

Effets du milieu de culture et de la lumière sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine marocaine

Najiba Brhadda^{a*}, Abdelhadi Abousalim^b, Loudyi Dou Elmacane Walali^b

^a Université Ibn Tofail,
Faculté des Sciences,
Département de Biologie,
Laboratoire de Physiologie
végétale, Kenitra,
Maroc
brhadda.najiba@caramail.com

^b Institut Agronomique
et Vétérinaire Hassan II,
Département d'Horticulture,
BP 6654, Instituts, Rabat,
Maroc
a.abousalim@iav.ac.ma

Effects of culture medium and light on somatic embryogenesis of olive tree (*Olea europaea* L.) cv. Picholine marocaine.

Abstract — Introduction. Until now, no protocol has been developed for the somatic embryogenesis of the Picholine olive tree, a cultivar exploited in nearly 98% of the olive tree orchards in Morocco. Thus, our work aimed to study the effects of the culture medium composition and the light on the induction and the development of somatic embryos of this variety. **Materials and methods.** After disinfection of Picholine olive tree stones, cotyledons were cultured after removal of the zygotic embryos. They were put in petri dishes either totally, or by distinguishing the proximal and distal parts. For the phase of the embryogenic callus induction, four basic culture mediums [Murashige and Skoog (MS), Bourgin and Nitsch (BN), Schenk and Hildebrandt (HS) and Canas and Benbadis (OMc)], with added growth regulators (zeatin and NAA), were tested either in the darkness, or in a 16 h photoperiod. After 6 weeks of culture on these induction media, the calli were transferred into tubes, in fresh culture media but without NAA, and were subjected to a 16 h photoperiod. At the end of this phase, the seedlings with well-developed roots and at least two leaves were transplanted into pots containing a substrate and were acclimatized in a greenhouse. **Results.** The best results of induction and development of the somatic embryos were obtained with the MS medium and no morphogenesis was observed on the OMc medium. Incubation under light conditions significantly reduced the embryogenic callus induction and inhibited the plantlet regeneration. The cotyledon proximal parts showed better results than the distal parts. The plantlet regeneration rate reached 40% of the explants cultured and the survival percentage obtained after their acclimatization reached 94%. **Conclusion.** The protocol described showed the embryogenic capacity of the cv. Picholine marocaine. It could be exploited for the propagation of this olive tree in Morocco.

Morocco / *Olea europaea* / plant propagation / in vitro culture / culture media / somatic embryogenesis / in vitro regeneration

Effets du milieu de culture et de la lumière sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine marocaine.

Résumé — Introduction. Jusqu'à présent, aucun protocole n'a été développé pour l'embryogenèse somatique de l'olivier Picholine, cultivar exploité dans près de 98 % des plantations d'oliviers au Maroc. Nos travaux ont donc cherché à étudier les effets de la composition du milieu de culture et de la lumière sur l'induction et le développement d'embryons somatiques chez ce cultivar. **Matériel et méthodes.** Après désinfection des noyaux d'olives Picholine, des cotylédons ont été mis en culture après suppression des embryons zygotiques. Ils ont été disposés en boîtes de Pétri soit entiers, soit en distinguant les parties proximales et distales. Pour la phase d'induction de calcs embryogènes, quatre milieux de base [Murashige et Skoog (MS), Bourgin et Nitsch (BN), Schenk et Hildebrandt (SH) et Canas et Benbadis (OMc)], additionnés de régulateurs de croissance (zéatine et ANA), ont été testés soit à l'obscurité, soit en photopériode de 16 h. Après 6 semaines de culture sur ces milieux d'induction, les calcs ont été transférés en tubes, dans des milieux de culture frais mais sans ANA et soumis à une photopériode de 16 h. À l'issue de cette phase, les plantules présentant des racines bien développées et au moins deux feuilles ont été repiquées dans des pots contenant un substrat et acclimatées en serre. **Résultats.** Les meilleurs résultats d'induction et de développement des embryons somatiques ont été obtenus avec le milieu MS et aucune morphogenèse n'a été observée sur le milieu OMc. L'incubation à la lumière a significativement réduit l'induction des calcs embryogènes et a inhibé la régénération des plantules. Les parties proximales des cotylédons ont donné de meilleurs résultats que les parties distales. Le taux de régénération de plantules a atteint 40 % des explants mis en culture et le pourcentage de survie obtenu après leur acclimatation a atteint 94 %. **Conclusion.** Le protocole décrit a démontré la capacité embryogène du cultivar Picholine marocaine. Il pourra être exploité pour la propagation de cet olivier au Maroc.

