

# Mise Au Point Des Techniques De Micropropagation Pour Une Multiplication Massive De *Gladiolus Segetum* Et *Gladiolus Dubius*

**Emna El Chaieb**

Institut Supérieur Agronomique. Chott Mariem, Sousse, Tunisie

**Faouzi Haouala**

Institut National Agronomique de Tunisie, Tunis Belvédère, Tunisie

doi: 10.19044/esj.2016.v12n6p207 [URL:http://dx.doi.org/10.19044/esj.2016.v12n6p207](http://dx.doi.org/10.19044/esj.2016.v12n6p207)

---

## Abstract

Apical buds of corms of gladiolus (*Gladiolus segetum* and *Gladiolus dubius*) were cultivated on Murashige and Skoog (1962) medium supplemented with IBA 0.1 mg.l<sup>-1</sup> and BA 2 mg.l<sup>-1</sup>. The number of newly formed buds was 3,8 and 4,13 buds per explants for respectively *Gladiolus segetum* and *Gladiolus dubius*. The *in vitro* Rooting need a supplement with auxin and sucrose. Rooting is not present in the control medium. The rate of rooting varied from 10 to 36%, depending on the species and the concentration of IBA in the medium. The Important rooting (36%) is observed for *Gladiolus segetum* in the presence of IBA 1 mg.l<sup>-1</sup>. Finally, the acclimatization is possible, these shoots rooted have formed many corms after 6 weeks of culture.

---

**Keywords:** *Gladiolus segetum*, *Gladiolus dubius*, *in vitro*, multiplication, rooting.

---

## Résumé

Les essais de multiplication *in vitro* ont montré que l'initiation de la culture est possible sur le milieu de Murashige et Skoog (1962) additionné d'AIB 0,1 mg.l<sup>-1</sup> et BA 2 mg.l<sup>-1</sup>. La meilleure réponse est obtenue par les explants prélevés des bourgeons apicaux des bulbes. Ce milieu riche en BA, a permis d'avoir 3,83 et 4,1 bourgeons néoformés pour les explants prélevés des bourgeons apicaux. L'enracinement *in vitro* nécessite un milieu de culture MS additionné d'une auxine et de saccharose. L'enracinement est nul sur un milieu dépourvu d'hormone. Le taux d'enracinement de ces pousses atteint 36% en présence d'AIB 1 mg.l<sup>-1</sup> chez *Gladiolus segetum*. Enfin, l'acclimatation est possible, Les pousses enracinées ont formé toutes des cormes après 6 semaines de culture.

---

**Mots-clés.** *Gladiolus segetum*, *Gladiolus dubius*, *in vitro*, multiplication, enracinement.

## **Introduction**

La flore tunisienne dispose de deux espèces sauvages de glaïeuls : *Gladiolus italicus* Mill. (*G. segetum* Ker-Gawl) et *Gladiolus dubius* qui couvrent certains domaines au milieu des champs et des prairies (Le Floc'h *et al.*, 2010). Depuis 1970, la multiplication *in vitro* du glaïeul a été étudiée par plusieurs chercheurs (Hussey, 1977 ; Ziv, 1979 ; Steinitz *et al.*, 1991 ; Bajaj *et al.*, 1992 ; Bettaieb, 2003...).

La multiplication *in vitro* du *Gladiolus* a été réalisée à partir de bourgeons axillaires (Begum et Haddiuzaman, 1995 ; Boonvanno et Kanchanapoom, 2000, Salhi, 2007), d'apex (Hussain *et al.*, 2001), de cormes (Nagaraju et Parthasarathy, 1995) et d'inflorescences (Ziv et Lilien-Kipnis, 2000). La multiplication *in vitro* est basée sur le développement de bourgeons axillaires préexistants après leur mise en culture sur un milieu contenant une cytokinine qui lève la dormance apicale et empêche la bulbification (Begum et Hadiuzzaman 1995 ; Grewal *et al.*, 1995 ; Sen et Sen, 1995 ; Churvikova et Barykina, 1995).

