

Organogenèse in vitro du pistachier (*Pistacia vera* L.) cv. Mateur à partir de feuilles d'embryons zygotiques

Chatibi A., Kchouk M.L., Zemni H., Ghorbel A.

X GREMPA Seminar

Zaragoza : CIHEAM
Cahiers Options Méditerranéennes; n. 33

1998
pages 131-138

Article available on line / Article disponible en ligne à l'adresse :

<http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=98606176>

To cite this article / Pour citer cet article

Chatibi A., Kchouk M.L., Zemni H., Ghorbel A. **Organogenèse in vitro du pistachier (*Pistacia vera* L.) cv. Mateur à partir de feuilles d'embryons zygotiques.** X GREMPA Seminar . Zaragoza : CIHEAM, 1998. p. 131-138 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 33)



<http://www.ciheam.org/>
<http://om.ciheam.org/>

Organogenèse *in vitro* du pistachier (*Pistacia vera* L.) cv. Mateur à partir de feuilles d'embryons zygotiques

A. Chatibi, M.L. Kchouk, H. Zemni et A. Ghorbel

Laboratoire de Biotechnologie Végétale, INRST,
BP 95, 2050 Hammam-Lif., Tunisie

RESUME - Les premiers essais de culture *in vitro* du pistachier se sont surtout intéressés aux *Pistacia* sauvages car la culture *in vitro* de *Pistacia vera* L. s'est avérée assez délicate. En effet, outre les problèmes d'initiation aseptique, de nécroses des bourgeons apicaux et de perte des potentialités de multiplication des plantules *in vitro*, l'enracinement de vitroplants demeure toujours difficile et peu de plants arrivent à terme. De plus, les phénomènes de rajeunissement physiologiques *in vitro* chez le pistachier jouent un rôle primordial aussi bien dans la conduite des cultures *in vitro* que dans l'obtention de plantules vigoureuses, conditions *sine qua non* à la réussite de l'enracinement et de l'acclimatation des vitroplants. Récemment, une méthode de multiplication du pistachier à partir de cotylédons a permis d'obtenir une centaine de plants acclimatés. Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'ensemble des feuilles issues d'embryons zygotiques cultivés *in vitro*, et ce, afin d'élargir le champ d'action à un plus grand nombre d'explants juvéniles par graine. Les résultats montrent que les plants issus de l'organogenèse foliaire se comportent de manière identique à ceux obtenus par organogenèse cotylédonnaire. Toutefois, les plants obtenus étant génotypiquement comparables aux plants de semis, ils pourraient être utilisés à défaut comme porte-greffes. Par ailleurs, à l'inverse des cotylédons, et outre les plants obtenus, on a constaté une grande diversité de cals qui pourraient être utilisés pour l'embryogenèse somatique et éventuellement pour l'isolement de protoplastes. Ainsi, la culture *in vitro* du pistachier à partir de matériel foliaire juvénile ouvre de larges horizons à la multiplication et à l'amélioration de cette culture. A ce propos, l'hybridation somatique de protoplastes serait une technique de choix pour le croisement de cultivars femelles et l'association de caractères agronomiques particuliers.

Mots-clés : Pistachier cv. Mateur, feuilles, bourgeons adventifs, combinaisons trihormonales.

SUMMARY - "In vitro organogenesis of Pistachio (*Pistacia vera* L.) cv. Mateur from zygote embryos of leaves". The first attempts to cultivate pistachio in vitro were mainly made with wild *Pistacia* since in vitro culture of *Pistacia vera* L. had proved to be rather difficult. Moreover, besides problems of initiation, necrosis of apical buds and loss of multiplication potentialities of plantlets in vitro, rooting of vitroplants still remains difficult and few plants were produced. Also, physiological rejuvenation phenomena of pistachio in vitro play a major role in the performance of in vitro cultures as well as the obtention of vigorous plantlets, sine qua non conditions for the success of rooting and acclimatization of vitroplants. Recently, a propagation method of pistachio from cotyledons allowed to recover a hundred of acclimatized plants. In the present work, we investigated all the leaves issued in vitro from zygotic embryos in order to expand the technique to a greater number of juvenile explants per seed. Results showed that plants issued from leaf organogenesis behave similarly to those obtained through cotyledon organogenesis. However, such plants are genotypically comparable to seedlings and could rather be used as rootstocks. Moreover, contrary to cotyledons, and besides the plantlets produced, we observed a great diversity of calluses which could be useful for somatic embryogenesis and eventually to isolate protoplasts. Thus, in vitro culture of pistachio through juvenile leaf material opens large horizons for the propagation and breeding of this crop. In this respect, somatic fusion of protoplasts would be a selected technique to cross female cultivars and associate specific agronomic traits.

