

EFFET GÉNOTYPIQUE SUR L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE DU POIS (*Pisum sativum* L.).

A. SAADI (1,2)

(1) - Université Hassiba Ben Bouali - BP. 151, 2000 Chlef, Algérie.

(2) - Institut National Agronomique P-G, 16 rue Claude Bernard 75231 Paris, Cedex 05, France.

RÉSUMÉ

Treize génotypes de pois (*Pisum sativum* L.) ont été testés pour évaluer leurs aptitudes embryogènes en utilisant deux types d'explants à savoir : les embryons zygotiques immatures et les apex. Les résultats de cette étude montrent que l'obtention d'embryons somatiques est très dépendante du génotype. En effet, Sept génotypes, parmi les treize testés, ont réagi positivement en particulier le Cl 830, Cl 831 et Vendevil. Les génotypes Cl 830 et Cl 831, ayant présenté les meilleures aptitudes à l'embryogenèse somatique, possèdent dans leurs généalogies un parent commun appelé 74H3 et il se peut que cette lignée soit à l'origine des bonnes performances de ces derniers. La durée d'exposition des explants sur le milieu d'induction influence considérablement le pourcentage de calcs embryogènes ainsi que le nombre moyen d'embryons obtenu par calcs embryogène.

Mots Clés : *Pisum sativum* L., Génotype, Embryogenèse somatique, Aptitudes embryogènes, Milieu d'induction.

SUMMARY

Thirty lines of pea (*Pisum sativum* L.) have been tested to evaluate their ability to produce somatic embryogenesis from immature zygotic embryos and apices. The results of this study show that the obtention of somatic embryogenesis was strongly dependent on genotype. Indeed, seven lines among thirty have reacted positively in particular Cl 830, Cl 831 and Vendevil. The lines Cl 830 and Cl 831 which present the best ability for somatic embryogenesis have in their genealogy a commun parent called 74 H3. The presence of this latter could be the cause of the good performance of the Cl 830 et Cl 831. The exposition period of the explants on the induction medium has a considerable influence on the somatic embryogenesis frequency and also on the average number of embryos obtained per embryogenic callus

Key Words : *Pisum sativum* L., Lines, Somatic embryogenesis, Embryogenic ability, Induction medium.

INTRODUCTION

La régénération in-vitro est généralement obtenue chez les végétaux via la néoformation de bourgeons ou d'embryons somatiques. L'un ou l'autre de ces deux processus morphogénétiques est aujourd'hui contrôlé chez un nombre croissant d'espèces auparavant rétives notamment au sein de la famille des légumineuses.

La régénération chez les légumineuses à petites graines a été obtenue par néoformation de bourgeons chez la luzerne (WALKER *et al.*, 1979), les trèfles (PHILLIPS et COLLINS, 1979), le *Scorpiurus* (SAADI, 2005) ou par embryogenèse somatique dans le cas de la luzerne (DOS SANTOS *et al.*, 1983 ; GILMOUR *et al.*, 1987 ; NEVERS *et al.*, 1999), des trèfles (MAHESWARAN et WILLIAMS, 1985 ; RYBCZYNSKI, 1997) et du *Scorpiurus* (HAMDANI, 2001).

La régénération des légumineuses à grosses graines n'est aujourd'hui maîtrisée que chez le soja grâce à l'obtention d'embryons somatiques à partir de culture d'embryons zygotiques immatures (LAMBERT, 1991 ; NADOLSKA-ORCZYK et ORCZYK, 1994).

Chez le pois, la culture de segments d'hypocotyles (MALMBERG, 1979), de très jeunes feuilles (RUBLIO *et al.*, 1984) ou d'embryons mûrs (ATANASSOV et MEHANDJIER, 1979), permet la néoformation de bourgeons mais on ne dispose actuellement que de rares résultats quant à l'embryogenèse somatique. Celle-ci a été décrite à partir de culture de feuilles et de portions de tiges (JACOBSEN et KYSELY, 1984) ainsi que d'embryons immatures et d'apex (KYSELY *et al.*, 1987 ; KYSELY et JACOBSEN, 1989 ; NADOLSKA-ORCZYK *et al.*, 1994).

