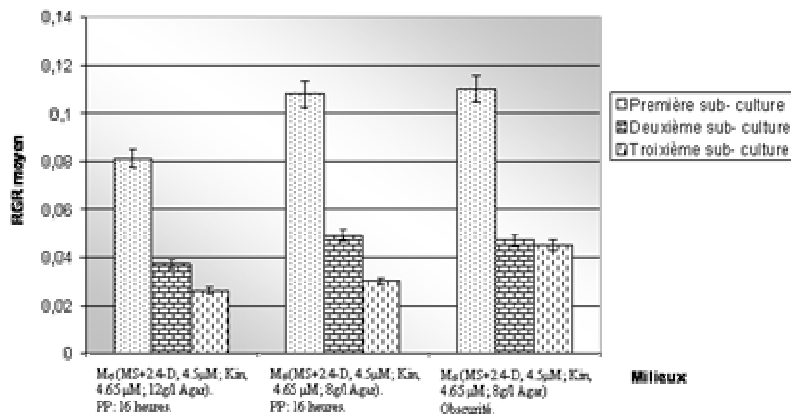


Figure 1: Taux de croissance relatif (RGR) moyen de cals issus de feuilles de plantules âgées de 4 semaines sur milieux d'induction. Le RGR est calculé sur la base du poids frais.

Folioles issues de plantules de 16 semaines (Boufarik)

Les explants prélevés sur des plantules de 16 semaines ont montré une compétence légèrement supérieure pour la callogenèse à celle des feuilles de plantules de 4 semaines (figure 2).

En effet, nous observons 75% d'explant avec cal sur le milieu d'induction M₁ et 80% d'explants avec cal sur le milieu d'induction M₂. Cependant, les cals formés se sont avérés beaucoup moins volumineux et plus pâles avec seulement quelques points verts. Le RGR moyen présenté dans la figure 6 et défini au cours de la première sub-culture est supérieure dans le cas du milieu de culture M₁ ce qui confirme les résultats obtenus.

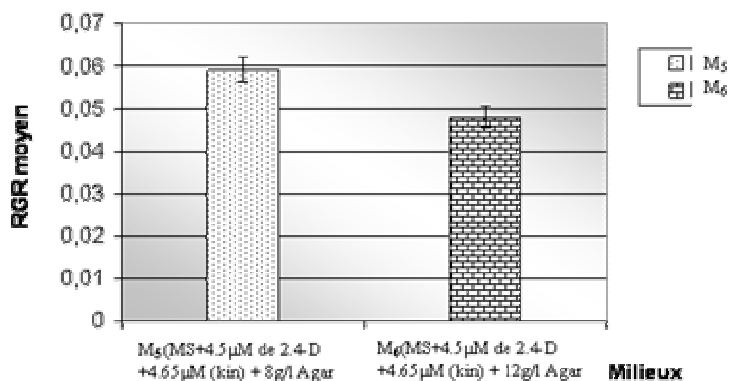


Figure 2: Taux de croissance relatif (RGR) moyen des cals issus de feuilles de plantules âgées de 16 semaines sur milieux d'induction.

Folioles originaires de la région de Purpan (Toulouse)

De nombreuses cultures ont dû être éliminées suite à un important problème d'infections fongiques et bactériennes pendant la culture des folioles. Sur les boîtes de Petri non contaminées, des taux de callogenèse de 45% pour le milieu M_5 et 50% pour le milieu M_6 ont été observés. Les cals formés étaient peu volumineux et de couleur beige à vert avec parfois des points verts foncé au centre. Le RGR moyen des cals sur ces milieux d'induction, qui a été suivi sur les 2 sub-cultures (Figure 3) est sensiblement le même sur les deux milieux.