Key words: Pistachio cv. Mateur, leaves, adventitious shoots, trihormonal combinations.

Introduction

L'extension de la culture du pistachier et son amélioration est tributaire de la mise au point de techniques fiables de multiplication. Le développement de la culture *in vitro* du pistachier vrai (*Pistacia vera* L.) représente un défi non seulement pour la Tunisie mais aussi à l'échelle méditerranéenne voire internationale. La technique de culture *in vitro* a toujours été un outil de prédilection pour la production en masse de plusieurs espèces fruitières et ligneuses (Debergh et

Zimmerman, 1991). Chez le pistachier, et malgré les progrès accomplis dans le domaine (Barghchi et Alderson, 1989), la culture *in vitro* se heurte à plusieurs problèmes liés au choix de l'explant, à l'initiation aseptique, à la nécrose des bourgeons apicaux, à la régression des potentialités en subculture, et surtout à l'enracinement et à l'acclimatation des vitroplants (Martinelli, 1988 ; Gonzalès-García, 1990 ; Abousalim et Mantell, 1994 ; Chatibi *et al.*, 1995). Les récents travaux entrepris au laboratoire nous ont permis de constater que le rajeunissement physiologique du pistachier cv. Mateur représente une condition *sine qua non* aussi bien à l'établissement de vitroplants qu'à leur enracinement et acclimatation, les milieux de multiplication *in vitro* ayant un effet "à distance" sur la vigueur et la rhizogenèse de la plante. Ainsi, la mise en culture des pièces cotylédonaire a permis d'acclimater plus d'une centaine de pistachiers cv. Mateur (Chatibi *et al.*, 1996).

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés aux feuilles issues d'embryons zygotiques cultivés *in vitro* dans le but d'étendre l'utilisation de matériel juvénile, en dehors des cotylédons, à toute la plante et augmenter ainsi la probabilité d'obtention de plants acclimatés.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Les explants utilisés sont des feuilles issues de plantules obtenues *in vitro* après germination d'embryons zygotiques matures du *Pistacia vera* L. cv. Mateur (récolte 1993). Ce cultivar se caractérise par la qualité du fruit du parent femelle Mateur 11D (taille importante, bonne dehiscence), ainsi que le goût et la couleur de l'amande (Mlika, 1980).

Germination des embryons zygotiques

Les graines sont conservées un mois à 4°C, après élimination de la coque et du péricarpe. La désinfection se fait par trempage dans l'éthanol 70° pendant une minute puis transfert pendant 15 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium (12° Chlore actif) additionnée de quelques gouttes de Tween 20. Les graines sont ensuite rincées trois fois à l'eau distillée stérile puis maintenue dans l'eau du dernier rinçage pendant 48 heures sous la hotte.

Les embryons débarrassés de leur cotylédons sont repiqués sur un milieu de culture dérivé du milieu de base de Quoirin et Lepoivre (1977) contenant 15 g l⁻¹ de saccharose.

Les cultures sont maintenues en chambre d'incubation sous une intensité lumineuse de 3 000 lux ($\approx 15 \text{ W m}^{-2}$) et une photopériode de 12 heures. La température est maintenue à 25±2°C.