Le déclenchement ou la stimulation du bourgeonnement axillaire en culture *in vitro* résulte de l'emploi de cytokinines, éventuellement associées aux auxines (Margara, 1984). La néoformation de bourgeons exige un rapport cytokinines/auxines élevé.

Tan Nhut *et al.* (2004) ont obtenu des bourgeonnements axillaires chez le glaïeul en utilisant la Benzyladénine (BA) à une gamme de concentrations comprises entre 2,2 et 4,5  $\mu\text{M}$ . Dans une autre étude et après des essais de plusieurs combinaisons hormonales BA/AIB, le meilleur bourgeonnement a été obtenu avec un rapport BA/AIB égal à 4 (Bettaieb, 2003).

Pour l'enracinement et la bulbaison, l'utilisation d'une balance hormonale riche en auxine est souvent nécessaire. Le comportement d'un explant mis en milieu contenant un rapport auxine/cytokinine élevé évolue vers la rhizogenèse.

L'enracinement et la bulbaison *in vitro* sont obtenus après un séjour dans un premier milieu gélosé composé du milieu de Murashige et Skoog (MS) additionné d'AIB 0,5  $\text{mg.l}^{-1}$  et 30 jours plus tard, dans le même milieu mais sans agar et riche en saccharose 6% (Bettaieb, 2003). La micropropagation du glaïeul est possible à partir de bourgeons apicaux prélevés à partir de cormes (Haouala et Emna, 2012 ; Ascough, 2011 ; Goo *et al.*, 2003; Priyakumari & Sheela, 2005; Prasad & Gupta, 2006; Roy *et al.*, 2006; Aftab *et al.*, 2008). L'initiation et la multiplication *in vitro* de cette

plante sont réalisées sur un milieu de base MS additionné de BA 2 mg.l<sup>-1</sup> et AIB 0,5 mg.l<sup>-1</sup>.

Dans ce chapitre, on s'est intéressé à la micropropagation de ces deux espèces. Pour cela, différents milieux de culture ont été testés afin d'avoir le meilleur taux de régénération. Le but de ce travail est la multiplication massive de ces deux espèces tout en préservant leurs caractéristiques génétiques en vue d'une éventuelle conservation.

## **Matériel et méthodes**

### **Matériel végétal**

Le matériel végétal utilisé est constitué de bourgeons apicaux prélevés sur les cornes adultes de deux espèces de glaïeul spontanées en Tunisie : *Gladiolus segetum* et *Gladiolus dubius*. Les cornes ont été récoltées au mois de juin 2012 à l'Institut supérieur agronomique de Chott Meriem, puis conservées au laboratoire des Sciences horticoles à la température ambiante. Une identification des espèces a été faite d'après les caractères morphologiques.

### **Désinfection du matériel végétal**

Les bulbes sont nettoyés soigneusement par l'élimination des feuilles sèches, puis bien rincés à l'eau courante. Sous une hotte à flux laminaire, les bulbes sont trempés d'abord dans l'alcool à 70° pendant quelques secondes puis dans une solution d'hypochlorite de sodium à 10% pendant 10 min et finalement dans une solution de HgCl<sub>2</sub> à 0,1% pendant 5 min. Les bulbes sont ensuite soumis à 3-4 rinçages successifs à l'eau distillée stérilisée.

### **Milieux de culture et conditions expérimentales**

Le milieu de culture de base comprend les macroéléments, les micro-éléments et les éléments organiques de Murashige et Skoog (MS) (1962) additionné de saccharose 30 g.l<sup>-1</sup> et solidifié par l'agar-agar 8 g.l<sup>-1</sup>. A ce milieu de culture, différentes combinaisons hormonales sont ajoutées. Les hormones utilisées sont : Acide β-indole butyrique (AIB) et la benzyl-adénine (BA). Le pH des milieux de culture est ajusté à 5,8. Les cultures sont placées dans une chambre de culture climatisée sous un éclairage et une température contrôlés. La température est maintenue à 24 ± 1°C. L'éclairage est assuré par des tubes fluorescents assurant une intensité lumineuse de 35 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. La photopériode est de 16 h d'éclairage.