La plupart des travaux cités ont été réalisés sur un nombre très limité de variétés de pois. Or, le caractère génotypique est un modulateur impor-

tant des aptitudes organogènes en culture in-vitro, par exemple chez la luzerne (BIANCHI *et al.*, 1988). L'objectif de notre travail était donc d'obtenir des embryons somatiques à partir de deux types d'explants : les apex de jeunes plantules et les embryons zygotiques immatures, en s'inspirant du milieu prescrit par KYSELY *et al.* (1989) et de tester l'aptitude à l'embryogenèse somatique de quelques génotypes de pois protéagineux.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 - Matériel végétal

Treize génotypes de pois protéagineux (*Pisum sativum* L.) ont été utilisés lors de cette étude. La plupart de ces génotypes nous ont été fournis par la société Clause à BRETIGNY-SUR-ORGE - 91221, France. Il s'agit notamment des génotypes CI 830, CI 831 et Cation (pois de printemps), Monitor et H-61 (pois d'hiver), et de quatre écotypes de provenance étrangère (Chinoise, Ethiopienne, Polonaise et Grecque).

Le laboratoire d'amélioration des plantes de l'INRA de Versailles (R. Cousin), nous a fourni des graines de pois d'hiver (Vendevil et Friaune) et de printemps (Victoria et Finale).

2 - Conditions de culture des plantes mères et obtention des explants

Les plantes, ayant servi au prélèvement des explants d'embryons immatures et d'apex, n'ont pas été cultivées dans les mêmes conditions. Les embryons immatures proviennent de plantes cultivées en pleins champs. Quant aux apex, ils sont excisés à partir de plantules obtenues, après 5 jours de germination, sur milieu stérile contenant 20 ml d'eau distillée et 6% d'agar (Difco-Bacto). La germination s'est réalisée à l'obscurité et à une température de l'ordre de 23 ± 2 ° C.

Pour obtenir les embryons immatures, on pratique une incision sur toute la longueur des gousses, afin d'en dégager les graines. Une fois dégagées, on pratique une fente oblique sur le côté opposé au finicule de ces graines. Puis, en exerçant une légère pression sur les téguments, l'embryon est extrait. Le prélèvement des apex, quant à lui, est réalisé en supprimant les premières feuilles entourant le dôme apical. La taille moyenne des apex avoisine les 3 mm.

3 - Technique de culture

a) Milieux de culture

Après leur obtention, les explants d'embryons immatures et d'apex sont ensemencés sur un milieu dit d'induction, composé des sels minéraux M.S. DE MURASHIGE et SKOOG (1962), des vitamines B5 de GAMBORG *et al.* (1968), de saccharose (3%) et d'agar (0,7%). L'auxine utilisée est le Picloram (acide 4 - amino - 3, 5, 6, trichloropicolinique, Sigma) à la concentration de 1 mg/l avec les embryons immatures et de 0,5 mg/l avec les apex. Le pH du milieu de culture est ajusté à 5,8 avec NaOH 1N, avant autoclavage à 120 °C pendant 20 mn.

Lorsque la croissance des cals ralentit, soit 35 à 40 jours après l'ensemencement des explants, ils sont transférés sur un milieu, voisin du précédent, dit de développement, dépourvu de Picloram et contenant 0,05 mg/l d'ANA (l'acide naphthalène acétique, Sigma) et 0,5 mg/l de B.A (benzyladénine, Sigma).

Après une durée d'exposition, de 1 à 4 semaines, sur milieu de développement, les embryons sont transférés sur un milieu, dit de germination, composé des sels minéraux M.S. dilués à moitié, des vitamines d'UCHIMAYA et MURASHIGE (1974), d'hydrolysate de caséine à 1g/l, de saccharose à 2% et d'agar (Difco-Bacto) à 0,6%.

Le nombre total d'explants mis en culture, par génotype, est souvent supérieur ou égal à 120 pour les embryons immatures et supérieur ou égal à 180 pour les apex. Chaque boîte de Pétri, qui représente, en fait, une répétition, comprend en moyenne 6 explants, lorsqu'il s'agit d'embryons immatures, et 9 explants, lorsqu'il s'agit d'apex.

b) Conditions de culture

Les phases d'induction, de développement et de germination sont réalisées à une température de 23 ± 2 °C en photopériode de 16 heures. L'éclairage de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, est fourni par des tubes fluorescents Mazda Fluor, lumière du jour.

