

Effet du milieu de culture sur le microbouturage de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine Marocaine

Najiba Brhadda ⁽¹⁾, Abdelhadi Abousalim ⁽²⁾, Dou Elmacane Walali Loudiyi ⁽²⁾, Doha Benali ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Laboratoire de Physiologie végétale. Département de Biologie. Faculté des Sciences. Université Ibn Tofail. Kenitra (Maroc). E-mail : brhadda@hotmail.com

⁽²⁾ Département d'Horticulture. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II. B.P. 6202, Madinat Al Irfane (10101). Rabat (Maroc).

Reçu le 3 juin 2003, accepté le 29 septembre 2003

En vue d'étudier la prolifération *in vitro* de pousses du cultivar d'olivier "Picholine Marocaine", issues de matériel âgé de 30 ans, cinq milieux de culture ont été éprouvés : le milieu de base OM (Milieu d'Olivier), 1/2 MS (Murashige et Skoog dont les macroéléments ont été réduits de moitié), WPM (Lloyd et McCown), 1/2 Miller (Miller dont les macroéléments ont été réduits de moitié) et K&H (milieu composé des macroéléments de Knop et des microéléments de Heller), additionnés de la Zéatine à 5 mg/l. Les milieux OM et 1/2 MS se sont montrés plus réactifs au début de la phase de prolifération avec respectivement 91,6 % et 90,9 %. Les pourcentages les plus élevés de nouvelles pousses par explant ont été obtenus dans les milieux 1/2 MS et OM (67 et 65 % respectivement). Mais le milieu OM s'est distingué par la suite, d'une part en favorisant une meilleure croissance des pousses (12,4 mm) suivi par le milieu 1/2 MS (8,9 mm) et, d'autre part, du fait qu'il n'a pas induit de vitrification. L'utilisation des autres milieux testés a été associée à un développement important de cals et à l'apparition de chlorose, et la réduction de la croissance des pousses a été notable.

Mots-clés. Olivier, *Olea europaea* L., micropropagation, milieu de culture, culture *in vitro*.

Effect of culture medium on micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Moroccan Picholine. The effect of the basal media OM (Olive Medium), 1/2 MS (Murashige et Skoog with half strength macronutrients), WPM (Lloyd and McCown), 1/2 Miller (Miller with half strength macronutrients), and K&H (medium with Knop macronutrients and Heller micronutrients), supplemented with 5 mg/l Zeatine, on shoot proliferation of mature 'Moroccan Picholine' cultivar (30 years old) was investigated. OM and 1/2 MS media were the most effective at the early stages of proliferation. A microcutting percentage of up to 91,6 and 90,9 % were achieved in OM and 1/2 MS media respectively but OM was distinguished later by permitting a better shoot growth with no vitrification symptoms. The highest percentages of new shoots per explant were obtained with 1/2 MS and OM media (67 and 65 % respectively). OM was the most effective for shoot height (12,42 mm) followed by 1/2 MS (8,92 mm). The other tested media induced an important callus development and leaf chlorosis, and the reduction of shoot growth was noticeable.

Keywords. Olive, *Olea europaea* L., micropropagation, culture medium, *in vitro* culture.

1. INTRODUCTION

L'olivier constitue dans la plupart des pays du bassin méditerranéen la principale essence fruitière, tant par le nombre d'arbres cultivés que par l'importance sociale et économique de sa culture et son rôle environnemental. L'olivier est multiplié commercialement essentiellement par bouturage semi-ligneux (Abousalim *et al.*, 1993). La multiplication de l'olivier a peu à peu intégré les techniques de culture *in vitro* principalement le microbouturage. Cette technologie fraie de nouveaux chemins pour la production en

masse de matériel sélectionné. Elle ne se limite pas au seul coefficient de rapidité de la multiplication, mais il s'est avéré que les plantes autoracinées *in vitro* sont plus vigoureuses et plus résistantes aux maladies (Cimato, 1999). Ainsi, pour maintenir l'intégrité génétique des clones, la mise en culture des microboutures, puis la stimulation des bourgeons axillaires et leur prolifération constituent la méthode la plus généralement appliquée en micropropagation des ligneux (Walali Loudiyi, 1993).