### **Phase d'initiation**

Pour la phase d'initiation, le milieu de base a été additionné de différentes concentrations d'AIB et de BA:

- Milieu 1 : milieu MS sans hormones

- Milieu 2 : milieu MS + BA 1 mg.l<sup>-1</sup>
- Milieu 3 : milieu MS + AIB 0,1 mg.l<sup>-1</sup> + BA 1 mg.l<sup>-1</sup>
- Milieu 4 : milieu MS + AIB 0,1 mg.l<sup>-1</sup> + BA 2 mg.l<sup>-1</sup>

Les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage sous une pression de 1 bar et à une température de 120°C. Le nombre de répétitions est de 12 tubes par milieu et type d'explant.

Les observations ont porté sur le nombre de bourgeons par explant et sur la longueur des pousses.

### **Phase de multiplication**

Le milieu qui a donné le nombre de pousses le plus élevé pendant la première phase est le milieu 7 contenant de l'AIB 0,1mg.l<sup>-1</sup> et du BA 2 mg.l<sup>-1</sup>. Ce milieu est choisi pour toutes les subcultures de cette phase.

Les pousses obtenues pendant la phase d'initiation ont été individualisées et mises dans des bocaux en verre de 500 ml de volume à raison de 5 pousses par bocal. Le nombre total de pousses par explant et par espèce est de 50.

Les observations, faites après quatre semaines, ont porté sur le taux de multiplication et sur la longueur des pousses obtenues.

### **Phase d'enracinement**

Les pousses obtenues à l'issue de la phase précédente et âgées de 4 semaines ont été incubées sur le milieu MS additionnés d'AIB à différentes concentrations (0 ; 0,1 ; 0,5 et 1 mg.l<sup>-1</sup>). Les mesures et observations, faites après 4 semaines de culture, ont porté sur le taux d'enracinement, le nombre et la longueur des racines par pousse.

### **Phase d'acclimatation**

Les pousses enracinées sont repiquées en caissettes en matière plastique couvertes par un film plastique transparent. Le substrat de culture est composé de tourbe et de perlite à proportions égales. Les caissettes sont placées à l'Institut supérieur agronomique de Chott Meriem. Les jeunes plantules sont maintenues à une température de 27±3°C, une humidité relative de 80-85% et humectées tous les deux jours par pulvérisation. Cette phase d'acclimatation a duré 60 jours.

### **Analyses statistiques**

L'analyse de la variance (ANOVA) a été effectuée pour toutes les données à l'aide du logiciel SPSS.16. Des différences statistiquement significatives entre les moyennes ont été déterminées en utilisant le test de Duncan à  $\alpha = 0,05$ .

## Résultats

### Phase d'initiation

Trois jours après le repiquage des explants, on observe le débourrement des bourgeons apicaux sur tous les milieux testés. Le taux de bourgeonnement atteint 100% après quatre semaines de culture (tableau 1). Pour le nombre de bourgeons néoformés par explant, le milieu le plus favorable est le milieu M4 (AIB 0,1 mg.l<sup>-1</sup> + BA 2 mg.l<sup>-1</sup>) qui a permis d'obtenir 3,8 et 4,1 bourgeons, respectivement chez *Gladiolus segetum* et *Gladiolus dubius* (figure 1). Pour tous les paramètres étudiés, l'analyse de la variance a montré que les différences entre les deux espèces ne sont pas significatives.

Tableau 1: Effets de l'AIB et de la BA sur l'initiation *in vitro* de bourgeons apicaux de *Gladiolus segetum* et de *Gladiolus dubius*.