* Correspondance et tirés à part

Reçu le 18 avril 2002
Accepté le 4 novembre 2002

Fruits, 2003, vol. 58, p. 167–174
© 2003 Cirad/EDP Sciences
All rights reserved
DOI: 10.1051/fruits:2003005

RESUMEN ESPAÑOL, p. 174

Maroc / *Olea europaea* / multiplication des plantes / culture in vitro / milieu de culture / embryogenèse somatique / régénération in vitro

1. Introduction

L'olivier (*Olea europaea*) est une espèce fruitière cultivée essentiellement en zone méditerranéenne ; ses produits sont très appréciés pour leur haute valeur nutritionnelle et médicinale. L'espèce est traditionnellement multipliée par bouturage et par greffage et son amélioration génétique est difficile du fait de la longue phase juvénile de la plante et de son auto-incompatibilité [1].

Bien que les techniques de culture *in vitro* offrent des perspectives très prometteuses pour une production en masse, ainsi que l'assainissement et l'amélioration génétique de la plante, de telles études ont été très limitées sur l'olivier. Même si certains résultats intéressants ont été obtenus sur le microbouturage et l'embryogenèse somatique, l'efficacité de ces techniques n'est pas encore optimale [2].

Comparativement au microbouturage, l'embryogenèse somatique est une voie très intéressante pour la propagation des plantes et pour la diffusion accélérée du matériel sélectionné. Elle peut aussi être exploitée pour la régénération de plantes transgéniques. Les quelques travaux achevés sur l'embryogenèse somatique de l'olivier n'ont abouti à la régénération de plantes que chez certains cultivars comme Dolce agogia, Leccino, Frantoio et Moraiolo [3], Canino [4, 5] et Moraiolo [4], et chez l'olivier sauvage var. *sylvestris* [6].

Jusqu'à présent, aucun protocole n'a été développé pour le cultivar Picholine dont les olives sont utilisées aussi bien pour la table que pour la production d'huile. Ce cultivar est celui qui est exploité dans près de 98 % des plantations d'oliviers au Maroc. Chez cet arbre, les facteurs contrôlant la germination *in vitro* des embryons zygotiques ont été étudiés [7], et une organogenèse indirecte a pu être induite à partir de fragments de cotylédons [8].

L'analyse des travaux réalisés avec différents génotypes d'olivier a montré que la réussite de l'embryogenèse somatique dépendait de plusieurs facteurs dont la composition minérale et hormonale des milieux de culture [1, 9], le génotype [10] et le type d'explant utilisé [11]. De plus, la

lumière affecterait également l'embryogenèse somatique de plusieurs espèces fruitières, dont l'amandier [12]. En conséquence, nos travaux ont cherché à étudier les effets de la composition du milieu de culture et de la lumière sur l'induction et le développement d'embryons somatiques chez l'olivier Picholine au Maroc.

2. Matériel et méthodes

2.1. Source d'explants et désinfection

Des noyaux d'olives récoltés sur des oliviers Picholine ont été désinfectés pendant 2 min avec de l'éthanol à 70 % avant d'être immergés durant 15 min dans une solution d'hypochlorite de sodium diluée de moitié et additionnée de quelques gouttes de Tween 20. Ces noyaux ont ensuite été rincés trois fois à l'eau distillée stérile, puis disposés sur du papier filtre stérile placé en boîtes de Pétri. Celles-ci ont été mises 24 h à l'obscurité, à une température de (25 ± 2) °C. Les cotylédons entiers ont alors été mis en culture après suppression des embryons zygotiques. Dans un second essai, les parties proximales et distales des cotylédons ont été distinguées et mises en culture séparément.

2.2. Milieux de culture

Quatre milieux de culture ont été utilisés pour l'induction des cals, ceux de Murashige et Skoog [13], Bourgin et Nitsch [14], Schenk et Hildebrandt [15] et Canas et Benbadis [16].

Ces milieux, contenant $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de saccharose et solidifiés par $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ d'agar (bactériologique, Difco), ont été enrichis par $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de zéatine et $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ d'acide naftalène acétique (ANA) ; les cultures témoins n'ont comporté aucun régulateur de croissance. L'autoclavage a été de 20 min à 121 °C, après ajustement du pH à 5,8.