La réussite du microbouturage *via* la culture *in vitro*, est influencée par plusieurs facteurs, dont la

composition minérale (Rugini, 1984 ; Berenguer, Gonzalez, 1989 ; Bartolini *et al.*, 1989 ; Leva *et al.*, 1992) et hormonale (Leva *et al.*, 1992, Mencuccini, 1995 ; Rama, Pontikis, 1990) des milieux de culture, le génotype (Rugini, 1984 ; Leva *et al.*, 1992) et l'âge de l'explant (Porlingis, Therios, 1976 ; Rugini, 1986).

Les quelques travaux achevés sur le microbouturage de l'olivier ont abouti à la régénération des plantes seulement chez certains cultivars, notamment "Dolce agogia" (Rugini, Fontanazza, 1981) ; "Frantoio", "Dolce agogia" et "Moraiolo" (Rugini, 1984) ; "Maurino" (Leva *et al.*, 1992) et récemment "Chondrolia chalkidikis" (Grigoriadou *et al.*, 2002). Diverses compositions minérales ont été utilisées pour la micropropagation de ces divers cultivars d'olivier et les formulations retenues semblent varier selon le génotype utilisé. Les études effectuées chez le cultivar "Picholine Marocaine", qui représente près de 98 % des plantations oléicoles au Maroc, ont surtout concerné le microbouturage du matériel juvénile (Walali Loudiyi, 1989), avec l'étude des effets des différentes cytokinines (Brhadda *et al.*, 2002) et des différentes auxines (Walali Loudiyi *et al.*, 1999). Chez ce cultivar, les facteurs contrôlant la germination *in vitro* des embryons zygotiques ont été également étudiés (Brhadda *et al.*, 2000) ainsi que ceux permettant d'obtenir l'embryogenèse somatique (Brhadda *et al.*, 2003). Ce dernier travail a d'ailleurs mis en évidence l'effet du milieu de culture et a montré la supériorité du milieu MS par rapport à d'autres formulations testées. La micropropagation du matériel adulte reste encore difficile et d'autres travaux s'imposent pour mettre au point un processus de microbouturage adéquat. Dans ce travail, l'effet de la composition minérale du milieu de culture sur la prolifération de matériel adulte de la "Picholine Marocaine" a été étudié.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal utilisé et méthode de désinfection

Les explants utilisés proviennent de la "Picholine Marocaine", variété à double fin et représentant près de 98 % des plantations d'olivier au Maroc. Les pousses ont été prélevées à partir de matériel adulte provenant d'arbres âgés de 30 ans.

Les pieds-mères d'olivier ont été traités avec le cryptanol à la concentration de 10 g/l, et ce 15 jours avant le prélèvement des pousses. Ces dernières ont ensuite été essuyées avec du coton imbibé de Tween 20 et lavées, pendant quelques minutes sous l'eau courante. Les microboutures ont enfin été trempées pendant 3 minutes dans le chlorure de mercure (HgCl₂) à 677 mg/l contenant 2 à 3 gouttes de Tween

20, avant d'être rincées abondamment à l'eau distillée stérile.

Après la phase d'établissement, les microboutures ont été mises en culture dans un milieu de prolifération additionné de 5 mg/l de Zéatine (Sigma) et de 30 g/l de saccharose. Les milieux testés sont : le milieu de base de l'olivier OM (Rugini, 1984), 1/2 MS (Murashige et Skoog, 1962 ; dont les macroéléments ont été réduits de moitié), WPM (Lloyd et Mc Cown, 1981), 1/2 Miller (Miller, 1967 ; dont les macroéléments ont été réduits de moitié) et enfin le milieu K&H composé des macroéléments de Knop (1965, cité par George et Sherrington, 1984) et des microéléments de Heller (1953). Les milieux de culture ont été solidifiés par l'agar (Bactériologique, Difco) à 0,8 %. L'autoclavage a lieu pendant 20 minutes à 121 °C après ajustement du pH à 5,8 avec le HCl ou le NaOH (0,1N). Les milieux de culture ont été répartis dans des tubes à essai (2,5 × 15 cm) à raison de 15 ml par tube.