Milieux de culture	Espèces	Taux de bourgeonnement (%)	Nombre de bourgeons néoformés par explant	Longueur des pousses (cm)
M1	<i>G. segetum</i>	100	1±0 bc	0,55±0,15b
	<i>G. dubius</i>	100	1±0 bc	0,62±0,22b
M2	<i>G. segetum</i>	100	1±0 bc	0,62±0,22b
	<i>G. dubius</i>	100	2,5±1b	0,74±0,51b
M3	<i>G. segetum</i>	100	2,83±1,11b	0,78±0,51b
	<i>G. dubius</i>	100	1±0 bc	0,55±0,15b
M4	<i>G. segetum</i>	100	3,83±1,19a	3,04±1,15a
	<i>G. dubius</i>	100	4,1±1,02a	3,16±0,91a

Les valeurs sur la même colonne portant des lettres distinctes sont significativement différentes (P<0,05).



Figure 1 : Elongation des bourgeons apicaux prélevés sur des cormes de *Gladiolus segetum* et cultivés sur le milieu M7 (AIB 0,1 mg.l<sup>-1</sup> + BA 2 mg.l<sup>-1</sup>).

### Phase de multiplication

Les pousses axillaires obtenues à l'issue de la phase d'initiation ont été individualisées et repiquées sur le milieu d'initiation M4 (AIB 0,1 mg.l<sup>-1</sup> + BA 2 mg.l<sup>-1</sup>) qui a donné les meilleurs résultats. Le nombre le plus élevé de bourgeons, est atteint, après quatre semaines de culture 4,2 et 4,3 bourgeons respectivement chez *Gladiolus segetum* et *Gladiolus dubius* (tableau 2). L'analyse de la variance montre une différence significative entre les 3 types d'explants, alors que cette différence non significative entre les deux espèces. La longueur des pousses varie de 1 à 1,5 cm, toutefois, il n'y a pas de différences significatives entre les espèces (figures 2).

Tableau 2: Effet de la BA et de l'AIB sur le nombre de bourgeons et la longueur de pousses de deux espèces de genre *Gladiolus* cultivé *in vitro*.

Concentration des hormones (mg.l <sup>-1</sup> )	Nombre de bourgeons	Longueur de pousses
<i>G. segetum</i>	4,20±1,99 <sup>a</sup>	1,48±1,47 <sup>a</sup>
<i>G. dubius</i>	4,35±2,81 <sup>a</sup>	1,39±1,30 <sup>a</sup>

Les valeurs sur la même colonne portant des mêmes lettres sont non significativement différentes (P<0,05).



Figure 2 : Phase de multiplication des bourgeons apicaux sur le milieu M7 (AIB 0,1 mg.l<sup>-1</sup> + BA 2 mg.l<sup>-1</sup>)

### Phase d'enracinement

La phase d'enracinement a abouti à une rhizogenèse des pousses à l'exception du milieu témoin (tableau 3). Le milieu le plus riche en auxine (AIB 1 mg.l<sup>-1</sup>) a donné le taux d'enracinement le plus élevé, soit 36 et 30%, respectivement chez *Gladiolus segetum* et *Gladiolus dubius*. Le nombre de racines par pousse est le plus élevé sur ce milieu également : 7,4 et 7,9, respectivement chez *Gladiolus segetum* et *Gladiolus dubius* (Figure 3). La

longueur des racines paraît peu affectée par la concentration de l'AIB et varie de 5,1 à 5,4 cm chez *Gladiolus segetum* et de 4,6 à 5,0 cm chez *Gladiolus dubius*.

Tableau 3 : Effet de l'AIB sur l'enracinement *in vitro* des pousses de *Gladiolus segetum* et *Gladiolus dubius*.

AIB (mg.l <sup>-1</sup> )	Espèces	Taux d'enracinement (%)	Nombre des racines	Longueur des racines (cm)
0	<i>G.segetum</i>	0	0	0
	<i>G.dubius</i>	0	0	0
0,1	<i>G.segetum</i>	12	4,16±0,4b	5,16±2,56a
	<i>G.dubius</i>	10	4,2±0,83b	5±0a
0,5	<i>G.segetum</i>	26	5 ±1,47b	5,41±2,87a
	<i>G.dubius</i>	24	5,33±3,22b	4,66±1,22a
1	<i>G.segetum</i>	36	7,44±4,5a	5,15±2,58a
	<i>G.dubius</i>	30	7,92±3,98a	4,57±2,34a

Les valeurs sur la même colonne portant des lettres distinctes sont significativement différentes (P<0,05).