Pour l'induction des cals, les milieux de culture ont été répartis dans des boîtes de Pétri contenant 20 mL de milieu par boîte

et, au stade régénération, les explants ont été transférés dans des tubes à essai contenant 15 mL de milieu de culture. L'expérimentation a porté sur 20 explants par traitement (quatre milieux de culture avec régulateur de croissance et un milieu témoin) et chacun d'eux a été répété cinq fois. Ainsi, il y a eu 100 explants mis en culture pour chaque traitement.

2.3. Subcultures

Afin de favoriser le développement des embryons somatiques et par la suite leur régénération en plantules, après 6 semaines de culture sur le milieu d'induction, les cals ont été transférés dans des milieux de culture frais mais ne contenant, en plus des constituants de base, que de la zéatine à $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

À l'issue de cette phase d'environ 3 mois, les plantules présentant des racines bien développées et au moins deux feuilles ont été repiquées dans des pots contenant un substrat préalablement autoclavé pendant 60 min et composé de deux volumes de tourbe, pour un volume de sable et deux volumes de vermiculite. L'acclimatation a eu lieu en serre vitrée dans des conditions d'environnement contrôlées.

2.4. Conditions de culture

L'incubation en phase d'induction de cals a eu lieu à l'obscurité ou à la lumière (3000 Lux, 16 h de photopériode). La phase de développement et de régénération des plantules a eu lieu à la lumière sous une photopériode de 16 h. La température a été maintenue à $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$.

2.5. Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été soumis à une analyse de variance à deux critères de classification. Les pourcentages zéro ont subi la transformation $[1/4 n]$, n étant le nombre d'explants mis en culture. Tous les pourcentages (t) ont subi la transformation $[\arcsin \sqrt{t}]$. Les moyennes des facteurs étudiés ont été analysées par le test de Newman et Keuls [17].

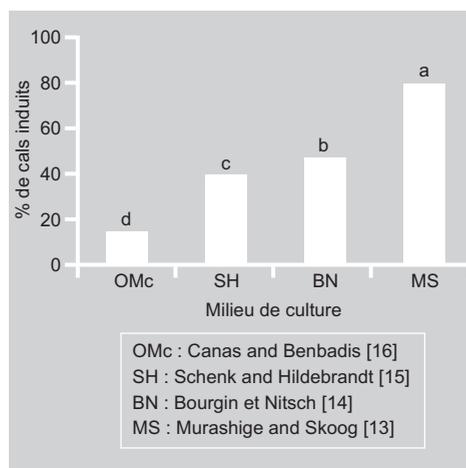


Figure 1.

Effet de différents milieux de culture sur l'induction de cals embryogènes chez l'olivier cv. Picholine marocaine après 6 semaines de culture en conditions contrôlées. a, b, c, d : résultats significativement différents selon la méthode de Newman et Keuls au seuil de 5 %.

3. Résultats

3.1. Induction des cals

3.1.1. Effet du milieu de culture

La composition du milieu de culture a significativement ($p \leq 0,001$) affecté l'induction des cals. Le meilleur résultat a été obtenu avec le milieu Murashige et Skoog (MS) sur lequel 79 % des cals mis en culture ont été induits ; des pourcentages d'induction intermédiaires ont été obtenus avec les milieux Bourgin et Nitsch (BN, 46,6 %) et Schenk et Hildebrandt (SH, 39,5 %) ; les plus faibles résultats ont été obtenus avec le milieu Canas et Benbadis (OMc, 14 %) (figure 1).

Les cals développés sur les milieux MS, BN et SH ont été compacts et de couleur blanchâtre à l'obscurité et verdâtre lorsque cultivés à la lumière. À noter que 70 % des cals induits dans le milieu BN ont été friables.

Les cals obtenus sur le milieu OMc ont été de petite taille et se sont principalement localisés au niveau des marges incisées des explants ; ils ont été friables et leur coloration a été hétérogène.

3.1.2. Effet de la lumière

Après 6 semaines de culture, l'incubation des explants à l'obscurité a permis d'obtenir 50,5 % de cals embryogènes alors que, en conditions lumineuses, ce taux n'a été que de 39,1 %. La lumière a donc

Figure 2. Comparaison des effets de la lumière et du milieu de culture sur l'induction de cals embryogènes d'oliviers cv. Picholine marocaine après 6 semaines de culture en conditions contrôlées. a, b, c, d : résultats significativement différents selon la méthode de Newman et Keuls au seuil de 5 %.