Après 20 jours de culture, les microboutures ont été transférées dans des milieux frais dépourvus de régulateurs de croissance et ceci dans l'optique de favoriser l'allongement des pousses. L'incubation a lieu à 25±2°C, sous une photopériode de 16 heures.

2.2. Analyses statistiques

Un dispositif complètement aléatoire a été adopté et 36 explants ont été utilisés par traitement. Le test de Newman et Keuls (Dagnelie, 1980) au seuil de 5 % a été utilisé pour le classement des moyennes. Les pourcentages 0 et 100 ont subi, respectivement, la transformation (1/4n) et (1-1/4n), n étant le nombre d'explants mis en culture ; les pourcentages ont subi la transformation $\arcsin \sqrt{P}$ avant de procéder à l'analyse de variance.

3. RÉSULTATS

3.1. Effet du milieu de culture sur le débourrement

Les résultats obtenus ont montré des réactions très différentes du comportement des explants suivant les milieux de prolifération utilisés. Ceux-ci ont significativement (P 0,001) affecté le débourrement des bourgeons axillaires. En effet, pour l'entrée en activité des bourgeons axillaires, les milieux OM et 1/2 MS se sont montrés globalement les plus réactifs avec, respectivement, 92 et 91 % de débourrement. La différence avec les autres milieux testés (1/2 Miller, WPM et Knop-Heller) est très hautement significative. En effet, sur ces derniers, les pourcentages de débourrement observés des bourgeons axillaires sont

seulement de 67 –50 et 33 % respectivement. Concernant la vitesse de débourrement, on constate que le nombre de bourgeons débourrés a été de 10 % pour le milieu OM après une semaine de culture et ce n'est qu'après 15 jours de culture que le débourrement a été important pour les deux milieux OM et 1/2 MS. Dans le cas des autres milieux, l'activité des bourgeons n'a été appréciable qu'à partir de la quatrième semaine de culture. Il est à signaler aussi que seuls les explants mis en culture sur les milieux OM et 1/2 Miller ont présenté un feuillage verdâtre d'un aspect morphologique tout à fait conforme à celui de la plante mère. Les milieux Knop-Heller et WPM ont cependant induit le développement de feuilles chlorotiques, avec un feuillage de taille réduite dans le cas d'utilisation du milieu WPM. Les symptômes de vitrification ont également été observés dans le cas du milieu 1/2 MS.

Concernant la formation des cals au niveau des parties basales des microboutures, les développements les plus importants ont été obtenus dans le milieu Knop-Heller suivi des milieux 1/2 Miller et WPM.

3.2. Effet de la composition du milieu de culture sur le pourcentage et l'allongement des pousses

Le nombre de pousses formées a significativement ($P < 0,001$) été affecté par le milieu de culture. Le pourcentage le plus élevé a été obtenu dans les milieux 1/2 MS et OM (67 et 65 %, respectivement) et sont suivis par les milieux 1/2 Miller (42 %), Knop-Heller (36 %) et par WPM (25 %).

Le milieu de culture a aussi affecté significativement ($P < 0,001$) la longueur des pousses et ce après deux subcultures successives (**Tableau 1**). OM, ayant permis la production de pousses de 12,4 mm de long, s'est distingué des autres milieux testés et est suivi par

Tableau 1. Effet du milieu de culture sur le pourcentage des pousses nouvellement formées et sur la longueur après deux subcultures. Les pourcentages suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents selon la méthode de Newman et Keuls au seuil de 5 %.— *Effect of the culture medium on the number of new shoots (%) and on their length, after 2 subcultures. The percentage marked with the same letter are not significantly different.*

Type de morphogénèse	OM	1/2 MS	1/2 Miller	WPM	Knop-Heller
Pousses (%)	65 a	67 a	42 b	25 d	36 c
Pousses, longueur (mm)	12,42 a	8,92 b	5,57 b	3 d	3,31 d

OM = Rugini (1984) ; 1/2 MS = Murashige et Skoog (1962) ; 1/2 Miller = Miller (1967) ; WPM = Lloyd et Mc Cown (1981) ; Knop-Heller = milieu composé des macroéléments de Knop (1965) et des microéléments de Heller (1953).