DISCUSSION

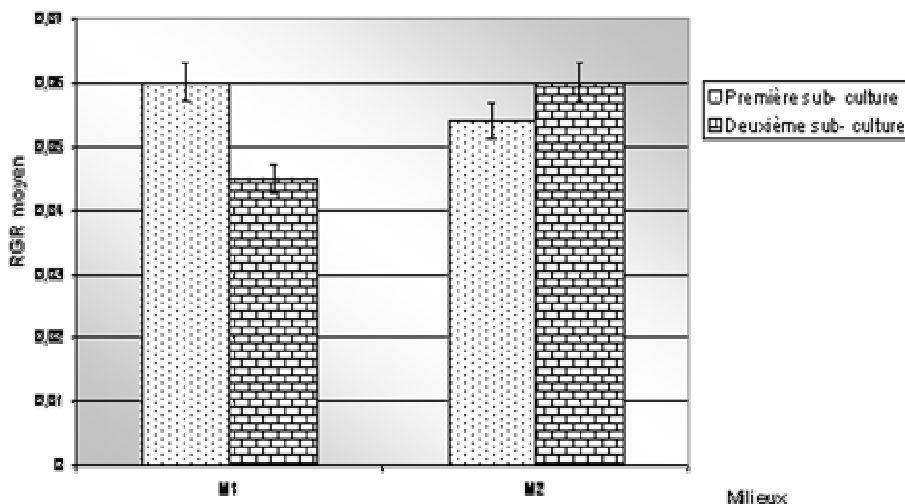


Figure 3. Taux de croissance relatif (RGR) moyen de cals issus de feuilles de plantules issues de graines récoltées sur des fruits dans la région de Toulouse sur milieux d'induction.

3.1- Embryogenèse somatique directe

- Entre- noeuds

Les coupes histologiques effectuées suite au traitement de développement et de maturation dans 2 explants par durée d'induction, n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de structures susceptibles d'avoir un potentiel embryogène. Par contre deux amas de cellules méristématiques plus ou moins bien délimités ont été observés au niveau des cals formés par les explants avec une durée d'induction de 14 jours (figure 4 et 5).

Nous n'avons donc pas affaire à de l'embryogenèse somatique directe.

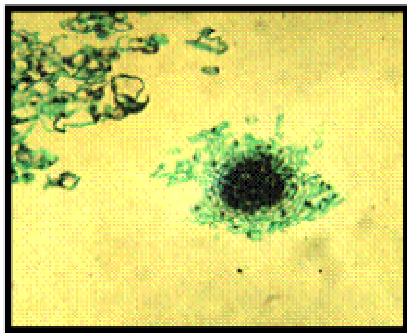


Figure 4: Amas méristématique au sein du cal formé sur un entre-nœud de plantule âgée de 25 jours. L'explant a passé 14 jours sur le milieu contenant 25 μ M de 2,4-D (M_2) puis 8 semaines sur un milieu dépourvu de régulateurs de croissance mais contenant 750 μ g/l de glutamine (M_1).

Grossissement : 185x

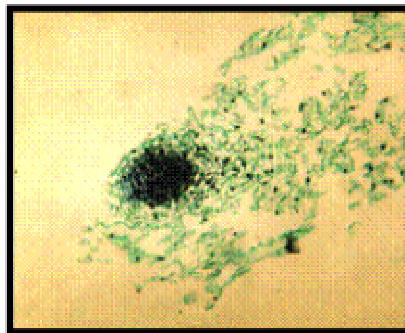


Figure 5 : Autre amas méristématique au sein du cal formé sur un entre-nœud de plantule âgée de 25 jours. L'explant a passé 14 jours sur le milieu contenant 25 μ M de 2,4-D (M_2) puis 8 semaines sur un milieu dépourvu de régulateurs de croissance mais contenant 750 μ g/l de glutamine (M_1).

Grossissement : 175x

- Folioles

L'analyse histologique des explants prélevés après leur culture sur le milieu M_3 (MS+750 μ g de glutamine) n'a pas révélé de structures potentiellement intéressantes.

3.2- Embryogenèse somatique indirecte

-Folioles issues de plantules de 8 semaines (Boufarik)

En moyenne, le RGR le plus élevé est obtenu avec le milieu M_5 à l'obscurité. Nous observons une tendance générale à la diminution du taux de croissance relatif au fil des sub-cultures. Une analyse histologique a révélé la présence de masses méristématiques assez bien délimitées de forme ovale est en général au sein de 5 cals primaires sur 6 cultivés sur un milieu M_5 et dans 6 cals sur 7 sur le milieu M_6 , sous une PP de 16 heures. Deux de ces masses sont présentées sur les figures 6 et 7.