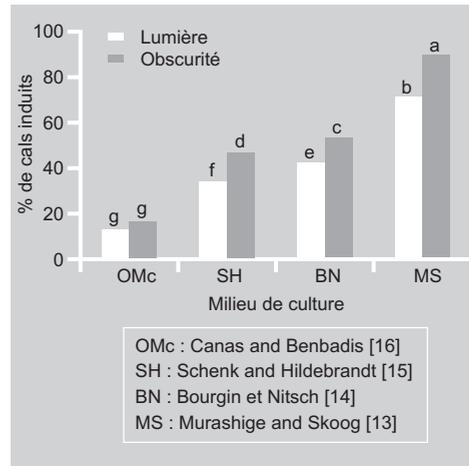
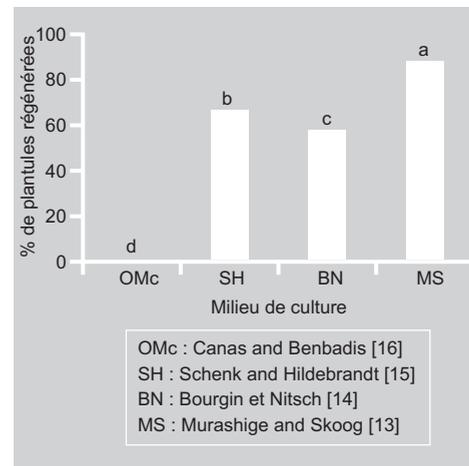


Figure 3. Effet de différents milieux de culture sur la régénération de plantules d'olivier cv. Picholine marocaine à partir de cotylédons entiers après 3 mois de culture en conditions contrôlées. a, b, c, d : résultats significativement différents selon la méthode de Newman et Keuls au seuil de 5 %.



significativement ($p \leq 0,05$) freiné l'induction des cals.

Les cals formés à l'obscurité ont été globulaires, compacts et de couleur blanche. Le début de la callogenèse a été observé au niveau des parties excisées. Les cals développés à partir des explants cultivés à la lumière se sont formés à partir de la couche superficielle des cellules ; certains ont été friables (10 %) et les autres globulaires, compacts et de couleur verte, brune ou crème.

3.1.3. Interaction entre le milieu de culture et la lumière

L'interaction du milieu de culture et de la lumière a été significative ($p \leq 0,001$). Les

meilleurs résultats ont été obtenus dans le cas des explants mis en culture à l'obscurité dans le milieu MS, qui ont donné lieu à 88 % de cals embryogènes (figure 2). Pour les autres milieux, les taux d'induction obtenus à l'obscurité ont également été les meilleurs.

3.2. Développement des embryons somatiques et régénération des plantules

Les embryons somatiques obtenus sur le milieu de développement ont été de coloration blanche et se sont développés seuls ou en groupes. Certains d'entre eux se sont détachés facilement alors que d'autres sont restés liés au cal. À noter que de nouveaux pro-embryons au stade globulaire de couleur blanche se sont développés après 7 et 8 semaines de culture, mais ce processus s'est arrêté après cette période de culture. Cependant, certains de ces embryoides ont montré un développement aux deux pôles (apical et racinaire) et ont continué leur développement.

Sans ajout de régulateurs de croissance dans le milieu utilisé pour l'induction des cals, il n'y a pas eu régénération de plantules, de même dans le cas où l'achèvement de l'induction était effectué à la lumière. La régénération a eu lieu sur tous les milieux, sauf sur le milieu de Canas et Benbadis, les différences observées étant significatives ($p \leq 0,001$). Le meilleur taux de régénération de plantules a eu lieu sur le milieu Murashige et Skools (37 %) (figure 3).

La régénération des plantules a été significativement plus importante quand l'explant mis en culture provenait de la partie proximale du cotylédon, comparative-ment aux tissus prélevés dans la partie distale. Le taux de plantules régénérées le plus élevé (40 %) a été observé pour les explants transférés sur le milieu MS (figure 4).