4 - Suivi des cultures et expression des résultats

L'apparition des embryons, sur les cals issus d'embryons immatures et d'apex, est suivie périodiquement, ce qui permet de calculer, pour chaque boîte (répétition), le pourcentage de cal embryogène (rapport du nombre de cal portant au moins un embryon sur le nombre total des cal examinés). Le pourcentage moyen de cals embryogènes ainsi que l'écart-type sont calculés. Le relevé du nombre d'embryon par cal permet de calculer le nombre moyen d'embryons par cal embryogène ainsi que l'écart-type. Le rendement correspond au produit entre le pourcentage moyen de cals embryogènes et le nombre moyen d'embryons par cal embryogène.

Dans cette évaluation, nous avons appelé "embryon normal", tout embryon présentant une constitution morphologique normal à savoir : un axe bipolarisé, avec un méristème caulinaire et un autre racinaire et des cotylédons. Tout le reste des embryons (ceux dépourvus de méristèmes ou de cotylédons ou ceux pourvus de cotylédons fasciés ou d'une morphologie complètement désorganisée) sont qualifiés d'anormaux.

5 - Analyse des données

Partant des moyennes calculées (% moyen de calcs embryogènes), nous avons testé, en analyse de variance, le facteur génotypique. Cette analyse de variance correspond à un modèle fixe avec des répétitions (nombre de boîtes) à un seul facteur et 13 niveaux (nombre de génotype). La comparaison des moyennes, relatives aux génotypes, a été réalisée à l'aide du test de Newman & Keuls.

RÉSULTATS

1 - Aptitude embryogènes des embryons immatures

Sur le milieu d'induction, c'est la callogenèse qui apparaît en premier lieu. Elle se déclenche dès le quatrième ou le cinquième jour qui suit l'ensemencement. Au début, les calcs apparaissent uniquement au niveau des zones de blessures et des parties, de l'explant, se trouvant en contact avec le milieu de culture. Après 20 à 25 jours de culture, le processus se généralise et gagne l'ensemble de l'explant aboutissant ainsi à la formation de véritables calcs avec, parfois, à leurs surfaces, une sorte de protubérance ou d'excroissance.

L'embryogenèse somatique quant à elle, apparaît en second lieu. Les embryons prennent, souvent, naissance sur les calcs issus de cotylédons ou d'axes embryonnaires. Dans certains cas, ils apparaissent sur les protubérances ou excroissances des calcs (figure 1 A).

On note par ailleurs, que certaines parties de l'explant, à l'exemple de l'emplacement des bourgeons cotylédonnaires, produisent plus de calcs embryogènes que d'autres. Ces calcs sont, dans la plupart du temps, de coloration jaune clair et de texture friable.



Figure 1a : Embryons somatiques normaux provenant respectivement d'apex et d'embryon zygotique immature du pois.

Le temps nécessaire à l'apparition des embryons somatiques sur les calcs issus d'embryons immatures, varie selon le génotype (figure 2 A). En effet, chez Victoria par exemple, les premiers embryons apparaissent 13 à 14 jours après l'ensemencement alors que d'autres génotypes comme Frijaune ou Monitor exigent 25 à 30 jours. L'apparition, de nouveaux embryons, se poursuit jusqu'au 40^{ème} ou 50^{ème} jour.

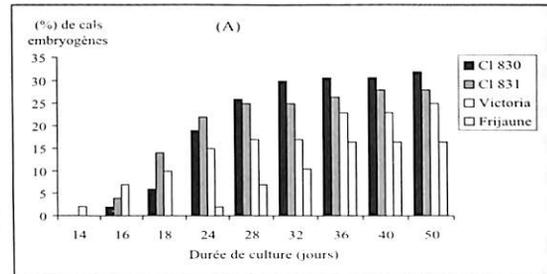


Figure 2a : Aptitude embryogène (exprimée par le (%) de calcs embryogènes) des embryons immatures (A) et des apex (B), de quatre génotypes de pois, en fonction de la durée d'exposition des cultures sur le milieu d'induction.