Figure 3 : Enracinement *in vitro* des pousses de *Gladiolus dubius* sur le milieu contenant

### AIB 1mg.l<sup>-1</sup>.

#### Phase d'acclimatation

Les pousses enracinées qui n'ont pas encore formé de cormes ont été transférées en caissettes sur un substrat inerte composé de tourbe et de perlite à proportions égales. Les jeunes plantules maintenues à l'étouffée sous serre, à une température de 27±3°C, une humidité relative de 80-85% ont formé toutes des cormes après 6 semaines de culture.

## Discussion

Dans la phase d'initiation, les bourgeons apicaux étudiés de deux espèces *Gladiolus segetum* et *Gladiolus dubius* n'évoluent que vers le bourgeonnement axillaire sur tous les milieux de culture. En effet, le nombre de pousses le plus élevé a été observé chez le milieu contenant BA 2 mg.l<sup>-1</sup> et AIB 0,5 mg.l<sup>-1</sup>. Ces résultats en accord avec ceux de steinitz *et al.*, (1991) qui montrent que le milieu le plus favorable au bourgeonnement *in vitro* du glaïeul pour la phase d'initiation doit contenir de BA. D'autre part ce milieu riche en BA, a permis d'avoir 3,83 et 4,1 bourgeons néoformés pour les explants prélevés des bourgeons apicaux, respectivement chez *Gladiolus segetum* et *Gladiolus dubius*. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Bettaieb (2003), qui a observé le meilleur bourgeonnement de bourgeons apicaux de deux cultivars white friendship et Peter pears de glaïeul sur un milieu pareille à celui sur lequel on a trouvées meilleurs résultats.

Ici on peut relever l'importance de la combinaison hormonale entre l'auxine et la cytokinine (Souyah *et al.*, 2002), puisque la BA seule ne donne pas un nombre élevé de bourgeons malgré son importance dans le bourgeonnement et la régénération (Augé,1989). Les bons résultats obtenus pendant la phase d'initiation sont dus à l'effet conjugué de la présence de benzyladénine et l'acide indol butyrique (Ben Radhia, 2005). Pour l'enracinement, tous les milieux testés ont abouti à une rhizogenèse des pousses sauf le témoin. L'augmentation de la concentration de l'auxine aboutie à une augmentation de taux d'enracinement ainsi le nombre moyen de racines. la longueur de racine n'a pas affecté par les différentes concentrations d'auxines. La meilleure concentration est celle d'AIB 1mg.l<sup>-1</sup>. Ces résultats sont en accord avec ceux de Nhut *et al.*, (2004) qui ont montré que la rhizogenèse des pousses de glaïeul mises en culture *in vitro* a lieu dans des milieux de culture contenant l'AIB et dont les concentrations varient entre 1mg.l<sup>-1</sup> et 2,5 mg.l<sup>-1</sup>. Ces résultats sont aussi comparables à ceux trouvés par Dantu et Bhojwani (1995) qui indiquent que le nombre le plus élevé de racines est obtenu en présence de 1 mg.l<sup>-1</sup> AIB ainsi qu'à ceux de Sinha et Roy (2002) où le meilleur enracinement du *Gladiolus primulinus* Baker est réalisé en présence de 2 mg.l<sup>-1</sup> AIB. De Bryn et Ferreir (1992) ont également atteint l'enracinement des pousses cultivées *in vitro* en utilisant AIB 0,5 mg.l<sup>-1</sup> et dans un milieu MS/2. L'absence d'une différence pour la longueur de racines pour les différentes concentrations d'auxines peut être expliquée par un effet prévisible, car ce régulateur de croissance est connu pour ces propriétés de stimulation de la rhizogenèse. Le meilleur taux d'enracinement a été observé sur le milieu MS. Ces résultat n'ont pas en accord avec ceux de (De Bryn et Ferreir 1992), qui ont montré que le milieu MS/2 a donné le meilleur taux d'enracinement et de bulbaison, ceux-ci peut être expliqué par la forte concentration en glucose et fructose interne