3.3. Transfert en sol des plantules régénérées

Après transfert des plantules régénérées dans des substrats en pots placés en

conditions environnementales contrôlées, 94 % des plantules développées sur le milieu BN, 90 % de celles issues du milieu SH et 84 % de celles obtenues sur milieu MS ont pu continuer à se développer sous serre ; ces différences de taux ont été significatives ($p \leq 0,001$) et les plantules obtenues ont été morphologiquement comparables à celles issues de micropropagation à partir de bourgeons axillaires ; elles n'ont présenté aucune anomalie phénotypique apparente.

4. Discussion et conclusion

Des embryons somatiques et des plantules entières ont donc été régénérés à partir de fragments de cotylédons prélevés sur des noyaux d'oliviers Picholine, cultivar prédominant au Maroc.

Chez l'olivier, l'embryogenèse somatique a été obtenue à partir de différents types d'explants notamment d'embryons zygotiques immatures [3], de fragments de cotylédons [6] et de fragments de pétioles issus de vitroplants [4, 5, 18].

Dans le cas du cultivar Picholine, le milieu Murashige et Skoog (MS) s'est nettement distingué des autres milieux testés : Bourgin et Nitsch (BN), Schenk et Hildebrandt (SH) et Canas et Benbadis (OMc). Dans le cas d'autres cultivars d'olivier comme Dolce agogia, Frantoio et Moraio, le milieu MS dilué de moitié a été plus bénéfique que le milieu OMc dilué de moitié [3]. Le milieu MS a été bénéfique à l'embryogenèse somatique pour la plupart des auteurs [19, 20], alors que d'autres ont préféré utiliser le milieu OMc [4, 6, 21] ou SH [22]. Il existerait donc des différences nutritionnelles d'un génotype d'olivier à l'autre. De récents travaux sur la micropropagation du cultivar d'olivier 'Chondrolia Chalkidikis' en Grèce ont montré que le milieu *woody plant medium* (WPM) [23] permettait une meilleure prolifération des pousses que le milieu OMc [24].

En s'appuyant sur les résultats de Rugini [3], le fait que le milieu MS ait permis la meilleure induction de cals embryogènes et de régénération de plantules pourrait être

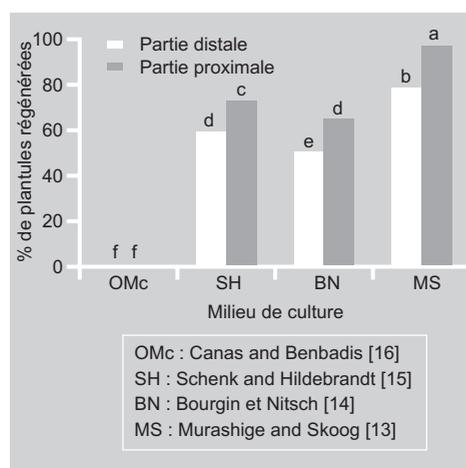


Figure 4. Effet de différents milieux de culture sur la régénération de plantules d'olivier cv. Picholine marocaine, issues des parties proximales et distales des cotylédons. Les pourcentages suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents selon la méthode de Newman et Keuls au seuil de 5 %.

attribué à sa richesse en azote : $60,01 \text{ mEq} \cdot \text{L}^{-1}$ d'azote total, alors que les milieux BN, SH et OMc n'en contiennent que $27,3 \text{ mEq} \cdot \text{L}^{-1}$. L'effet stimulateur de l'azote dans le processus d'embryogenèse somatique a d'ailleurs été confirmé chez d'autres espèces tels que le maïs [25] et le blé [26]. Les auteurs alors concernés ont rapporté que cet effet stimulateur de l'azote serait dû plus spécialement aux nitrates.

Caboche [27] 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 de *Nicotiana plumbaginifolia* et a signalé que les nitrates assureraient d'autres fonctions encore inconnues dans la morphogenèse.

Le milieu MS contient aussi les teneurs en Ca^{++} les plus élevées ($5,98 \text{ mEq} \cdot \text{L}^{-1}$) alors que les milieux OMc et BN contiennent les taux les plus élevés en bore : ($200,5$ et $161,7$) $\text{mEq} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivement.