1/2 MS (8,9 mm). Il est à noter que l'utilisation du milieu 1/2 MS a été accompagnée de l'apparition de symptômes de vitrification ayant atteint un niveau de 30 %.

4. DISCUSSION ET CONCLUSION

La composition du milieu de mise en culture joue un rôle très important dans l'organogénèse. L'effet d'un milieu de culture résulte de l'ensemble des interactions des différents éléments qui le composent. Certains d'entre eux stimulent les processus du développement *in vitro*, d'autres par contre ont peu d'influence sur le débourrement (Thorpe, 1980 ; Rugini, 1986 ; Rugini, Caricato, 1995 ; Grigoriadou *et al.*, 2002 ; Brhadha *et al.*, 2003).

Les milieux OM et 1/2 MS ont permis d'obtenir les meilleurs pourcentages de débourrement chez les microboutures de matériel adulte du cv. "Picholine Marocaine". Ce résultat confirme celui obtenu chez le matériel juvénile (souquets)¹ du même cultivar (Walali Loudiyi, 1989). L'utilisation des autres milieux testés (WPM, 1/2 Miller et K&H) a été associée à un développement important de cals, à l'apparition de chlorose et à une réduction de la croissance des pousses. Rugini (1984) a fait des observations similaires dans le cas de certains milieux, notamment WH (Wite, 1963), LM (Litvay *et al.*, 1981) et Knop (1965, cité par George et Sherrington, 1984) ayant manifesté une faible prolifération.

Les milieux testés diffèrent essentiellement par la teneur en azote total et en nitrates. Les milieux 1/2 MS et OM se distinguent des autres milieux testés par leurs teneurs élevées en azote total (30 et 26, 24 méq/l) et en nitrates (19,7 et 21,1 méq/l, respectivement). L'effet stimulateur de l'azote dans le phénomène d'organogénèse a été signalé chez l'olivier (Rugini, 1988 ; Brhadha *et al.*, 2003) et chez plusieurs autres espèces telles que le maïs (Miao, 1980) et le blé (Feng, Ouyang, 1988). Caboche (1987) a évoqué le rôle très important du rapport azote/hydrates de carbone dans le contrôle de la biosynthèse des régulateurs de croissance dans les tissus indifférenciés chez *Nicotiana plumbaginifolia* (Viviani) et a signalé que les nitrates assurent d'autres fonctions encore inconnues dans la morphogénèse.

Il a aussi été rapporté qu'un déficit de croissance *in vitro* dans un milieu dilué peut être corrigé par

¹ Les souquets sont des protubérances ligneuses formées spontanément au niveau du tronc de l'arbre, à sa base ou dans le sol. Après leur dissection au moyen d'une scie, les souquets, désinfectés et mis en culture dans des bacs garnis de vermiculite maintenue humide, peuvent donner des petits bourgeons donnant naissance à des pousses d'olivier qui peuvent servir de matériel de départ pour la culture *in vitro*.

l'augmentation de la concentration du milieu en NH_4NO_3 (McCown, Sellmer, 1987). Par ailleurs, dans le milieu 1/2 MS, on a constaté que certaines plantules présentent une vitrification. Zryd (1988) affirme que la plupart des cas de vitrification des plantules de Pêcher (*Prunus* sp.) sont constatés dans le milieu de Murashige et Skoog (1962) qui est particulièrement riche en nitrate d'ammonium. De même, Beauchesne (1981) a constaté que les microboutures de *Salix babylonica* (Linné) mises en culture sur le milieu MS montrent une hypolignification. Selon cet auteur, cet aspect pathologique pourrait être dû à la forte concentration en ammonium. Gaspar *et al.* (1987) indiquent que les plantes vitrifiées présentent une lignification déficiente, et qu'une carence en lignine et en cellulose pourrait résulter de la diminution du rapport hydrates de carbone/azote dû à l'excès d'azote. Ces auteurs ajoutent que les peroxydases basiques des plantes vitreuses montrent une augmentation d'activité ce qui indiquerait une baisse du niveau auxinique endogène. Si l'on considère que l'auxine est un élément clé de la différenciation cellulaire, cette diminution du taux en auxine endogène pourrait expliquer l'hypolignification des plantes vitreuses (Philips, 1980).