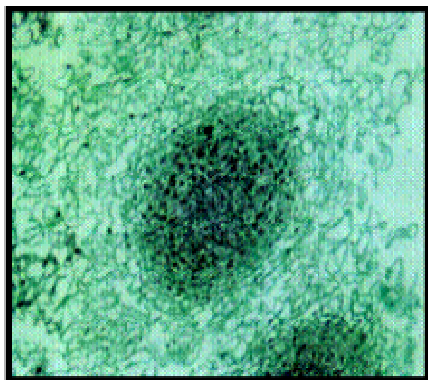


Figure 6 : Amas méristématique au sein du cal primaire induit sur des feuilles mises en culture sur le milieu MS + 4.5µM de 2,4-D + 4.65µM (kin) + 8g/l Agar (M₁) sous une photopériode de 16 heures. Les explants proviennent de plantules âgées de 4 semaines.

Grossissement : 155x

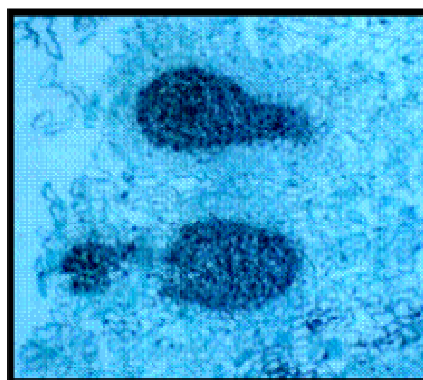


Figure 7 : Deux amas méristématiques au sein du cal primaire induit sur des feuilles mises en culture sur le milieu MS + 4.5µM de 2,4-D + 4.65µM (kin) + 12g/l Agar (M₂) sous une photopériode de 16 heures. Les explants proviennent de plantules âgées de 4 semaines.

Grossissement : 160x

Des cals primaires issus de milieux M₅ et M₆ à l'obscurité ont ainsi donné des masses méristématiques bien délimitées qui sont illustrées sur les figures 8 et 9.

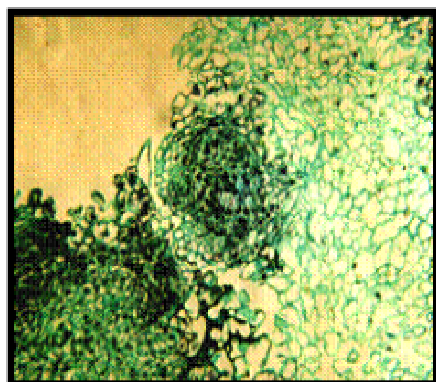


Figure 8 : Amas méristématique au sein du cal primaire induit sur des feuilles mises en culture sur le milieu MS + 4.5µM de 2,4-D + 4.65µM (kin) + 8g/l Agar (M₁) à l'obscurité. Les explants proviennent de plantules âgées de 4 semaines.

Grossissement : 150x

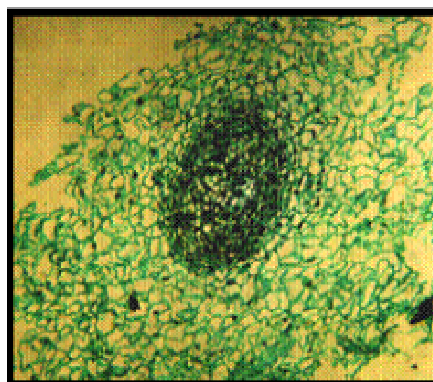


Figure 9 : Amas méristématique au sein du cal primaire induit sur des feuilles mises en culture sur le milieu MS + 4.5µM de 2,4-D + 4.65µM (kin) + 8g/l Agar (M₂) à l'obscurité. Les explants proviennent de plantules âgées de 4 semaines.

Grossissement : 165x

Parmi toutes ces structures observées de nombreux amas méristématiques très diffus étaient aussi visibles ainsi que des amas irréguliers suggérant un processus de « bourgeonnement ». Les traitements de développement et de maturation ont conduit à de nombreuses observations où toutes les cals observées étaient très friables. L'observation macroscopique des cals a été complétée par une analyse histologique à la fin de la quatrième sub-culture. Les observations microscopiques ont révélé la présence de structures diverses mais pas vraiment spécifique à chaque traitement. Parmi celles-ci, de nombreux amas méristématiques assez diffus avec parfois au centre des

trachéides et des fibres sont visibles. Des amas assez bien délimité similaires à ceux observés sur les milieux d'induction sont aussi observés. Les trachéides ont tendance à s'organiser en réseaux mais cette organisation n'est pas associée à une organogenèse caulinaire ou racinaire en développement. Une observation à fort grossissement montre une certaine dégénérescence des cellules méristématiques dont le cytoplasme est condensé. Parmi toutes les lames observées, aucun embryon en développement n'a été repéré.