chez les bulbes de *Gladiolus sp.* Cette concentration interne peut donner un effet irréversible. L'utilisation des différentes concentrations du milieu MS a pour objectif d'assurer un meilleur enracinement des vitropousses issues de la phase de multiplication et de les préparer à la phase d'acclimatation. Pour toutes les phases étudiées il n'y a pas une différence significative entre les deux espèces. Tous les explants provenant de la même région, ceux-ci peut expliquer par l'effet de climat.

### Conclusion

La micropropagation des deux espèces spontanées du genre *Gladiolus* est possible à partir des différents explants, mais les bourgeons apicaux ont toujours donné les meilleurs résultats. L'initiation nécessitait un milieu contenant l'auxine et la cytochinine, cette combinaison hormonale s'avère nécessaire pour l'initiation et la multiplication des pousses de glaïeul. Le milieu le plus favorable dans cette étude, est celui contenant BA 2 mg.l<sup>-1</sup> et AIB 0,1mg.l<sup>-1</sup>.

Pour l'enracinement *in vitro* on a testé différentes concentration hormonales, on a enregistré que le meilleur milieu pour l'enracinement est celui contenant le milieu de base MS et l'AIB 1 mg.l<sup>-1</sup>.

### References:

- Aftab F, Alam M, Afrasiab H. 2008. *In vitro* shoot multiplication and callus induction in *Gladiolus hybridus* Hort. *Pakistan Journal of Botany* 40 (2), 517-522
- Ascough G.D., Swart P.A., Finnie J.F., Van Staden J. 2011. Micropropagation of *Romulea minutiflora*, *Sisyrinchium laxum* and *Tritonia gladiolaris* — Iridaceae with ornamental potential. *South African Journal of Botany* 77, 216–221.
- Augé, R., Beauchesne, G., Boccon-Gibod, J., Decourtye, L., Digat, -B., Jalouzot, R.,
- Bajaj YPS, Sidhu MMS, Gill APS. 1992. Micropropagation of *Gladiolus*. In: Bajaj YPS (Eds) *Biotechnology in Agriculture and Forestry 20, High-Tech and Micropropagation IV*, Springer Verlag, Berlin, 135-143
- Begum S. & Hadiuzzaman S., 1995. *In vitro* rapid shoot proliferation and corm development in *Gladiolus grandiflorus* cv. Redbrand. *Plant Tissue Cult.*, 5, 7-11.
- Ben Radhia H. 2005. *Adaptation to the ornamental horticulture spontaneous gladiolus (Gladiolus segetum Ker Gaul.) in Tunisia*. Master of Science, National Agronomic Institute of Tunisia, 65 p.
- Bettaieb T., 2003. Régénération *in vitro* de variants somaclonauux de glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) Tolérants aux basses températures. Thèse de doctorat, Institut national agronomique de Tunisie, 136 p.