L'existence d'un gradient de potentiel de régénération mis en évidence selon que l'explant provient de la partie proximale ou distale du cotylédon du noyau d'olive avait déjà été signalée chez les cultivars Tanche et Picual [16] et chez l'olivier sauvage *sylvestris* [6]. À noter que certains cals ont donné des embryons somatiques et d'autres n'ont permis que la formation de racines et, comme le précisent Mitrakos *et al.* [21] chez l'olivier et Paul *et al.* [28] chez *Golden delicious*, c'est l'auxine qui

serait responsable de la stimulation des racines.

Les meilleurs résultats d'induction de calcs embryogènes et de régénération de plantules ont été obtenus lorsque les explants avaient subi une phase d'induction à l'obscurité. À l'inverse, la lumière, à cette étape de la régénération, a réduit de façon notable l'induction des calcs et inhibé par la suite l'embryogenèse somatique. Ce résultat est conforme à ceux obtenus chez d'autres cultivars d'olivier [4, 22] et chez d'autres espèces telles que la vigne [29], le pêcher et le nectarinier [30]. Cependant, des résultats inverses ont été rapportés chez d'autres espèces, notamment pour le chêne [31] et même pour l'olivier sauvage [6] qui a permis d'obtenir de l'embryogenèse somatique à partir d'embryons zygotiques mûrs mis en culture sous des conditions de lumière. Des travaux réalisés sur *Picea abies* ont montré que c'est la qualité de la lumière qui affecterait la croissance des tissus embryogènes et que cet effet serait très fortement dépendant du génotype [32].

Les calcs produits en obscurité ont été noduleux et embryogènes. Après transfert à la lumière, ils sont devenus verts ; à leur surface, d'autres embryons somatiques de couleur blanchâtre ont continué à se former sur le milieu de développement pendant 1 à 2 semaines, puis le processus s'est arrêté sans manifester d'autres réactions morphogénétiques. Les derniers embryons formés après exposition à la lumière pourraient avoir été induits à l'obscurité puisque la lumière a inhibé la formation des embryons somatiques à partir des calcs qui y avaient été transférés après induction à la lumière. Cette hypothèse a aussi été formulée par Rugini [33] après expérimentation sur le cultivar d'olivier Canino.

Le fait que certains embryons somatiques formés aient développé à leur surface d'autres embryons somatiques pourrait être dû à un effet stimulateur imputable aux premiers embryons développés. Cette hypothèse s'accorde avec celle formulée sur *Coffea arabica* par Sondahl et Sharp [34], Sondahl *et al.* [35] et Staritsky [36].

Le protocole adopté pour l'embryogenèse somatique du cultivar d'olivier Picholine au Maroc a permis une régénération de 40 % de plantules parmi les explants mis en culture et 94 % d'entre elles ont pu être établis en terre. L'acclimatation des plantules régénérées a varié selon le milieu de culture utilisé *in vitro*. La croissance en terre des plants issus d'embryons somatiques pourrait dépendre des effets cumulatifs des traitements subis durant la culture *in vitro* [37]. Dans le cas de l'olivier, il a été rapporté que le niveau de différenciation des tissus des pousses *in vitro* serait fonction du milieu de culture utilisé et pourrait être lié au taux de survie des plantules lors de la phase d'acclimatation [38]. Les plantules acclimatées ont montré un développement normal. Le protocole décrit montre qu'il est possible de maintenir chez l'olivier une capacité embryogène à long terme. Cela peut être particulièrement avantageux pour la propagation de l'espèce et certaines applications biotechnologiques.

Références

- [1] Revilla M.A., Pacheco J., Casares A., Rodriguez R., *In vitro* reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea* L.) through micrografting, *In vitro Cell. Dev.-P.* 32 (1996) 257–261.
- [2] Cimato A., Propagation et certification des plants. L'élevage des plants d'olivier en pépinière, in: Actes du séminaire international sur les innovations scientifiques et leur application en oléiculture et oléotechnie, Cons. Oléic. Int. Florence, Florence, Italie, 1999, pp. 1–30.
- [3] Rugini E., Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.), *Plant Cell Tiss. Org.* 14 (1988) 207–214.
- [4] Rugini E., Caricato G., Somatic embryogenesis and recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) 'Canino' and 'Maraiolo', *Plant Cell Rep.* 14 (1995) 257–260.
- [5] Lambardi M., Capuana M., Sozzi L., Giannini R., Factors affecting *in vitro* adventitious bud induction from excised embryos of swiss stone pine (*Pinus ombra* L.), *For. Genet.* 2 (1995) 49–58.