Les résultats de l'analyse de variance montrent l'existence d'un facteur génotypique hautement significatif au seuil de confiance $\alpha = 0,01$. La comparaison des moyennes nous a permis de distinguer 3 groupes de génotypes : les génotypes à bon, à moyen et à faible potentiel embryogène.

Dans le tableau I, les génotypes sont classés suivant le pourcentage (%) de calcs embryogènes

Tableau 1 : Aptitudes embryogènes des embryons immatures de différents géotypes de pois, cultivés sur milieu d'induction (MS), contenant 1 mg/l de picloram. Les résultats sont obtenus après 35 jours de culture à partir d'un échantillon de 120 à 125 calcs.

Géotypes	Pourcentage moyen de calcs embryogènes (A)	Nombre moyen d'embryons par cal (B)	Rendement (A x B)	Pourcentage moyen d'embryons anormaux
CI 830	30,7 ± 7,5	2,7 ± 0,11	0,83	98
CI 831	27 ± 8,8	2,5 ± 0,13	0,67	96
Victoria	23 ± 9,1	3 ± 0,30	0,69	97
Frijaune	16,5 ± 7,7	2 ± 0,20	0,33	100
Vendevil	15 ± 9,3	2,3 ± 0,19	0,34	93
Monitor	11 ± 4,5	1 ± 0,08	0,11	100
Finale	10 ± 5,2	1 ± 0,11	0,10	100
H 61	8 ± 2,5	1,7 ± 0,13	0,14	97
Cation	7 ± 2,5	1 ± 0,10	0,07	100
Ecotype chinois	5 ± 3	1,5 ± 0,15	0,07	98
Ecotype éthiopien	5 ± 2,5	1 ± 0,08	0,05	96
Ecotype polonais	2 ± 0,5	1 ± 0,09	0,02	100
Ecotype grec	0	-	-	-

obtenu. Les meilleures réponses sont celles obtenues avec CI 830, CI 831 et Victoria et dont le pourcentage de calcs embryogènes est compris entre 23% et 30,7%. Des géotypes comme Frijaune, Vendevil, Monitor, Finale, H61 et Cation, constituent le groupe intermédiaire, à potentiel embryogène moyen et dont le pourcentage de calcs embryogènes oscillent entre 7% et 16,5%. Le dernier groupe, rassemble les géotypes (écotypes chinois, éthiopien, polonais et grec) ayant montré de faibles aptitudes embryogènes et dont le pourcentage de calcs embryogènes est supérieur ou égal à 5%.

Les différences génotypiques s'expriment également sur le nombre moyen d'embryon par cal embryogène. Ainsi, ce nombre semble varier entre 1 et 3 pour l'ensemble des géotypes. On note par ailleurs, qu'il existe un parallélisme entre le pourcentage de cal embryogène, pour un géotype donné, et le nombre moyen d'embryon obtenu par cal embryogène. Le taux d'embryons normaux est relativement stable, variant entre 0 et 7%.

2 - Aptitudes embryogènes des apex

Ordinairement, les embryons somatiques apparaissent aux aisselles des primordia foliaires, juste à l'emplacement des bourgeons axillaires (figure 1 B). Cependant, certains embryons peuvent prendre naissance à d'autres endroits (sur les calcs issus de limbes ou sur les parties terminales des apex). Comme dans le cas des embryons immatures, le temps nécessaire à l'apparition des premiers embryons somatiques sur les calcs, diffère d'un géotype à un autre (figure 2 B). Ainsi, pour CI 830, CI 831 et Vendevil, 15 jours suffisent alors que pour Finale, 23 jours sont nécessaires. Des embryons continuent leur apparition jusqu'au 35^{ème} jour (figure 2 B). Aucun critère morphologique ne permet de distinguer les calcs embryogènes de ceux qui ne le sont pas.

Les résultats de l'analyse de variance révèlent aussi, avec les explants d'apex, l'existence d'un facteur génotypique hautement significatif au

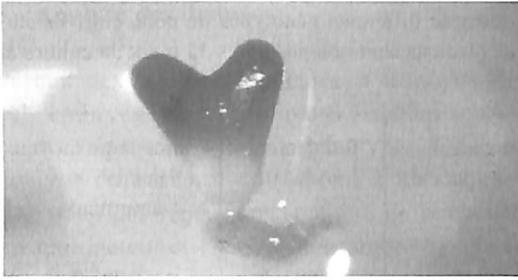


Figure 1b : Embryons somatiques normaux provenant respectivement d'apex et d'embryon zygotique immature du pois.