-Folioles issues de plantules de 16 semaines (Boufarik)

L'analyse histologique confirme également les résultats obtenus avec les cals de feuilles de plantules de 4 semaines. En effet, des amas de cellules méristématiques assez bien délimités, de forme ovale, ont été observés suite aux 2 traitements d'induction (2 cals par traitement). Les Figures 10 et 11 illustrent ces amas méristématiques, une pour chaque milieu d'induction.

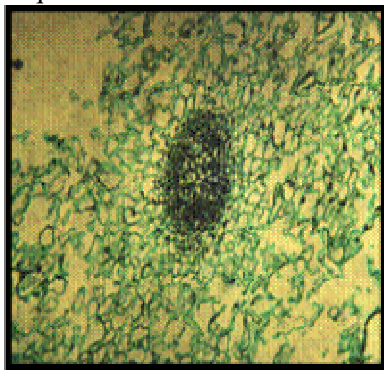


Figure 10 : Amas méristématique au sein du cal primaire induit sur des feuilles mises en culture sur le milieu MS + 4,5µM de 2,4-D + 4,65µM (kin) + 8g/l Agar (M₂) sous une photopériode de 16 heures. Les explants proviennent de plantules âgées de 12 semaines. Grossissement : 220x

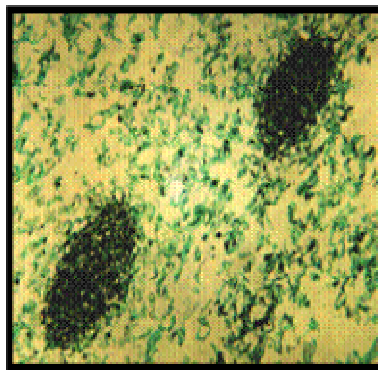


Figure 11 : Deux amas méristématiques au sein du cal primaire induit sur des feuilles mises en culture sur le milieu MS + 4,5µM de 2,4-D + 4,65µM (kin) + 12g/l Agar (M₂) sous une photopériode de 16 heures. Les explants proviennent de plantules âgées de 12 semaines. Grossissement : 210x

D'autres amas beaucoup plus diffus ont aussi été observés ainsi que des amas semblant bourgeonner. Les cals sont à nouveau très friables. Les traitements de développement et de maturation n'ont pas apporté d'important changements au niveau des structures présentes dans le cal. Nous observons moins d'amas méristématiques bien délimités. Aucun embryon somatique en développement n'a été observé.

-Folioles originaires de la région de Purpan (Toulouse)

L'étude histologique (2 cals par traitement) révèle qu'il n'y a pas d'embryons en développement. Seules des structures de forme ovale avec des cellules non-méristématiques à parois épaisses ont été observées.

CONCLUSION

La callogenèse s'est manifestée pour chaque type d'explant et pour chaque durée d'exposition au 2.4-D, après un transfert dans un milieu enrichi en glutamine mais dépourvu de 2.4-D. Dans chaque cas, les cals sont révélés plus abondants sur des explants ayant subi une exposition plus longue au 2.4-D, cependant les cals issus de la plus longue exposition ont montré un potentiel rhizogène plus faible. L'effet stimulant du 2.4-D pour la callogenèse et inhibiteur d'embryogenèse somatique directe a déjà été observé par Têtu et al. (1987) chez la betterave, et semble se confirmer dans notre cas. L'inhibition de la rhizogenèse lors de longues expositions pourrait aussi être liée à la forte concentration utilisée. En effet, BAHKI et LESLY (1980 in GEORGE, 1993) ont mis en évidence qu'une concentration élevée en 2.4-D avait un effet inhibiteur sur la capacité rhizogène de cals de tomate, même pour une durée d'induction d'un jour. Par contre, une concentration plus faible a favorisé la formation de racines seulement pour de longues périodes d'induction. TENNING et al. (1992) ont mis en évidence l'influence négative de l'âge de l'embryon zygotique en tant qu'explant pour de l'embryogenèse somatique directe chez la betterave.

Nous pouvons donc envisager un nouvel essai d'embryogenèse somatique directe avec des embryons somatiques immatures d'*Actinidia chinensis*.