Prélèvement des feuilles

Après 15 jours de culture, les plantules ont environ 12 cm. Les feuilles prélevées sur ces plantules sont débarassées du tiers basal du pétiole, pour éliminer toute présence de méristèmes ou de bourgeons préexistants, et des deux tiers supérieurs du limbe. Elles sont cultivées sur plusieurs milieux de culture, à base de MS (Murashige et Skoog, 1962) qui diffèrent par leur combinaison hormonale. Les fragments de feuille ainsi cultivés sont maintenus à l'obscurité pendant trois semaines puis placés sous une intensité lumineuse de 3 000 lux (15 W m^{-2}) et une photopériode de 12 heures à une température de 25±2°C.

Le renouvellement du milieu a lieu toutes les trois semaines et à partir de la septième semaine, un relevé des observations est effectué périodiquement. Les paramètres pris en considération sont : le pourcentage de caulogenèse, le nombre moyen des bourgeons néoformés par explant, la taille moyenne des pousses et l'aspect morphologique des pousses obtenues.

Enracinement et acclimatation

Les pousses vigoureuses sélectionnées sur les différents milieux de culture utilisés sont transférées sur un milieu rhizogène composé du milieu de base de Murashige et Skoog (1962) additionné de 2,0 mg l⁻¹ Acide indolbutyrique (AIB), 0,05 mg l⁻¹ Acide α -naphtalèneacétique (ANA) et 1,0 mg l⁻¹ thiamine-HCl (Chatibi *et al.*, 1996). A la fin de la phase d'enracinement, les vitroplants sont transférés sur un substrat naturel composé uniquement de tourbe et conduits en serre d'acclimatation contrôlée.

Résultats

La néoformation de bourgeons adventifs varie en fonction de la nature et de la combinaison des régulateurs de croissance utilisés. La qualité de ces bourgeons est plus importante que leur nombre pour le développement ultérieur des vitroplants. Cette néoformation s'accompagne d'une callogenèse accrue et diversifiée quant à la nature des cals obtenus.

Néoformation de bourgeons adventifs

L'induction de bourgeons adventifs dépend étroitement de la combinaison hormonale appliquée dans le milieu et en premier lieu de la 6-Benzylaminopurine (BAP).

En effet, à BAP= 0,5 mg l⁻¹, l'addition de 1,0 mg l⁻¹ AIB et de 0,5 mg l⁻¹ ANA constitue la seule combinaison capable d'induire la régénération de pousses adventives (Table 1). L'apparition de ces pousses a lieu au niveau de protubérances vertes minuscules et très dures dépourvues de cals visibles (Fig. 1). Les pousses ainsi obtenues, sont généralement très vigoureuses et bien que leur nombre par explant soit relativement faible, leur taille moyenne est voisine de 4,5 cm.

Partout ailleurs, à BAP= 0,5 mg l⁻¹, une callogenèse intense a été observée surtout pour les concentrations en ANA supérieures à 1,0 mg l⁻¹. Les cals obtenus sont généralement friables et de couleur blanche, qui acquièrent une teinte brune jaunâtre lorsque la concentration en AIB dépasse 1,0 mg l⁻¹. Ces cals continuent activement leur croissance jusqu'à la dixième semaine de culture, puis ils commencent à se nécroser et finissent par noircir.

A BAP= 1,0 mg l⁻¹, les tissus mis en culture manifestent un énorme développement. Toutefois, il est possible d'observer des bourgeons adventifs pour des concentrations AIB/ANA respectivement de 0,5/0,5 mg l⁻¹ et de 1,5/1,0 mg l⁻¹ (Table 1). Dans les deux cas, les bourgeons sont néoformés après 7 à 8 semaines de culture. Ils prennent naissance à partir de masses tissulaires vertes très compactes, développées sur les zones pétiolaires et entre les nervures. Les pousses obtenues sont généralement vigoureuses, elles ne présentent aucune anomalie visible (malformation ou vitrification), aussi le nombre des feuilles et leur position le long de leur tige sont réguliers.

Une callogenèse intense a été généralement observée sur les zones de cicatrisation à l'endroit où la section a été opérée. Les cals sont friables, blancs clairs à aspect crémeux, ayant une croissance intense qui diminue lorsque la concentration en AIB est supérieure à 1,0 mg l⁻¹.