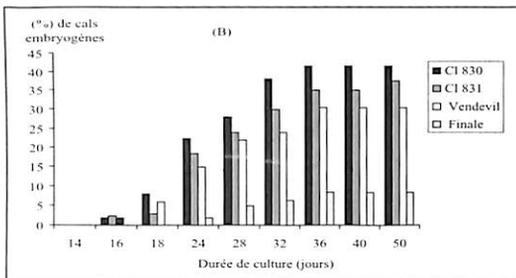


Figure 2b : Aptitude embryogène (exprimée par le (%) de calcs embryogènes) des embryons immatures (A) et des apex (B), de quatre génotypes de pois, en fonction de la durée d'exposition des cultures sur le milieu d'induction.

seuil de confiance $\alpha = 0,01$. La comparaison des moyennes des différents génotypes, laisse apparaître 3 groupes distincts.

Les résultats du tableau II, nous permettent de distinguer ses trois groupes de génotypes. Le premier, constitué de CI 830, CI 831 et Vendevil, présente les meilleures aptitudes. Le troisième, n'ayant manifesté aucune aptitude, regroupe Cation et les écotypes Grec, Polonais et Ethiopien. Le reste des génotypes enfin, se situe entre ces extrêmes et correspond au deuxième groupe. On note, cependant que si le pourcentage de calcs embryogènes chez la plupart des génotypes est supérieur en comparaison avec les embryons immatures, le nombre moyen d'embryon par cal embryogène diminue au contraire, pouvant atteindre au maximum 1,8.

Cette constatation se répercute évidemment sur les rendements qui deviennent meilleurs avec les embryons immatures pour l'ensemble des génotypes à l'exception de quelques-uns comme l'écotype Chinois ou le H 61. Notons enfin, que les embryons ainsi produits sont de faible qualité puisque moins de 10% seulement sont normaux et que ce taux ne dépend sûrement pas des génotypes puisque les anomalies les affectent tous systématiquement.

3 - Morphologie des embryons somatiques et leur devenir

Tous les génotypes ayant des capacités embryogènes produisent des embryons somatiques normaux et anormaux. Les embryons normaux traversent au cours de leur développement, des stades presque identiques à ceux observés chez l'embryogenèse zygotique à savoir : le stade globulaire, cœur, torpille et cotylédonnaire. Chaque embryon est pourvu d'un axe bipolarisé, muni d'un méristème caulinaire et d'un méristème radulaire.

Certains embryons somatiques produits achèvent leur développement (stade cotylédonnaire) sur le milieu d'induction, d'autres nécessitent un transfert sur un milieu de développement pendant 1, 2, 3 jusqu'à 4 semaines selon le stade de développement atteint par les embryons au moment de leur transfert. Les embryons somatiques qui terminent leur développement se détachent facilement du cal original (figure 1 C).



Figure 1c : Embryons somatiques mature détaché du cal mère.

Tableau II : Aptitudes embryogènes d'apex de différents géotypes de pois, cultivés sur milieu d'induction (MS), contenant 0,5 mg/l de picloram. Les résultats sont obtenus après 35 jours de culture à partir d'un échantillon de 180 à 185 calcs.

Géotypes	Pourcentage moyen de calcs embryogènes (A)	Nombre moyen d'embryons par cal (B)	Rendement (A x B)	Pourcentage moyen d'embryons anormaux
CI 830	41,5 ± 8,7	1,8 ± 0,18	0,75	96
CI 831	35 ± 6,5	1,2 ± 0,17	0,42	98
Vendevil	30,5 ± 8,5	1,3 ± 0,21	0,40	92
H 61	19 ± 4,5	1,2 ± 0,10	0,23	97
Ecotype chinois	11 ± 2,5	1,2 ± 0,16	0,13	94
Monitor	10 ± 5,2	1,2 ± 0,11	0,12	94
Finale	8,5 ± 4,4	1 ± 0,32	0,08	97
Victoria	5 ± 2,5	1 ± 0,20	0,05	99
Frijaune	2,5 ± 3,8	1 ± 0,13	0,02	98
Cation	0	-	-	-
Ecotype éthiopien	0	-	-	-
Ecotype polonais	0	-	-	-
Ecotype grec	0	-	-	-

Le pourcentage des embryons somatiques anormaux chez l'ensemble des géotypes est très élevé (Tableau I et II). Ainsi, on note que plus de 90% des embryons produits présentent des malformations. Ces malformations sont souvent dues à des fasciations (fusion des hypocotyles) ou à des mono. ou polycotylédones (2 à 3 paires de cotylédons) (figure 1 D). Certains prennent la forme de structures totalement désorganisées.