- [6] Orinos T., Mitrakos K., Rhizogenesis and somatic embryogenesis in calli from wild olive (*Olea europaea* L.) var. *sylvestris* (Miller) mature zygotic embryos, *Plant Cell Tiss. Org.* 27 (1991) 183–187.
- [7] Brhadda N., Walali L.D.M., Abousalim A., Benali D., 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 (2000) 643–653.
- [8] Brhadda N., Walali L.D.M., Abousalim A., Rhizogenèse et régénération *in vitro* de plantules d'olivier (*Olea europaea* L.) variété Picholine marocaine, *Olivae* (sous presse).
- [9] Mencuccini M., Luchetti M., Coltura di protoplasti isolati da differenti tessuti di cultivar di olivo (*Olea europaea* L.), *Giornate Scientifiche, Ital. Hortic. Soc., Ravello (SA), Italia*, 1992.
- [10] Leva A.R., Muleo R., Petrucelli R., Long-term somatic embryogenesis from immature olive cotyledons, *J. Hortic. Sci.* 70 (3) (1995) 417–421.
- [11] Mencuccini M., Rugini E., *In vitro* shoot regeneration from olive cultivar tissues, *Plant Cell Tiss. Org.* 32 (1993) 283–288.
- [12] Antonelli M., Regeneration from almond cotyledons: induction of proembryonal masses, *Acta Hortic.* 300 (1991) 255–259.
- [13] Murashige T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture, *Physiol. Plantarum* 15 (1962) 473–492.
- [14] Bourgin J.-P., Nitsch C., Obtention de *Nicotiana* haploïdes à partir d'étamines cultivées *in vitro*, *Ann. Physiol. Vég.* 9 (1967) 377–383.
- [15] Schenk R.V., Hildebrandt A.C., Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Can. J. Botany* 50 (1972) 199–204.
- [16] Canas L.A., Benbadis A., Plant regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (*Olea europaea* L.), *Plant Sci.* 54 (1988) 65–74.
- [17] Dagnelie P., Théorie et méthodes statistiques, application agronomique, Presses Agron., Gembloux, Belgique, 1980, vol. 2., 463 p.
- [18] Lambardi M., Caccovale A., Rugini E., Caricato G., Histological observation on somatic embryos of olive (*Olea europaea* L.), *Acta Hortic.* 474 (1999) 67–69.
- [19] Rugini E., Olive ((*Olea europaea* L.), in: Bajaj Y.P.S. (Ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 5, Tress I, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1986, 253–267.
- [20] Mencuccini M., Corona C., Mariotti D., Plant regeneration and first attempt of *in vitro* genetic improvement of olive (cv. Moraïolo), *Acta Hortic.* 300 (1992) 1–4.
- [21] Mitrakos K., Alescaki A., Papa Dimitriou A., Dependence of olive morphogenesis on callus origin and age, *J. Plant Physiol.* 139 (1992) 269–273.
- [22] Leva A.R., Petrucelli R., Benelli A., Plant regeneration and somatic embryogenesis in *Olea europaea* L., in: Alberghina L. (Ed.), *Proc. 6th Eur. Congr. Biotechnol.*, Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, the Netherlands, 1994, p. 364.
- [23] Lloyd D.G., McCown B.H., Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture, *Plant Prop. Soc. Proc.* 30 (1981) 421–427.
- [24] Grigoriadou K., Vasilakakis M., Eleftheriou E.P., *In vitro* propagation of the Greek olive cultivar Chondrolia Chalkidikis, *Plant Cell Tiss. Org.* 71 (1) (2002) 47–54.
- [25] Miao S.H., Effects on NH_4^+ on embryoid generation from pollens of maize, *Acta Bot. Sin.* 22 (4) (1980) 356–359.
- [26] Feng G.H., Ouyang J., The effects of KNO_3 concentration in callus induction medium for wheat anther culture, *Plant Cell Tiss. Org.* 12 (1988) 3–12.
- [27] Caboche M., Nitrogen carbohydrate and zinc requirements for the efficient induction of shoot morphogenesis from protoplast-derived colonies of *Nicotiana plumbaginifolia*, *Plant Cell Tiss. Org.* 8 (1987) 197–206.
- [28] Paul H., Belaizi M., Sangwan N.B.S., Somatic embryogenesis in apple, *J. Plant. Physiol.* 143 (1994) 78–86.
- [29] Mozsár J., Viczián O., Genotype effect on somatic embryogenesis and plant regeneration of *Vitis* spp., *Vitis* 35 (4) (1996) 155–157.
- [30] Bhansali R.R., Driver J.A., Durzon D.J., Rapid multiplication of adventitious somatic embryos in peach and nectarine by secondary embryogenesis, *Plant Cell Rep.* 9 (5) (1990) 280–284.