Au-dessus de 1,0 mg l⁻¹ de BAP (1,5 mg l⁻¹ et 2,0 mg l⁻¹), le pourcentage de régénération de pousses adventives est plus important et dépend étroitement de la concentration des hormones associées dans le milieu de culture, AIB et ANA.

En présence de 1,5 mg l⁻¹ de BAP, 2,0 mg l⁻¹ d'AIB et 0,5 mg l⁻¹ d'ANA, 80% des feuilles cultivées donnent des pousses vigoureuses et très appréciées morphologiquement. Cependant, des cals laiteux ont été observés, parsemés le long des tiges (Fig. 2), montrant ainsi des signes de sénescence des pousses. Le transfert de ces pousses sur milieu de multiplication, à des concentrations faibles en AIB et ANA (BAP 1,0 ; AIB 0,2 ; ANA 0,05), permet d'obtenir de nouvelles pousses juvéniles, très vigoureuses, qui prennent naissance au niveau des bourgeons axillaires.

Table 1. Régénération de pousses adventives en fonction des combinaisons des régulateurs de croissance

Régulateurs de croissance (mg l ⁻¹)			NF	NEC	C (%)	NEAD	S (%)	TMP (cm)	NMPE
BAP	AIB	ANA							
0,5	0,5	0,5	36	0	0	0	0	0,0	0
0,5	0,5	2,0	36	36	100	0	0	0,0	0
0,5	1,0	0,5	36	0	0	27	75	4,5	10
0,5	1,0	1,0	36	0	0	0	0	0,0	0
0,5	1,0	1,5	36	36	100	0	0	0,0	0
0,5	1,5	0,5	36	0	0	0	0	0	0
0,5	1,5	1,0	36	14	38	0	0	0,0	0
0,5	1,5	1,5	36	36	100	0	0	0,0	0
0,5	1,5	2,0	36	36	100	0	0	0,0	0
0,5	2,0	1,0	36	36	100	0	0	0,0	0
0,5	2,0	1,5	36	22	62	0	0	0,0	0
0,5	2,0	2,0	36	36	100	0	0	0,0	0
1,0	0,5	0,5	36	36	100	14	38	1,5	>30
1,0	1,0	1,0	36	36	100	0	0	0,0	0
1,0	1,5	1,0	36	15	41	9	25	2,5	10
1,0	1,5	2,0	36	36	100	0	0	0,0	0
1,0	2,0	2,0	36	36	100	0	0	0,0	0
1,5	0,5	0,5	36	11	30	6	17	0,8	12
1,5	0,5	1,5	36	36	100	0	0	0,0	0
1,5	1,0	1,0	36	36	100	9	25	0,5	>30
1,5	1,0	1,5	36	36	100	0	0	0,0	0
1,5	1,5	2,0	36	36	100	0	0	0,0	0
1,5	2,0	0,5	36	9	25	29	80	2,8	>30
2,0	0,5	2,0	36	36	100	0	0	0,0	0
2,0	1,0	1,5	36	36	100	0	0	0,0	0
2,0	1,0	2,0	36	36	100	14	38	0,3	>30
2,0	1,5	1,5	36	36	100	9	25	0,5	>30
2,0	1,5	2,0	36	36	100	0	0	0,0	0
2,0	2,0	1,5	36	36	100	31	85	1,2	>30
2,0	2,0	2,0	36	36	100	0	0	0,0	0

NF : nombre de feuilles cultivées ; NEC : nombre d'explants montrant une callogenèse ; C (%) : pourcentage de callogenèse ; NEAD : nombre de feuilles montrant une régénération de pousses adventives ; S (%) : pourcentage de pousses adventives ; TMP : taille moyenne des pousses néoformées ; NMPE : nombre moyen de pousses par explant

En dehors de cette combinaison hormonale, les pousses obtenues sont en majorité malformées et présentent des signes de vitrification (Fig. 3). En outre, malgré le nombre élevé de bourgeons néoformés, la taille moyenne des pousses demeure très faible et la majorité n'est pas apte à être utilisée pour les étapes ultérieures de multiplication et d'enracinement.