Etant donné l'empirisme important attaché à ces essais en général, de nombreux autres protocoles pourraient cependant faire l'objet d'essais.

La présence d'amas méristématiques dans du cal d'entre-nœuds induits pendant 14 jours révèle un éventuel organogène de ces cals, qui pourrait servir pour la formation de racines mais ces masses pourraient aussi avoir un potentiel embryogène. Dans ce cas, on s'approche plutôt au contexte embryogenèse somatique indirecte. Les cals induits sur un milieu enrichi en 2.4-D et Kinétine, avec soit 8 ou 12g d'Agar par litre sous une photopériode de 16 heures, ont tous produit des amas méristématiques bien délimités de forme ovale en général. Cependant, nous ne possédons pas encore assez d'évidence pour affirmer le caractère embryogène de ces amas.

Les différents traitements de développement et de maturation ont à nouveau provoqué l'apparition de masses vertes, compactes à la surface ou au sein du cal qui n'ont pas abouti à une organogenèse caulinaire. Ces masses vertes pourraient indiquer une capacité organogène ou embryogène du cal.

Si les amas méristématiques présents au sein des cals sont véritablement embryogène, il est donc évident que ce sont les étapes de développement et de maturation des embryons somatiques qui sont limitantes. Pour contourner cet obstacle, le transfert sur un milieu dépourvu de régulateurs de croissance en fin d'étape d'induction pourrait être plus favorable au développement des masses pro-embryonnaires qu'un milieu contenant de la Kinétine, étant donné que ce premier se retrouve dans de nombreux protocoles d'embryogenèse somatique. Une autre possibilité serait d'augmenter le rapport cytokinine/auxine (GEORGE, 1993/1996).

La capacité embryogène d'un cal dépend souvent du génotype (BROWN et al., 1995) ce qui pourrait expliquer le contraste entre les résultats de l'analyse histologique réalisée pour les cals primaires originaires de la région de Boufarik et ceux originaires de la région de Purpan (France). L'effet du génotype peut aussi inter-réagir avec le milieu ou les conditions environnementales de la culture (BROWN et al. 1995). En conséquence,

il est probable que les exigences culturales des explants originaires de la région de Purpan soient différentes pour l'obtention d'amas méristématiques a caractère éventuellement embryogénique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- BARNA et WAKHLU 1995, Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature leaflets in chickpea. In vitro Cell. Deer. Biol. – Plant. 31: 137-139.
- 2- BROWN D.E.W; FINSTAD KI. Et WATSON E.M. (1995), Somatic embryogenesis in herbaceous dicots. In vitro embryogenesis in plants. Kluwer Academic publishers Dordrecht pp. 345-415.
- 3- CHAOUIA C. 1998, Etude des caractéristiques agro- biologiques de trois cultivars d'Actinidia : *Actinidia chinensis* PL. nouvellement introduits en Algérie. Th. Magister 180 P.
- 4- FERGUSON A.R. 1984 Kiwifruit A botanical review. Horticultural review. Vol.6 pp. 1-60
- 5- GEORGE E.F. (1993), Plant propagation by tissue Culture. Part 1: The technology. Exegetics Ltd, England. 574 P.
- 6- GEORGE E.F (1996), Plant propagation by tissue Culture. Part 2: In practice. Second edition Exegetics Ltd, England. pp 575-1361.
- 7- MERKELE S.A, PARROTT W.A, et FLINN B.S.(1995), Morphologic aspects of somatic embryogenesis In Thorpe, T.A(ed). In vitro embryogenesis in plant. Kluwer Academic publishers Dordrecht pp. 155-203.
- 8- MURASHIG T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physio Plant; 15: 473-497.
- 9- PIERIK R.L.M (1997), In vitro culture of higher plants. Kluwer Academic publishers Dordrecht pp. 345 - 415.
- 10- TENNING P., WEICH E.W., KJARSGAARD U.B., LELU M.A., NIHLGARD M. (1992) , Somatic embryogenesis from zygotic embryos of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) Plant Science. 81: 103-109.
- 11- TETU, T., SANGWAN, R.S. et SANGWAN-NORREEL,B.S 1987 Hormonal control of organogenesis and somatic embryogenesis in *Beta vulgaris callus* J.Exp. Bot. 38 (188): 506-517.