Figure 1d : Embryons somatiques anormaux mono et tétracotylédones.

Les embryons somatiques plus ou moins bien formés sont isolés des calcs, puis ensemencés sur un milieu de germination. La racine se développe la première suivie 10 à 20 jours plus tard, par la tigelle (figure 1 E). Les embryons somatiques anormaux possédant un ou plus de deux cotylédons peuvent germer en donnant des plantules alors que ceux dont les structures sont complètement désorganisées survivent sans donner de plantes.



Figure 1e : Plantule âgée de 10 jours issue d'embryon somatique.

DISCUSSION

La réponse à l'embryogenèse somatique des différents génotypes testés était très variée. En effet, certains se sont montrés récalcitrants comme par exemple l'écotype Grec alors que d'autres comme CI 830 et CI 831 ont manifesté de bonnes capacités embryogènes. Les rendements obtenus avec CI 830 par exemple sont de l'ordre de 0,75 avec les apex et de 0,83 avec les embryons immatures. Bon nombre de génotypes ont un comportement intermédiaire comme Vendevil (0,40 avec les apex et 0,34 avec les embryons immatures). Cette relation entre le génome et l'aptitude à l'embryogenèse somatique a déjà été reconnue par plusieurs auteurs tant sur le pois (KYSELY *et al.*, 1987 ; KYSELY et JACOBSEN, 1989 ; BENCHEIKH et GALLAIS, 1996) que sur d'autres espèces de la famille des légumineuses comme la luzerne (NAGARAJAN *et al.*, 1986 ; BIANCHI *et al.*, 1988) ; le trèfle (PEDERSON, 1986), le soja (GAMBORG *et al.*, 1983 ; HAMATT *et al.*, 1987) et le Scorpiurus (HAMDANI, 2001).

Remarquons que les génotypes CI 830 et CI 831 qui ont montré les meilleures réponses à l'embryogenèse somatique avaient un parent commun (74 H3), pouvant être à l'origine de leurs performances. L'héritabilité de l'aptitude à l'embryogenèse somatique est en effet, de plus en plus, mise en évidence chez de nombreuses espèces. PARROTT *et al.* (1989) signalent chez le soja que tous les génotypes testés (à l'exception d'un seul cas) présentent de bonnes aptitudes à l'embryogenèse somatique, avaient dans leur généalogie un ou deux ancêtres en commun (MANCHU et/ou HARROW). Ces deux parents d'après l'auteur ont été caractérisés comme génotypes à fort potentiel embryogène. Des observations similaires ont été faites sur la luzerne par BINGHAM *et al.* (1975) ; BROWN et ATANASSOV (1985) ; CHEN *et al.* (1987) et sur le maïs par HODGES *et al.* (1986).

La variabilité que nous avons mise en évidence doit permettre de rechercher le déterminisme génétique de l'aptitude à l'embryogenèse (travaux entrepris au laboratoire). Si d'une manière générale, les embryons immatures paraissent, dans nos résultats, exprimer plus facilement l'embryogenèse somatique que les apex et permettent de classer les génotypes selon leurs aptitudes embryogènes, il faut remarquer aussi l'existence d'une interaction entre le génotype et la nature des explants pouvant influencer les réponses à l'embryogenèse somatique. En effet, les aptitudes embryogènes de certains génotypes comme Cation ou l'écotype Chinois étaient nulles avec l'emploi des apex comme source d'explant alors qu'avec les embryons immatures, des aptitudes positives se manifestent. Cependant, ces interactions ne sont pas générales, d'après certains auteurs. En effet, selon NAGARAJAN *et al.* (1986) aucune interaction notable n'existe entre le génotype et la nature de l'explant dans le cas de la luzerne.