A la lumière de ces résultats il apparaît donc que les combinaisons trihormonales (BAP, AIB, ANA) respectivement de (0,5, 1,0, 0,5) et (1,5, 2,0, 0,5) mg l⁻¹ demeurent les plus adéquates pour l'induction de pousses adventives vigoureuses. Ces deux combinaisons ont permis d'induire la néoformation de bourgeons adventifs avec un pourcentage très élevé d'explants, 75 et 80% respectivement (Table 1). La taille moyenne des pousses obtenues après 7 semaines de culture est comprise entre 2,8 et 4,5 cm.

De plus, la callogenèse observée est remarquable et a été forte essentiellement à des concentrations en BAP supérieures à $0,5 \text{ mg l}^{-1}$. Toutefois, les concentrations élevées en ANA entraînent une croissance démesurée des cals, généralement friables et de couleur blanche jaunâtre, qui deviennent rapidement hyperhydriques et se nécrosent (Fig. 4).

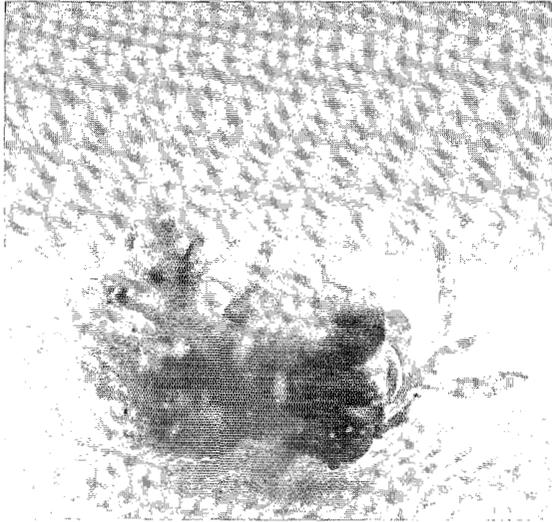


Fig. 1. Régénération directe de pousses adventives en présence de BAP ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$), AIB ($1,0 \text{ mg l}^{-1}$) et d'ANA ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$).



Fig. 2. Formation de cals laiteux sur des pousses adventives obtenues en présence de BAP ($1,5 \text{ mg l}^{-1}$), AIB ($2,0 \text{ mg l}^{-1}$) et d'ANA ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$).

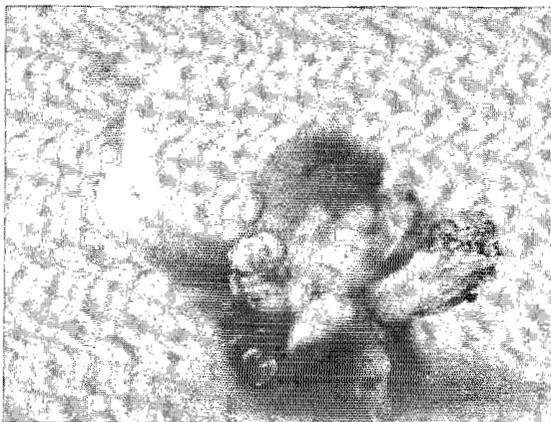


Fig. 3. Pousses vitrifiées et malformées obtenues en présence de BAP ($2,0 \text{ mg l}^{-1}$), AIB ($2,0 \text{ mg l}^{-1}$) et d'ANA ($1,5 \text{ mg l}^{-1}$).

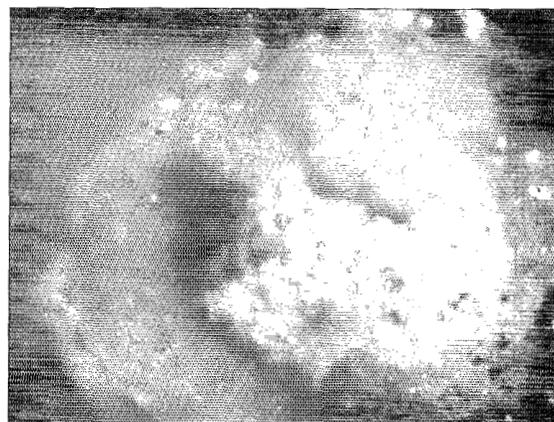


Fig. 4. Callogenèse intense obtenue en présence de concentrations élevées en ANA ($>1,0 \text{ mg l}^{-1}$).