Aussi le milieu OM est caractérisé par la présence des teneurs les plus élevées en ions K^+ , Ca^{++} et Mg^{++} (20,08 ; 11,06 et 12,17 méq/l respectivement) comparativement aux autres milieux testés. L'effet bénéfique de K^+ et Ca^{++} sur l'organogenèse a été signalé par certains auteurs (David *et al.*, 1978 ; Bornman, 1983). Margara (1978) fait remarquer qu'un milieu très riche en potassium est favorable à la production de bourgeons chez la betterave et à la production des inflorescences chez l'endive et le chou-fleur. De même, Alskief (1978) rapporte que le milieu de Miller riche en potassium, calcium et ammonium favorise le développement des bourgeons sur les microboutures de Citrange troyer.

En comparant l'effet de quatre milieux différents sur les explants à un nœud chez *Picea abies* (L. Karst.) Bornman (1983) a trouvé que la faible concentration de Ca^{++} dans le milieu LM (20 fois inférieure à celle du milieu MS) explique pourquoi le milieu LM (Litvay *et al.*, 1981) est le moins efficace dans la morphogenèse. Cet élément joue un rôle important dans la stimulation de l'activité méristématique de la partie apicale de la pousse nouvellement formée (Bornman, 1983).

Les milieux 1/2 MS et OM sont aussi caractérisés par les concentrations les plus élevées en manganèse (99,97 μM) et le milieu OM est le plus riche en zinc et bore (49,72 et 200,51 μM , respectivement). Ces ions Mn, Zn et Bo pourraient aussi être impliqués dans l'amélioration du microbouturage de la "Picholine Marocaine". Margara (1978) a signalé que l'emploi

d'une solution enrichie en Mn, Zn et Bo est généralement très favorable à l'organogenèse. Un niveau relativement plus élevé de bore a induit un accroissement linéaire du nombre de nœuds chez l'olivier (Briccoli, Lambardo, 1988).

En analysant les éléments minéraux dans les bourgeons apicaux et les embryons d'olivier, Rugini (1984) a trouvé d'importantes quantités de Ca, S, Cu et Zn. Basé sur ces données, le milieu OM a été développé. Ce milieu a permis une prolifération des bourgeons axillaires issus d'un nœud après seulement une semaine. Le taux de multiplication a été 9 à 10 fois plus important après 40 jours chez les cultivars "Dolce agogia", "Moraiolo" et "Frantoio". L'idée de Rugini (1984) a été partagée par McCown et Sellmer (1987) qui ont signalé que des corrélations existeraient entre les exigences, les conditions de culture de la plante *in vivo* et les besoins nutritifs de ses tissus en culture *in vitro*.

Le milieu OM a été plus bénéfique que le milieu MS pour le microbouturage de l'olivier cv "Picual" (Berenguer, Gonzalez, 1989). Par ailleurs, Bartolini *et al.* (1989) ont trouvé que c'est le milieu MS qui est plus bénéfique que OM pour la multiplication du cultivar "Maurino". Chez le cultivar "Chalkidikis", Grigoriadou *et al.* (2002) ont montré que le milieu WPM a permis une meilleure prolifération des pousses comparativement au milieu OM. Ces résultats indiquent que le facteur génétique est déterminant dans le choix du milieu de culture à utiliser, ce qui nécessite l'adaptation de la composition minérale du milieu au cultivar à multiplier. Cette différence serait liée à des exigences nutritionnelles variables selon le génotype.