Les malformations des embryons que nous avons constatées, essentiellement des polycotylies, peuvent être dues à des phénomènes de fasciations précoces par contre les structures embryogènes complètement désorganisées peuvent être les conséquences d'une perte de géotropisme comme l'a suggéré ADU-AMPOMAH *et al.* (1988) dans son travail fait sur le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). Certains auteurs comme RANCH *et al.* (1986) ont, en effet, signalé un effet tératogène qui pourrait découler de l'utilisation du picloram sur des tissus embryogènes de soja. Toujours chez le soja, l'usage du 2,4 - D entraîne des malformations (BEVERSDORF et BINGHAM, 1977 ; LIPPMANN et LIPPMANN, 1984) semblables à celles décrites ici. Les mêmes effets du 2,4 - D sont rapportés par HAMDANI (2001) sur le Scorpiurus et par ZHANG *et al.* (2001) sur le coton.

CONCLUSION

Cette étude a permis de tester avec succès les aptitudes à l'embryogenèse somatique d'un certain nombre de génotypes de pois protéagineux sur le milieu prescrit par KYSELY *et al.* (1987) en mettant en évidence une variabilité au sein de l'espèce. Elle a également permis de sélectionner des génotypes ayant de bonnes aptitudes embryogènes tels CI 830 et CI 831 et à moindre degré Vendevil. Ces génotypes seront donc utilisés pour poursuivre notre recherche afin d'améliorer la production d'embryons somatiques, en quantité et en qualité, chez le pois.

Références bibliographiques

- ADU-AMPOMAH Y., NOVAK F.J., AFZA R., VANDUREN M. and PEREA-DALLOS M. (1988). Induction and growth of somatic embryos of cocoa (*Theobroma cacao* L.) Café Cacao Thé, XXXII, n° 3, 187-200.
- ATANASSOV A.I. and MEHANDJIER A.D. (1979). In vitro induced morphogenesis in pea. R. Acad. Bulg. Sci., 32. 115-118.
- BENCHEIKH M. and GALAIS A. (1996). Somatic embryogenesis in pea (*Pisum sativum* L. and *Pisum arvense* L.) : Diallel analysis and genetic control. Euphytica 90 : 257-264.
- BEVERSDORF W.D. and BINGHAM E.T. (1977). Degrees of differentiation obtained in tissue culture of Glycine species. Crop Sci., 17 : 307-313.
- BIANCHI S., FLAMENT P. et DATTEE I. (1988). Embryogenèse somatique et organogenèse in vitro chez la luzerne: évaluation des potentialités des divers génotypes. Agronomie, 8 (2) : 121-126.
- BINGHAM E.T., HURLEY L.V., KAATZ D.M. and SAUNDERS J.W. (1975). Breeding alfalfa wich regenerates from callus tissue in culture. Crop Sci. 14, 474-477
- BROWN D.C.W. and ATANASSOV A. (1985). Role of genetic background in somatic embryogenesis in Medicago. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 4 : 111-122.
- CHEN T.H.H., MAROVITCH J. and THOMPSON B. G. (1987). Genotypic effects on somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of alfalfa. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 8 : 73-81.
- DOS SANTOS A.V.P., CUTTER E.G. and DAVEY M. R. (1983). Origin and development of somatic embryos in *Medicago sativa* L. (Alfalfa). Protoplasma, 117 : 107 - 115.
- GAMBORG O.L., DAVIS B.P. and STAHLHUT R.W. (1983). Somatic embryogenesis in cell cultures of Glycine species. Plant Cell Reports., 2 : 209-212.
- GAMBORG O.L., MILLER R.A. and OJIMA K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell. Res., 50 : 150-158.
- GILMOUR D.M., DAVEY M.R. and COCKING (1987). Plant regeneration from cotyledon protoplasts of wild Medicago species. Plant Sci., 48 : 107-112
- HAMATT N., NELSON R.S. and DAVEY M.R. (1987). Plant regeneration from seedling explants of perennial Glycine species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 11 : 3-11
- HAMDANI F.Z. (2001). Essai de régénération de plantes entières chez le Scorpiurus via l'organogenèse et l'embryogenèse somatique. Thèse de

magister, Université Hassiba Ben-Bouali, Chlef, 113 p.