Enracinement et acclimatation

Après 15 jours de culture sur milieu rhizogène, plus de 80% de pousses cultivées sont racinées. La qualité des racines et le nombre des racines par pousses sont très importants.

En serre, le pourcentage de reprise des vitroplants atteint plus de 75%. Ce résultat est en grande partie attribué à la vigueur des pousses adventives régénérées et à la qualité des racines induites sur celles-ci. 7 à 9 semaines après leur sortie du laboratoire (Fig. 5), en plus de la vigueur importante, les vitroplants possèdent déjà des feuilles composées caractéristiques de l'état adulte.

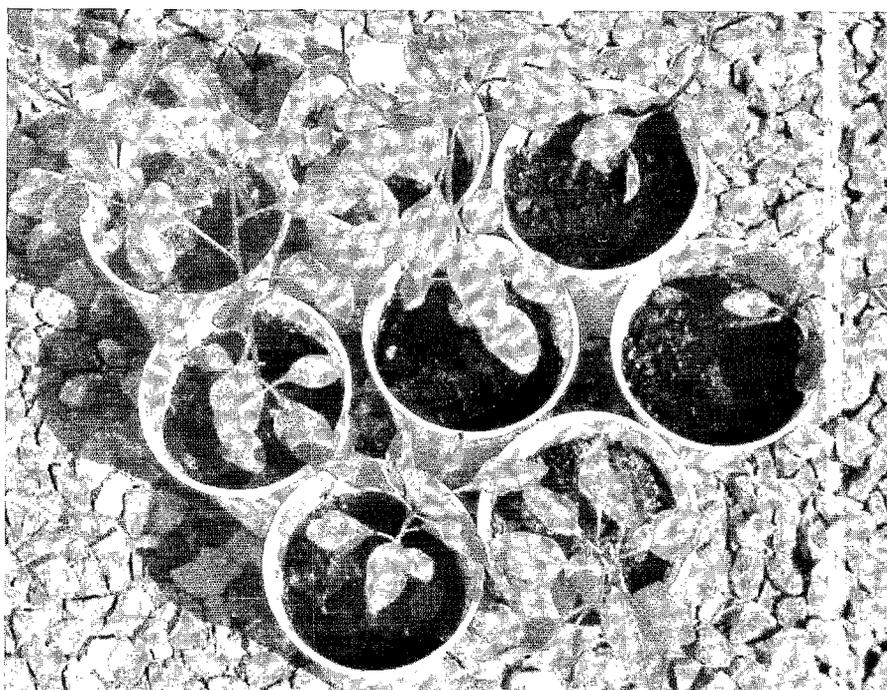


Fig. 5. Acclimatation de pistachiers cv. Mateur obtenus après organogenèse *in vitro*.

Discussion

La culture *in vitro* de feuilles issues d'embryons zygotiques nous a permis de mettre en évidence l'effet du rajeunissement sur les potentialités d'organogenèse des tissus foliaires (Drira, 1985 ; Bolyard *et al.*, 1991 ; Rowland et Ogden, 1992). Les résultats confirment ceux déjà obtenus sur les cotylédons (Chatibi *et al.*, 1996) et montrent que chez le pistachier une trentaine de combinaisons trihormonales, à base de BAP, AIB et ANA, sont capables d'induire la néoformation de bourgeons adventifs. Deux combinaisons hormonales composées de BAP, AIB et ANA à des concentrations respectives de 0,5/1,0/0,5 mg l⁻¹ et de 1,5/2,0/0,5 mg l⁻¹ ont été retenues en raison du faible taux de callogenèse, de la vigueur et du nombre de pousses obtenues. La combinaison BAP/AIB/ANA respectivement de 1,5/2,0/0,5 mg l⁻¹ peut être utilisée aussi bien pour la culture de feuilles que pour celle de cotylédons (Chatibi *et al.*, 1996), issus du reste du même embryon zygotique. Ceci est d'autant plus compréhensible que les deux organes sont anatomiquement, physiologiquement et génétiquement semblables.