Bibliographie

- Abousalim A., Walali LDM., Slaoui K. (1993). Effet du stade phénologique sur l'enracinement des boutures semi-ligneuses de l'olivier en tablettes chauffantes. *Olivae* **46**, p. 30–37.
- Alskief J. (1978). *La micropropagation in vitro de quelques arbres fruitiers*. Thèse doctorat Phytotechnie, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 134 p.
- Bartolini G., Leva AR., Benelli A. (1989). Advances *in vitro* culture of the olive: propagation of cv. Maurino. *Acta Hort.* **286**, p. 41–44.
- Beauchesne G. (1981). Les milieux minéraux utilisés en culture *in vitro* et leur incidence sur l'apparition de boutures d'aspect pathologique. *CR. Acad. Agric. Fr.* **67** (16), p. 1389–1397.
- Berenguer B., Gonzalez G. (1989), cité par Cimματο

- (1999). Ressources génétiques. *Actes du séminaire international sur les innovations scientifiques et leur application en oléiculture et oléotechnie, 10, 12 Mars (1999)*. Florence, Italie : Conseil oléicole international, p. 1–30.
- Bornman CH. (1983). Possibilities and constraints in the regeneration of trees from cotyledonary needles of *Picea abies in vitro*. *Physiol. Plant.* **57**, p. 5–16.
- Brhadda N., Walali LDM., Abousalim A., Benali D. (2000). Effet de la température et de l'endosperme sur la dormance et la germination des embryons d'olivier (*Olea europaea* L.) variété Picholine marocaine. *Agronomie* **20**, p. 643–653.
- Brhadda N., Walali LDM., Abousalim A., (2002). Étude de l'effet du type et de la concentration de cytokinines sur la prolifération de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine marocaine. *Actes des VIII^e Journées Scientifiques - AUF - Marrakech 7–9 octobre 2002, Maroc*, p. 118–120.
- Brhadda N., Abousalim A., Walali LDM. (2003). Effets du milieu de culture et de la lumière sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv Picholine marocaine. *Fruit* **85** (3), p. 1–14.
- Briccoli BC., Lambardo N. (1988). Prove di radicazione sulla cultivar di olivo Maiatica di Ferrandina. *Ann. Ist. Sper. Oliv.* **Vol III**, p. 123–130.
- Caboche M. (1987). Nitrogen carbohydrate and zinc requirements for the efficient induction of shoot morphogenesis from protoplast-derived colonies of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Cell. Tissue Org. Cult.* **8**, p. 197–206.
- Cimato A. (1999). Propagation et certification des plants. L'élevage des plants d'olivier en pépinière. *Actes du séminaire international sur les innovations scientifiques et leur application en oléiculture et oléotechnie, 10–12 mars 1999*. Florence, Italie : Conseil oléicole international, p. 1–30.
- Dagnelie P. (1980). *Théorie et méthodes statistiques. II. Applications agronomiques*. Gembloux, Belgique : Les Presses agronomiques de Gembloux, 463 p.
- David HK., Isemukali K., David A. (1978). Obtention de plants de pin maritime (*Pinus pinaster* Soland.) à partir de brachyblastes ou d'apex caulinaires de très jeunes sujets cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sci.* **287**, p. 245–248.
- Feng GH., Ouyang J. (1988). The effects of KNO₃ concentration in callus induction medium for wheat anther culture. *Plant Cell. Tissue Org. Cult.* **12**, p. 3–12.
- Gaspar T., Kevers C., Debergh R., Maene L., Paques M., Boxus P. (1987). Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In Bonga JM., Durzan DJ. (eds). *Cell and tissue culture in forestry. Vol 1: General principles and biotechnology*. Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff, p. 152–166.
- George EF., Sherrington PD. (1984). *Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories*. London: Excegetics, 709 p.
- Grigoriadou K., Vasilakakis M., Eleftheriou EP. (2002). *In vitro* propagation of the Greek olive cultivar *Chondrolia Chalkidikis*. *Plant Cell, Tissue Org. Cult.* **71** (1), p. 47–54.
- Heller R. (1953). Recherches sur la nutrition minérale des tissus cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Biol. Vég.* **14**, p. 1–223.
- Leva AR., Petrucelli R. Goretti., Panicucci M. (1992). Ruolo di alcuni microelementi carboidrati nella proliferazione *in vitro* di cv. Di olivo (*Olea europaea* L.) In *Atti qualità olio extravergine di oliva, Firenze, 1–3 Dicembre, 1992*, p. 333.
- Lloyd DG., McCown BH. (1981). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Plant Prop. Soc. Proc.* **30**, p. 421–427.
- Litvay JD., Johnson MA., Verma DC., Einspahr D., Weyrauch K. (1981). Conifer suspension culture medium development using analytical data from developing seeds. *IPC Tech. Pap.* **115**, p. 1–17.
- Margara J. (1978). Mise au point d'une gamme de milieux minéraux pour les conditions de la culture *in vitro*. *C. R. Acad. Sci.* **8**, p. 654–661.
- McCown BH., Sellmer JC. (1987). General media and vessels suitable for woody plant culture. In Bonga JM., Durzan DJ. (eds). *Cell and tissue culture in forestry. Vol 1: General principles and biotechnology*. Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff, p. 4–16.
- Mencuccini M. (1995). Micropropagazione e miglioramento genetico *in vitro* dell'olivo. Stato dell'arte e prospective future. *Riv. Fruttic. Ortofloricolt.* **57** (12), p. 73–82.
- Miao SH. (1980). Effects on NH₄⁺ on embryoid generation from pollens of maize. *Acta Bot. Sin.* **22** (4), p. 356–359.
- Miller M. O. (1967). Cytokinines in *Zea mays*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **144**, p. 250–257.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**, p. 473–492.
- Philips R. (1980). Cytodifferentiation. In Vasil IK. (ed). *Perspectives in plant cell and tissue culture*. New York : Academic Press, p. 55–70.
- Porlingis IC., Therios I. (1976). Rooting response of juvenile and adult leafy olive cutting to various factors. *J. Hort. Sci.* **51** (1), p. 31–39.
- Rama P., Pontikis CA. (1990). *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea sativa* L.) Kalamon. *J. Hort. Sci.* **65**, (3), p. 347–353.
- Rugini E. (1984). *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoot and embryo. *Sci. Hort.* **24**, p. 123–134.
- Rugini E. (1986). Olive (*Olea europaea* L.). In Bajaj YPS. (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry. Vol 5. Trees I*. Berlin: Springer-Verlag, p. 253–267.