- [31] Rancillac M., Klinguer A., Klinguer S., Millet B., Preliminary investigation on somatic embryogenesis from leaf discs of red oak (*Quercus ruba* L.), *Plant Growth Regul.* 20 (1) (1996) 67–73.
- [32] Latkowska M.J., Kvaalen H.K., Appelgren M., Genotype dependent blue and red light inhibition of the proliferation of the embryogenic tissue of Norway spruce, *In vitro Cell. Dev.-P.* 36 (1) (2000) 57–60.
- [33] Rugini E., Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.), in: Jain S., Gupta P., Newton R. (Eds.), *Somatic embryogenesis in Woody plants*, vol. 2, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, the Netherlands, 1995, pp. 71–189.
- [34] Sondahl M.R., Sharp W.R., High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L., *Z. Pflanzenphysiol.* 81 (1977) 395–408.
- [35] Sondahl M.R., Evons D.A., Sharp W.R., Coffee cell culture. Growth and somatic embryogenesis, *Newsl. Int. Ass. Plant Tiss. Cult.* 30 (1980) 2–7.
- [36] Staritsky G., Embryoid formation in callus tissues of coffee, *Acta Bot. Neerl.* 19 (4) (1970) 509–514.
- [37] Arnold S.V., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J., Filonova L., Developmental pathways of somatic embryogenesis, *Plant Cell Tiss. Org.* 69 (3) (2002) 233–249.
- [38] Cozza R., Turco D., Batis C.B., Bitonti M.B., Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*, *Plant Cell Tiss. Org.* 51 (3) (1997) 215–223.

Efectos del medio de cultivo y de la luz en la embriogénesis somática del olivo (*Olea europaea* L.) cv. 'Picholine marocaine'.

Resumen — Introducción. Hasta ahora, no se había desarrollado ningún protocolo para la embriogénesis somática del olivo Picholine, cultivar explotado en cerca del 98% de las plantaciones de olivo en Marruecos. Nuestro trabajo tenía como objetivo el estudio de los efectos de la composición del medio de cultivo y de la luz en la inducción y desarrollo de embriones somáticos en este cultivar. **Material y métodos.** Tras desinfección de los huesos de Picholine, se pusieron en cultivo los cotiledones después de suprimir los embriones cigóticos. Se colocaron en placas de Petri enteros o diferenciando las partes proximales y distales. Para la fase de inducción de los callos embriogénicos, cuatro medios básicos [Murashige y Skoog (MS), Bourgin y Nitsch (BN), Schenk y Hildebrandt (SH) y Canas y Benbadis (OMc)], adicionados con reguladores de crecimiento (zeatina y ANA), fueron probados en oscuridad o en fotoperíodo de 16 h. Tras seis semanas de cultivo en estos medios de inducción, se pusieron los callos en tubos, con medio de cultivo fresco, pero sin ANA y expuestos a un fotoperíodo de 16 h. Al término de esta fase, las plántulas con raíces desarrolladas y, al menos, dos hojas fueron trasplantadas en macetas que contenían un sustrato y aclimatadas en invernadero. **Resultados.** Los mejores resultados de inducción y desarrollo de embriones somáticos fueron obtenidos con el medio MS y no se observó ninguna morfogénesis en el medio OMc. La incubación a la luz disminuyó significativamente la inducción de callos embriogénicos e inhibió la regeneración de las plántulas. Las partes proximales de los cotiledones proporcionaron mejores resultados que las partes distales. La tasa de regeneración de las plántulas fue del 40% de los explantes puestos en cultivo y el porcentaje de supervivencia obtenido tras aclimatación alcanzó el 94%. **Conclusión.** El protocolo descrito demostró la capacidad embriogénica del cultivar Picholine y podrá aplicarse para la propagación de este olivo en Marruecos.

Marruecos / *Olea europaea* / propagación de plantas / cultivo in vitro / medio de cultivo / embriogénesis somática / regeneración in vitro