Nous n'avons pas constaté d'amélioration sensible quant à la production en masse de vitroplants, et la culture *in vitro* de feuilles juvéniles ne semble pas meilleure que celles des cotylédons bien que, après acclimatation, les vitroplants issus de feuilles se comportent de la même manière que ceux issus d'apex méristématiques ou de cotylédons (Chatibi *et al.*, 1995 et 1996). En effet, les bourgeons adventifs obtenus par culture de feuilles sont moins nombreux que ceux obtenus par culture de cotylédons et de qualité moindre. Il en résulte que, contre toute attente, nous avons obtenus comparativement moins de plants acclimatés.

Au contraire, une callogenèse plus riche a été observée au cours de la culture de feuilles et ceci concerne aussi bien pour le nombre que la qualité et la diversité des cals obtenus. Ceci pourrait être avantageusement exploité dans la production d'embryons zygotiques ou de protoplastes.

Conclusion

La culture *in vitro* du pistachier (*Pistacia vera* L.) cv. Mateur à partir d'apex méristématiques et de boutures uninodales prélevés sur des pieds-mères âgés de quatre ans a montré que l'obtention de plants acclimatés demeure réduite et insuffisante pour la production en masse du pistachier (Chatibi *et al.*, 1995). En effet, la conduite de telles cultures au laboratoire est rendue précaire en raison de contaminations excessives, de l'oxydation des explants et de la perte précoce de leurs potentialités de multiplication. En outre, une grande partie des vitroplants racinés et acclimatés périt suite à une nécrose apicale des pousses et à un système racinaire fragile incapable de se maintenir longtemps. Ces premières tentatives nous ont permis de constater que le rajeunissement physiologique des vitroplants représente un facteur essentiel aussi bien pour le maintien des potentialités végétatives que pour l'enracinement, la vigueur des plants *in vitro* ayant un effet latent indéniable sur l'enracinement. Le recours à la culture de cotylédons (Chatibi *et al.*, 1996) et aux feuilles d'embryons zygotiques semble avoir résorbé une grande partie de ces difficultés.

En effet, l'importance d'un traitement donné, sur la régénération de bourgeons adventifs à partir de feuilles, réside dans la balance hormonale entre BAP, AIB et ANA, qui permet d'éviter un déséquilibre physiologique chez les pousses régénérées et d'assurer leur survie et leur développement ultérieurs. Nous avons observé que les pousses obtenues en présence de concentrations élevées en BAP sont en majorité vitrifiées et malformées surtout lorsque la concentration en ANA est supérieure à 1,0 mg l⁻¹. Ceci serait le résultat d'une toxicité hormonale telle que signalée par Drew (1992). Les régulateurs de croissance utilisés au cours de ces expériences, selon leur nature, concentration ainsi que leur équilibre au sein d'une même combinaison, sont capables de modifier le "registre" de la totipotence cellulaire et l'extériorisation des potentialités d'organogenèse chez les feuilles du *Pistacia vera* L. cv. Mateur. Ceci rejoint ce qui a été observé par Drira (1985) chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) et Tao et Sugiura (1992) chez le persimmon (*Japanese persimmon*). Toutefois, devant l'hétérogénéité des résultats obtenus, il demeure difficile de déterminer l'importance d'un régulateur de croissance par rapport à un autre quant au processus d'organogenèse.

En ce qui concerne la production en masse de pistachier cv. Mateur, il semble que la culture *in vitro* de cotylédons soit préférable à celle des feuilles issues du même embryon zygotique. Toutefois, l'importante callogenèse observée par culture *in vitro* de cotylédons (Chatibi *et al.*, 1996) et surtout de feuilles pourrait être exploitée activement dans l'augmentation de la variabilité chez le pistachier. En particulier, la diversité des formes et textures des cals obtenus pourrait être mise à profit pour l'isolement de protoplastes et ouvrir ainsi la voie aux hybridations somatiques.