- Rugini E. (1988). Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.). *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* **14**, p. 207–214.
- Rugini E., Caricato G. (1995). Somatic embryogenesis and recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) “Canino” and “Moraiolo”. *Plant Cell Rep.* **14**, p. 257–260.
- Rugini E., Fontanazza G. (1981). *In vitro* propagation of “Dolce agogia” olive. *Hort. Sci.* **16** (4), p. 492–493.
- Thorpe TA. (1980). Organogenesis *in vitro*: structural physiological and biochemical aspects. In Vasil IK. (ed) *International review of cytology*. Suppl. II, p. 71–111.
- Walali Loudiyi DM. (1989). *Chemical and physical factors influencing in vitro propagation of Moroccan Picholine olive*, (*Olea europaea* L.). Thesis Doctorat Es-Sciences Agronomique. IAV Hassan II, Rabat, 207p.
- Walali Loudiyi DM. (1993). *La multiplication in vitro des espèces ligneuses : état actuel et perspectives de développement. Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l’inventaire des gènes ?* AUPELF-UREF. Paris : John Libbey Eurotext.
- Walali Loudiyi DM., Brhadda N., Abousalim A. (1999). *Ressources génétiques. Actes du séminaire international sur les innovations scientifiques et leur application en oleiculture et oleotechnie, 10, 12 Mars (1999)*. Florence, Italie : Conseil oléicole international.
- White PR. (1963). *A handbook of plant and animal tissue culture*. London : Jaques Cattel Press, 239 p.
- Zryd JP. (1988). *Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques*. Lausanne, Suisse : Presses Polytechnique Romandes, 305 p.

(42 réf.)