- Boonvanno K. & Kanchanapoom K., 2000. *In vitro* propagation of *Gladiolus*. *Suranaree J. Sci. Technol.*, 7, 25-29.
- Dantu P.K. et Bhojwani S.S., 1995. *In vitro* corm formation and field evaluation of corm derived plants of *Gladiolus*. *Scientia Hort.* 61,123-128.
- De Bryn, M.H. et D.I., Ferreir., 1992. *In vitro* corm production of *Gladiolus dalennii* and *G. tristis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 31, 123–128.
- Edouard LE FLOC'H, Loutfy BOULOS et Errol VELA. 2010. Catalogue synonymique commenté de la FLORE DE TUNISIE. 500p.
- Gladiolus tristis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 31, 123 – 128.
- Goo, D.H., H.Y. Joung and K.W. Kim. 2003. Differentiation of gladiolus plantlets from callus and subsequent flowering. *Acta Hort.* 620, 339-342.
- Grewal HS., Arora JS. et Gosal SS., 1995. Micropropagation of *Gladiolus* through *in vitro* cormlets production. *Plant Tissue Cult.* 5, 27 - 34.
- Haouala, F. et Chaieb, E., 2012. Effects of Explant Position and Polarity on Callus Induction and Shoot Regeneration of *Gladiolus* (*Gladiolus hybridus* Hort.). *Floriculture and Ornamental Biotechnology*. 6 (Special Issue 2), 40-47.
- Hussain I, Mohamed H. & Rashid Quraishi A., 2001. *In vitro* multiplication of *Gladiolus* (*Gladiolus crassifolius*). *Plant Tissue Cult.*, 11, 121-126.
- Hussey G. 1977. *In vitro* propagation of *Gladiolus* by precocious axillary shoot formation. *Scientia Horticulturae* 6, 287-296
- Kumar, A., Sood, A., Palni, L.M.S. and Gupta, A.K. 1999. *In vitro* propagation of gladiolus hybridus hort.: Synergistic effect of heat shock and sucrose on morphogenesis. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 57,105-112.
- Margara J. 1984. Néof ormation de méristèmes et embryogenèse somatique. In: INRA (Eds) *Bases de la Multiplication Végétative. Les Méristèmes et l'Organogenèse*, Paris, 75-175
- Murashige T. & Skoog F.A., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15, 473 - 492.
- Nagaraju V. & Parthasarathy V.A., 1995. Effect of growth regulators on *in vitro* shoots of *Gladiolus hybridus*. *Folia Horticulturae*, 7(2), 93-100.
- Nhut DT, Teixeira da Silva JA, Huyen PX, Paek KY.2004. The importance of explant source on regeneration and micropropagation of *Gladiolus* by liquid shake culture. *Scientia Horticulturae* 102, 407-414
- Prasad, V.S.S. and S.D. Gupta. 2006. *In vitro* shoot regeneration of gladiolus in semi-solid agar versus liquid cultures with support systems. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 87,263-271
- Priyakumari, I. and V.L. Sheela. 2005. Micropropagation of gladiolus cv. 'Peach Blossom' through enhanced release of axillary buds. *J. Trop.Agri.* 43(1-2),47-50.
- Roy S., Gangopadhyay G., Bandyopadhyay T., Binoy K., Datta S., Kalyan K. et Mukherjee., 2006. Enhancement of *in vitro* micro corm production in

*Gladiolus* using alternative matrix. *African Journal of Biotechnology*. 5 (12). 1204-1209.

Salhi I., 2007. Contribution to the study of salinity tolerance in gladiolus (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) cultured *in vitro* and *in vivo*. Master of Science. higher agricultural institute of Chott Meriem, 60 p.

Sen J, Sen S. 1995. Two-step bud culture technique for a high frequency regeneration of *Gladiolus* corms. *Scientia Horticulturae* 64, 133-138

Sinha P. & Roy S.K., 2002. Plant regeneration through *in vitro* cormel formation from callus culture of *Gladiolus primulinus* Baker. *Plant Tissue Cult.*, 12,( 2), 139-145.

Souyah, N.,Khouja, M.L., Rejeb, M.N et Bouzid, S., 2002. Micropropagation of a shrub sylvopastoral, *Atriplex halimus* L. (Chénopodiacées). Faculty of Sciences of Tunis. p 131 – 135.?????????

Steinitz B, Cohen A, Goldberg Z & Kochba M. 1991. Precocious gladiolus corm formation in liquid shake cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 26,63-70

Ziv M. & Lilien-Kipnis H., 2000. Bud regeneration from inflorescence explant for rapid propagation of geophytes *In vitro*. *Plant Cell Rep.*, 19, 845-850.

Ziv M. 1979. Transplanting *Gladiolus* plants propagated *in vitro*. *Scientia Hort.* 11,257-260