Enfin, les plants obtenus, aussi bien par culture de cotylédons que de feuilles embryonnaires, demeurent génétiquement différents du pied-mère, donc du cultivar d'origine. Et, bien qu'il soit difficile d'estimer actuellement la valeur commerciale des vitroplants obtenus avant leur entrée en production, une estimation de la variabilité génétique est possible par analyse moléculaire et/ou des systèmes enzymatiques (Rovira *et al.*, 1995).

Références

- Abousalim, A. et Mantell, S.H. (1994). A practical method for alleviating shoot-tip necrosis symptoms in *in vitro* shoot culture of *Pistacia vera* L. cv. Mateur. *J. Hort. Sci.*, 69(2) : 357-365.
- Barghchi, M. et Alderson, P.G. (1989). Pistachio (*Pistacia vera* L.) Dans : *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 5. Trees II. Bajaj, Y.S.P. (ed.). pp. 68-98.
- Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Cheng, J. et Sticlen, M. (1991). Shoot regeneration from leaf explants of American and Chinese Elm. *HortScience*, 26(12) : 1554-1555.
- Chatibi, A., Kchouk, M.L., Ben Abdallah, F., Zemni, H. et Ghorbel, A. (1995). Rooting improvement of *Pistacia vera* L. cv. Mateur by *in vitro* culture of apices and cuttings. *Acta Horticulturae*, 419 : 213-219.

- Chatibi, A., Kchouk, M.L., Mliki, A. et Ghorbel, A. (1996). Use of growth regulators for adventitious shoot regeneration and plant propagation from mature cotyledons of pistachio (*Pistacia vera* L.). soumis à *Acta Horticulturae*.
- Debergh, P.C. et Zimmerman, R.H. (1991). *Micropropagation. Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, p. 483.
- Drew, R.A. (1992). Improved technics for *in vitro* propagation and germplasm storage of Papaya. *HortScience*, 27(10) : 1122-1124.
- Dira, N. (1985). *Multiplication végétative du palmier dattier (Phoenix dactylifera L.) par les néoformations induites en culture in vitro sur des organes végétatifs et floraux prélevés sur la phase adulte*. Thèse de Doctorat d'Etat Es-Sciences Naturelles. Université Tunis II. Fac. Sci. Tunis. p. 121.
- Gonzalès Garcia, A. (1990). Boron and pH effect on shoot proliferation of *Pistacia vera* L. cultivated *in vitro*. Dans : *Amélioration Génétique de deux Espèces de Fruits Secs Méditerranéens : l'Amandier et le Pistachier*, VIII^e Colloque GREMPA, Nîmes, France, 26-27 juin 1990, Grassely (Ed.). pp. 329-332.
- Martinelli, A. (1988). Use of *in vitro* technique for selection and cloning of different *Pistachia* species. *Acta Horticulturae*, 227 : 436-437.
- Mlika, M. (1980). *Contribution à l'étude du pistachier en Tunisie : choix des variétés mâles et femelles à floraison synchrone- Anatomie des fleurs*. Mémoire de fin d'études du cycle de spécialisation. INAT, Tunisie.
- Murashige, T. et Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, 15 : 473-497.
- Quoirin, M. et Lepoivre, Ph. (1977). Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. *Acta Horticulturae*, 78 : 437-442.
- Rovira, M., Battele, I., Romero, M. et Vargas, F.J. (1995). Isoenzymic identification of *Pistacia* species. *Acta Horticulturae*, 419 : 265-270.
- Rowland, L.J. et Ogden, E.L. (1992). Use of cytokinin conjugate for efficient shoot regeneration from leaf sections of Highbush blueberry. *HortScience*, 27(10) : 1127-1129.
- Tao, R. et Sugura, A. (1992). Adventitious buds formation from callus cultures of *Japanese Persimmon*. *HortScience*, 27(3) : 259-261.