HODGES T.K., KAMO K.K., IMBRIE C.W. and BECWAR M.R. (1986). Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. *Biotechnology*, Vol 4 : 219-223.

JACOBSEN H.J. and KYSELY W. (1984). Induction of somatic embryos pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 3 : 172-176.

KYSELY W. and JACOBSEN H.J. (1989). Somatic embryogenesis from pea embryos and shoot apices. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20 : 7-14.

KYSELY W., MYERS J.R., LAZZERI P.A., COLLINS G. B. and JACOBSEN H.J. (1987). Plant regeneration via somatic embryogenesis in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Reports*, 6 : 305-308.

LAMBERT M. (1991). Embryogenèse somatique chez le soja (*Glycine max* L., MERRIL). Thèse de doctorat, Université de Paris - sud, Orsay, 179 p.

LIPPMANN B. and LIPPMANN G. (1984). Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean *Glycine max* L.. *Plant Cell Reports*, 3 : 215-218.

MAHESWARAN G. and WILLIAMS E.G. (1985). Origin and development of somatic embryoids formed directly on immatures embryos of *Trifolium repens* cultured in-vitro. *Ann. Bot.*, 56 : 619-630.

MALMBERG R.L., (1979). Regeneration of whole plants from callus cultures of diverse lines of *Pisum sativum* L. *Planta*, 146 : 243-244.

MURASHIGE T. and SKOOG F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15 : 473-497.

NADOLSKA-ORCZYK A., MILOWSKA L. and ORCZYK W. (1994). Two ways of plant regeneration from immature cotyledons of pea. *Acta Soc. Bot. Pol.* 63 : 153-157.

NADOLSKA-ORCZYK, A. and ORCZYK W. (1994). New aspects of soybean somatic embryogenesis. *Euphytica*, 80: 137-143.

NAGARAJAN P., MC KENZIE and WALTON P.D. (1986). Embryogenesis and plant regeneration of *Medicago* spp. in tissue culture. *Plant Cell Reports*, 5 : 77-80.

NEVES L.O., DUQUE S.R.L., ALMEIDA J.S. and FEVEREIRO P.S. (1999). Repetitive somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* ssp. *Narbonensis* and *M. truncatula* Gaertn cv. *Jemalong*. *Plant Cell Reports*, 18 : 398-405.

PARROTT W.A., WILLIAMS E.G., HILDBRAND D. F. and COLLINS G.B., (1989). Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 16 : 15-21.

PEDERSON G.A. (1986). In-vitro culture and somatic embryogenesis of four *Trifolium* species. *Plant Sci.*, 45 : 101-104.

PHILLIPS G.C. and COLLINS G.B. (1979). In-vitro tissue culture of delected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Sci.*, 19 : 59-62.

RANCH J.P., OGELSBY L., ZIELINSKY A.C., (1986). Plant regeneration from tissue cultures of soybean by somatic embryogenesis. In : Vasil I.K., eds. *Cell Culture and Somatic Cell*

Genetic on Plants, vol. 3. New York ; Academic Press ; 97-109.

RUBLIO A., KARTHA K.K., MROGINSKY L.A. and DYCK J. (1984). Plant regeneration from pea leaflets cultured in-vitro and genetic stability of regenerants. J. Plant Physiol., 117 : 119-130.

RYBCZYNSKI J.J. (1997). Plant regeneration from highly embryogenic callus, cell suspension and proplast cultures of *trifolium fragiferum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51 : 159-170.

SAADI A. (2005). L'effet de la nature des explants et de la composition hormone du milieu sur l'organogenèse du *Scorpiurus*. Séminaire international sur l'amélioration des productions végétales -APV 2005. INA d'Alger.

UCHIMAYA B. and MURASHIGE T. (1974). Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells. Plant Physiol., 54 : 936 -944.

WALKER K.A., WENDELN M.L. and JAWORSKI E. C. (1979). Organogenesis in callus tissue of *Medicago sativa* L. The temporal separation of induction processes from differentiation processes. Plant Sci. Lett., 16 : 23-30.

ZHANG B.H., FENG R., LIU F. and WANG Q. (2001). High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. Bot. Bull. Acad. Sin., 42 : 9-16.